

Gezielte Mutagenese mit Cas- Endonukleasen zur Etablierung von Bymovirus-Resistenzen in Gerste

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat)

genehmigte Dissertation

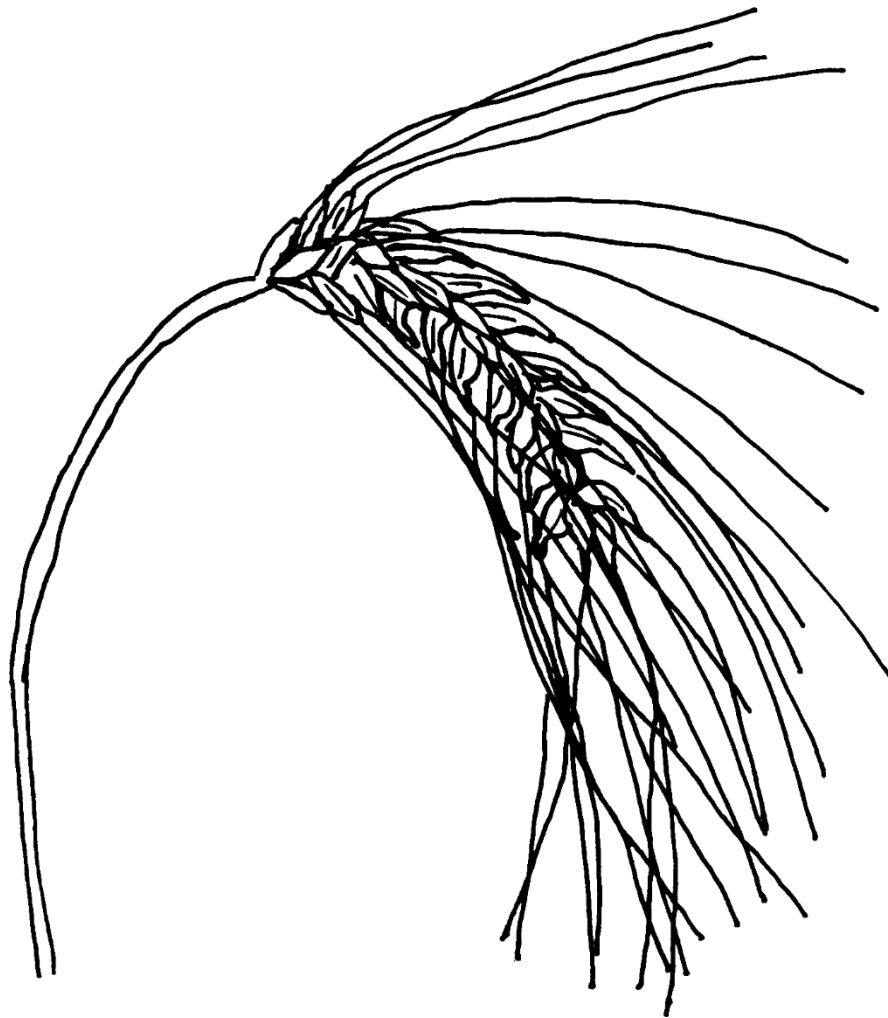
von

Robert Eric Hoffie, M. Sc.

Erscheinungsjahr 2023

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Jens Boch
Korreferent: Prof. Dr. rer. hort. Edgar Maiß

Tag der Promotion: 16. Dezember 2022



Hordeum vulgare L.

Zusammenfassung

Seit der neolithischen Revolution haben Domestikation und Pflanzenzüchtung die vom Menschen angebauten Pflanzen grundlegend verändert - aus Wildpflanzen wurden Kulturpflanzen. Insbesondere ab dem 19. Jahrhundert intensivierten die ersten Pflanzenzüchterinnen und -züchter ihre Arbeit zur Verbesserung von Kulturpflanzen. Mit der aufkommenden wissenschaftlichen Disziplin der Genetik wuchs das Verständnis dafür, wie Eigenschaften vererbt und verändert werden. Die moderne Genomik mit der Sequenzierung von Pangenomenen und leistungsfähiger Bioinformatik trägt wesentlich dazu bei, die genetischen Grundlagen dieser Eigenschaften und die Bedeutung genetischer Veränderungen immer besser zu verstehen.

Mit der Genomeditierung steht heute ein Methodenset zur Verfügung, um Gene von Kulturpflanzen gezielt zu verändern, sowohl für die wissenschaftliche Untersuchung von Genfunktionen als auch für die züchterische Verbesserung von Pflanzen. Insbesondere die vom mikrobiellen Immunsystem CRISPR-Cas abgeleiteten Cas-Endonukleasen haben sich dabei als nützliches und praktikables Werkzeug erwiesen. In der vorliegenden Arbeit wurde die CRISPR-assoziierte Endonuklease Cas9 zur gezielten Mutagenese zweier bekannter Anfälligkeitse Gene der Gerste gegen die Gelbmosaikvirose eingesetzt.

Die Gelbmosaikvirose ist eine der bedeutendsten Krankheiten der Gerste (*Hordeum vulgare* L.) in Europa und Asien. Sie wird von den beiden Bymoviren Gerstengelbmosaikvirus (*Barley Yellow Mosaic Virus*, BaYMV) und Mildes Gerstenmosaikvirus (*Barley Mild Mosaic Virus*, BaMMV) verursacht. Mit *Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E* (*EIF4E*) und *Protein Disulfide Isomerase-Like 5-1* (*PDIL5-1*) sind zwei Anfälligkeitse Gene der Gerste bekannt, für die resistenzvermittelnde Allele beschrieben wurden. Derzeit sind fast alle Wintergerstensorten in Europa resistent gegen BaYMV und BaMMV, jedoch basieren diese Resistenzen fast ausschließlich auf den *EIF4E*-Allelen *rym4* und *rym5*. Doch diese Resistenzen wurden bereits von angepassten Virusstämmen gebrochen, sodass ein Bedarf an neuen Resistenzvarianten und -mechanismen besteht.

Ziel dieser Arbeit war es daher, neue resistenzvermittelnde Allele von *EIF4E* zu generieren sowie die in Gerstenlandrassen beschriebenen, resistenzvermittelnden Allele von *PDIL5-1* in anfälligen Genotypen zu reproduzieren. Dafür wurden beide Gene mittels Cas9 gezielt mutiert, wobei erfolgreich verschiedene *Knockout*- und Basenmutationen in *PDIL5-1* sowie *Knockout*-Mutationen in *EIF4E* induziert werden konnten. Die Nachkommenschaften der Primärmutanten wurden manuell mit BaMMV infiziert und sowohl die *Knockout*-Mutationen in *EIF4E* und *PDIL5-1* als auch die Basensubstitutionen in *PDIL5-1* führten zur Resistenz gegen das Virus.

Im Gegensatz zu *PDIL5-1* ging der *Knockout* von *EIF4E* jedoch mit einer Reduktion des Kornertrags einher. Aus diesem Grund wurde für dieses Kandidatengen zusätzlich die Baseneditierung in Wintergerste etabliert. Mithilfe von Cas9-Derivaten, die gezielt C-zu-T- und A-zu-G-Basensubstitutionen induzieren, wurden so insgesamt zehn neue Allele von *EIF4E* erzeugt, die in nachfolgenden Arbeiten auf ihre resistenzvermittelnden Eigenschaften überprüft werden können.

Die vorliegende Arbeit liefert konkrete Beispiele dafür, wie mithilfe der Genomeditierung Pflanzenforschung und -züchtung, insbesondere im Hinblick auf Krankheitsresistenzen, verbessert werden können. Mit den Methoden der gezielten Mutagenese ist es möglich, Genvarianten für vorteilhafte Eigenschaften, die in der Kulturpflanzenvielfalt (z.B. in Genbanken) mithilfe der Hochdurchsatzsequenzierung und modernen Methoden der Genetik immer schneller gefunden werden, für die Pflanzenzüchtung nutzbar zu machen. Damit kann ein wesentlicher Beitrag für eine nachhaltigere Landwirtschaft geleistet werden.

Schlagerworte: CRISPR, Pflanzenbiotechnologie, Pflanzenvirologie

Abstract

Since the Neolithic Revolution, domestication and plant breeding have extensively changed the shape of the plants cultivated by humans - wild plants became crop plants. Especially from the 19th century onwards, the first plant breeders intensified their work on crop plant improvement and with genetics as an emerging scientific discipline, they increasingly understood how traits are inherited and modified. Modern genomics, with sequencing of pangenomes and powerful bioinformatics, is playing a major role in helping understand the genetic basis of these traits and the significance of genetic changes.

With gene editing, a whole suite of methods is now available to specifically modify genes of crop plants. In particular, CRISPR-associated (Cas) endonucleases derived from the microbial CRISPR-Cas immune system have been proven to be a useful and practical tool. In the present work, the Cas9 endonuclease was used for targeted mutagenesis of two previously known susceptibility genes of barley against the barley yellow mosaic disease.

Caused by the *Barley yellow mosaic virus* (BaYMV) and the *Barley mild mosaic virus* (BaMMV), the barley yellow mosaic disease is one of the most important viral diseases of barley (*Hordeum vulgare* L.) in Europe and Asia. With the *Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E* (*EIF4E*) and the *Protein Disulfide Isomerase-Like 5-1* (*PDIL5-1*), two susceptibility genes of barley are known for which resistance-conferring alleles have already been described. Currently, almost all winter barley varieties in Europe are resistant to BaYMV and BaMMV, but this resistance is based almost exclusively on the *EIF4E* alleles *rym4* and *rym5*. However, this resistance has already been overcome by some adapted virus strains, which is why there is an urgent need for new resistance variants and mechanisms.

Therefore, the aim of this work was to generate new resistance-mediating alleles of *EIF4E* and to reproduce in susceptible genotypes the resistance-mediating alleles of *PDIL5-1* that have been described in barley landraces. For this purpose, both genes were specifically mutated using Cas9, successfully inducing different knockout and base mutations in *PDIL5-1* as well as knockout mutations in *EIF4E*. The progeny of the primary mutants was mechanically infected with BaMMV and both the knockout mutations in *EIF4E* and *PDIL5-1* and the base substitutions in *PDIL5-1* resulted in resistance to the virus.

However, unlike *PDIL5-1*, knockout of *EIF4E* was accompanied by a reduction in grain yield. For this reason, base editing was established in winter barley for this candidate gene. Using Cas9 derivatives that specifically induce C-to-T and A-to-G base substitutions, a total of ten new alleles of *EIF4E* were generated which can be tested for their resistance-mediating properties in subsequent work.

The present work provides concrete examples of how gene editing can be used to improve plant research and plant breeding, especially with regard to disease resistance. With the methods of targeted mutagenesis, it is possible to deploy beneficial gene variants which are being found ever faster by taking advantage of the crop diversity (e.g. in gene banks) and with the help of high-throughput sequencing and modern methods of genetics. This is expected to make a significant contribution to more sustainable agriculture.

Keywords: CRISPR, plant biotechnology, plant virology

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	IV
Abstract	V
Abkürzungsverzeichnis.....	X
1. Allgemeine Einleitung	1
1.1. Eine kurze Geschichte der Pflanzenzüchtung.....	1
1.1.1. Die Zähmung der Pflanzen: Domestikation.....	1
1.1.2. Kombination verschiedener Merkmale: Kreuzungszüchtung mit System.....	2
1.1.3. Grundlage von Evolution und Züchtung: Mutationen.....	4
1.1.4. Biotechnologie in Pflanzenforschung und -züchtung	5
1.1.5. Mutationen nutzbar machen: DHs, MAS und TILLING	8
1.1.6. Zielen und Treffen: Genomeditierung in der Pflanzenzüchtung.....	10
1.2. Wenn die Gerste „Grippe“ hat	15
1.2.1. Pflanzenviren und ihre Bedeutung.....	16
1.2.2. <i>Potyviridae</i> : pflanzenpathogene RNA-Viren.....	16
1.2.3. Gerstengelbmosaikvirose: Eine neue Krankheit mit großer Bedeutung.....	19
1.2.4. Genetischer Pflanzenschutz: Identifizierte Resistenzloci in der Gerstenzüchtung.....	19
1.2.5. Resistenzmechanismen gegen Pflanzenviren: aktive und passive Verteidigung.....	20
1.3. Zielstellungen dieser Arbeit.....	22
1.4. Eigene Beiträge im Rahmen der kumulativen Arbeit.....	23
2. Cas Endonuclease Technology — A Quantum Leap in the Advancement of Barley and Wheat Genetic Engineering.....	24
2.1. Introduction.....	25
2.1.1. Historical View of Genetic Modification in Crop Plants	25
2.1.2. Platforms of Customizable Endonucleases.....	26
2.2. Methodological Aspects of Cas Endonuclease Technology.....	27
2.2.1. System Components.....	27
2.2.2. Criteria for Target Motif Selection and <i>in silico</i> gRNA Design.....	28
2.2.3. Delivery of Cas Endonucleases and Associated Reagents into Plant Cells	29
2.2.4. From Site-Directed Mutagenesis to Precise Genome Editing.....	31
2.2.5. Identification and Characterization of Site-Specifically Modified Plants.....	32
2.3. Applications	33
2.4. Regulation	35
2.5. Perspective.....	36
2.6. Author Contributions.....	39
2.7. Funding.....	39
2.8. Conflicts of Interest	39
2.9. References Chapter 2.....	43

3.	Targeted Knockout of <i>Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E</i> Confers Bymovirus Resistance in Winter Barley.....	52
3.1.	Introduction.....	53
3.2.	Materials and Methods.....	53
3.2.1.	Target Selection.....	53
3.2.2.	Vector Cloning.....	54
3.2.3.	Pre-Validation of Constructs <i>via</i> Protoplast Transformation.....	54
3.2.4.	<i>Agrobacterium</i> -Mediated Transformation Using Embryogenic Barley Pollen	54
3.2.5.	Genotyping of Primary Transgenics and Mutants.....	55
3.2.6.	BaMMV Inoculation and Resistance Screening by DAS-ELISA.....	55
3.2.7.	Yield Data	55
3.3.	Results.....	55
3.4.	Discussion.....	59
3.5.	Data Availability Statement.....	60
3.6.	Author Contributions.....	60
3.7.	Funding.....	60
3.8.	Conflict of Interest.....	60
3.9.	Publisher's Note	60
3.10.	Acknowledgments.....	60
3.11.	Supplementary Material Chapter 3.....	61
3.12.	References Chapter 3.....	61
4.	Novel Resistance to the Bymovirus BaMMV established by Targeted Mutagenesis of the <i>PDIL5-1</i> Susceptibility Gene in Barley.....	64
4.1.	Introduction.....	65
4.2.	Material and Methods.....	66
4.2.1.	Target Selection, Off-Target Analysis and Vector Cloning.....	66
4.2.2.	<i>Agrobacterium</i> -mediated Barley Transformation	67
4.2.3.	Amplification and Sequencing of Target Regions of Primary Mutants.....	67
4.2.4.	Mechanical BaMMV and BaYMV Inoculation and Analysis of M ₂ Plants.....	67
4.2.5.	Yield Data	68
4.3.	Results.....	68
4.3.1.	Mutations in the <i>PDIL5-1</i> Target Motif 2 confer Resistance of Winter Barley cv. 'Igri' to BaMMV	68
4.3.2.	InDels as well as Single Nucleotide Polymorphisms in different Target Motifs confer Resistance of Spring Barley 'Golden Promise' to BaMMV.....	71
4.4.	Discussion.....	75
4.4.1.	Cas9 Endonuclease efficiently induces Mutations in <i>PDIL5-1</i>	75
4.4.2.	Microhomologies present in the Target Region contribute to the Diversity of Mutation Patterns	75

4.4.3.	Site-specific induced Mutations conferring Resistance to BaMMV Infection are similar to Haplotypes present among Barley Genetic Resources	75
4.4.4.	Loss of <i>HvPDIL5-1</i> Function has no apparent adverse Effects on Plants	77
4.5.	Conflict of Interests	78
4.6.	Author Contributions.....	78
4.7.	Funding.....	78
4.8.	Acknowledgments.....	78
4.9.	Supplementary Material Chapter 4.....	78
4.10.	References Chapter 4.....	79
5.	Base Editing of Bymovirus Susceptibility factor <i>EIF4E</i> in Winter Barley.....	83
5.1.	Introduction.....	84
5.2.	Material and Methods.....	85
5.2.1.	Target Selection	85
5.2.2.	Vector Cloning	85
5.2.3.	Pre-Validation of Constructs <i>via</i> Protoplast Transformation.....	86
5.2.4.	<i>Agrobacterium</i> -mediated Transformation using Barley Microspore-derived Plant Regeneration.....	86
5.2.5.	Genotyping of Primary Transgenic and Mutant Plants	87
5.3.	Results.....	87
5.4.	Discussion.....	92
5.5.	Author Contributions.....	93
5.6.	Funding.....	94
5.7.	Conflict of Interest.....	94
5.8.	Acknowledgments.....	94
5.9.	Supplementary Material Chapter 5.....	94
5.10.	References Chapter 5.....	94
6.	Allgemeine Diskussion	97
6.1.	Fehlerhafte Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen führt zu verschiedenen Mutationen.....	97
6.2.	Der nächste Schritt: Präzise Editierungen	99
6.3.	Genomeditierung für die Pflanzenzüchtung: Potentiale und Herausforderungen	100
6.3.1.	Neue Methoden – neue Möglichkeiten	100
6.3.2.	Herausforderungen in der Praxis.....	101
7.	Erfahrungen aus der Wissenschaftskommunikation	104
7.1.	Gute Wisskomm – eine persönliche Sicht	104
7.2.	Ausgewählte Beispiele aus der Wissenschaftskommunikation.....	106
7.2.1.	Soziale Medien.....	106
7.2.2.	Vorträge, Führungen und Tage der offenen Tür	107

7.2.3.	Politikberatung.....	107
7.2.4.	Medien.....	107
8.	Fazit und Ausblick.....	108
9.	Literaturverzeichnis für die Kapitel 1 und 6.....	109
10.	Anhang.....	122
10.1.	Supplementary Material Chapter 3: Targeted Knockout of <i>Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E</i> Confers Bymovirus Resistance in Winter Barley	122
10.1.1.	S1: Sequences, Off-Target Analysis, mutated Alleles.....	122
10.1.2.	Table S1: Oligonucleotide Sequences	126
10.1.3.	Table S2: Plant Data and Statistics.....	127
10.2.	Supplementary Material Chapter 4: Novel Resistance to the Bymovirus BaMMV established by Targeted Mutagenesis of the <i>PDIL5-1</i> Susceptibility Gene in Barley....	131
10.2.1.	S1: Sequences, Off-Target Analysis, mutated Alleles.....	131
10.2.2.	Table S1: Oligonucleotide Sequences	137
10.2.3.	Table S2: Plant Data and Statistics.....	138
10.3.	Supplementary Material Chapter 5: Base Editing of Bymovirus Susceptibility factor <i>EIF4E</i> in Winter Barley	156
10.3.1.	S1: <i>HvEIF4E</i> coding Sequence and Target Motifs.....	156
10.3.2.	Table S1: Oligonucleotide Sequences	157
10.3.3.	Table S2: M ₂ Plant Data	158
10.3.4.	Standard Protocol for Base Editing with the CasCADE modular Vector System ...	169
10.4.	Anhang zu Kapitel 7: Erfahrungen aus der Wissenschaftskommunikation.....	175
	Danksagung.....	176
	Lebenslauf.....	177

Abkürzungsverzeichnis

%	<i>percent</i> , Prozent
°C	Einheit Grad Celsius
1n	haploider, einfacher Chromosomensatz
2n	diploider Chromosomensatz
6K1	erstes 6K-Peptid
6K2	zweites 6K-Peptid
A	Adenin
ABE	<i>adenine base editor</i> , Adenin-Baseneditor
ADA	<i>adenine deaminase</i> , Adenin-Deaminase
AGO	<i>Argonaut protein</i> , Argonaut Protein
ALS	Acetolactatsynthase
ANOVA	<i>analysis of variance</i> , Varianzanalyse
ASL	Aschersleben
<i>At/ A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Avr-Protein	Avirulenz-Protein
BaMMV	<i>Barley Mild Mosaic Virus</i> , Gerstengelbmosaikvirus
BaYMV	<i>Barley Yellow Mosaic Virus</i> , Mildes Gerstenmosaikvirus
BC	<i>back cross</i> , Rückkreuzung
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i> , Basales Suchwerkzeug für lokale Zuordnung
bp	<i>base pair</i> , Basenpaar
<i>Btr1</i>	<i>Brittle 1-Gen</i>
<i>Btr2</i>	<i>Brittle 2-Gen</i>
Bt-Toxin	Toxin aus <i>Bacillus thuringiensis</i>
BYDV	<i>Barley Yellow Dwarf Virus</i> , Gerstengelbverzweigungsvirus
C	Cytosin
CaMV	<i>Cauliflower Mosaic Virus</i> , Blumenkohlmosaikvirus
CaMV35S	<i>Cauliflower Mosaic Virus 35S promoter</i> , 35S-Promoter des Blumenkohlmosaikvirus
Cas	<i>CRISPR-associated</i> , CRISPR-assoziiert
CBE	<i>cytidine base editors</i> , Cytidin-Baseneditor
CDA	<i>cytidine deaminase</i> , Cytidin-Deaminase
cds	<i>coding sequence</i> , codierende Sequenz
CenH3	<i>Centromeric Histone 3-Protein</i>
CI	<i>Cylindrical Inclusion-Protein</i>
CLV3	<i>CLAVATA3-Gen</i>
CP	<i>coat protein</i> , Hüllprotein
CRISPR	<i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
crRNA	CRISPR RNA
cv	<i>cultivar</i>
DAS-ELISA	<i>double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay</i>
dCas9	<i>deactivated Cas9</i> , Cas9 mit inaktivierten Endonukleasedomänen
DCL	<i>Dicer-like-Protein</i>
DH	<i>Doubled haploid</i> , Doppelhaploide Pflanze
DNA	<i>desoxy ribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
ds	<i>double stranded</i> , doppelsträngige Nukleinsäure

EASAC	<i>European Academies' Science Advisory Council</i> , Rat der Europäischen Akademien der Wissenschaften
EIF4E	<i>Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E</i> -Gen
EIF(iso)4E	Isoform von <i>EIF4E</i>
EMDV	<i>Eggplant Mottled Dwarf Virus</i> , Auberginen-Zwergwuchsvirus
EMS	Ethylmethansulfonat
ER	Endoplasmatisches Reticulum
et al.	latein: <i>et alii</i> , und andere
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i> , Ernährungs- und Landwirtschaftsorganisation der Vereinten Nationen
FokI	Typ-II-Restriktionsenzym aus <i>Flavobacterium okeanoikoites</i>
G	Guanin
Gb	Gigabasen
GFP	<i>green fluorescent protein</i> , Grün fluoreszierendes Protein
GNP	<i>grain number per plant</i> , Kornzahl pro Pflanze
GP	<i>barley cultivar Golden Promise</i> , Gerstensorte
gRNA	guide RNA
GW2	<i>Grain Width 2</i> -Gen
GWAS	<i>genome-wide association study</i> / genomweite Assoziationsstudie
h	Einheit Stunde
HC-Pro	<i>Helper Component</i> -Protein
HDR	<i>homology-directed repair</i> , Homologie-basierte Reparatur
hpt	<i>hypoxanthine phosphoribosyltransferase</i> -Gen
HR	Hypersensitive Reaktion
<i>Hs</i>	<i>Homo sapiens</i>
<i>Hv</i>	<i>Hordeum vulgare</i> L.
IAEA	<i>International Atomic Energy Agency</i> , Internationale Atomenergiebehörde
IdeMoDeResBar	" <i>Identification, Modification and Deployment of Resistance Genes in Barley</i> " Projekt
INOX	<i>INOSITOL OXYGENASE</i> -Gen
IPK	Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung Gatersleben
JKI	Julius Kühn-Institut
kb	Kilobasen
KO	<i>knockout</i>
LCTRs	<i>large cluster of tandem repeats</i>
M ₁	erste Mutantengeneration
M ₂	zweite Mutantengeneration (Filialgeneration der M ₁)
MAS	<i>marker-assisted selection</i> , Marker-basierte Selektion
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MLO	<i>MILDEW-RESISTANCE LOCUS O</i> -Gen
<i>Mm</i>	<i>Mus musculus</i>
MMEJ	<i>microhomology-mediated end joining</i> , Mikrohomologie-basierte Endverknüpfung
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
NB-LRRs	<i>nucleotide binding site – leucine-rich repeats</i> -Proteine
nCas9	Cas9 <i>nickase</i> , Cas9 mit einer inaktivierten Nukleasedomäne
NCR	nicht-codierende Region
NHEJ	<i>non-homologous end-joining</i> , Nicht-homologe Endverknüpfung
NIa-Pro	<i>intranuclear crystal</i> -Protein <i>a</i>

Nlb	<i>intranuclear crystal-Protein b</i>
Os	<i>Oryza sativa</i>
PABP	<i>Poly-A-binding Protein</i>
PAM	<i>Protospacer-adjacent motif</i> , Protospacer-angrenzendes Motiv
PAPhy	<i>PHYTASE-Gen</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PDIL5-1	<i>Protein Disulfide Isomerase-like 5-1-Gen</i>
PDI	Protein-Disulfidisomerase-Protein
PDS	<i>PHYTOENE DESATURASE-Gen</i>
PEG	<i>polyethylene glycol</i> , Polyethylenglycol
pegRNA	<i>prime editing guide RNA</i>
QTL	<i>quantitative trait locus</i> , quantitativer Merkmalslocus
RDRP	<i>RNA dependent RNA polymerase</i> , RNA-abhängige RNA-Polymerase
RDV	<i>Rice Dwarf Virus</i> , Reisverzwergungsvirus
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i> , RNA-induzierter Stilllegungskomplex
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RNP	<i>ribonucleic protein</i> , Ribonukleoprotein
R-Protein	Resistenz-Protein
<i>rym</i>	<i>Resistance locus against Yellow Mosaic disease</i> , Resistenzlocus gegen Gelbmosaikvirose
SBWMV	<i>Soil-borne Wheat Mosaic Virus</i> , Bodenbürtiges Weizenmosaikvirus
sgRNA	<i>single-guide RNA</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i> , Einzelbasenpolymorphismus
snRNA	<i>small nuclear RNA</i>
<i>Sp</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
SPIDRs	<i>spacer interspersed direct repeats</i>
SRSRs	<i>short regularly spaced repeats</i>
ss	<i>single stranded</i> , einzelsträngige Nukleinsäure
T	Thymin
t	Einheit Tonnen
T ₀	Generation primär-transgener Pflanzen, bei denen zwischen DNA-Transfer und Regeneration kein Generationswechsel erfolgt ist
T ₁	erste Filialgeneration transgener Pflanzen
<i>Ta</i>	<i>Triticum aestivum</i>
TALE	<i>Transkription-Activator-Like Effector</i>
TALLEN	<i>Transkription-Activator-Like Effector Nuclease</i>
T-DNA	Transfer-DNA
TGW	<i>thousand grain weight</i> , Tausendkornmasse
TILLING	<i>Targeting Induced Local Lesions IN Genomes</i>
Ti-Plasmid	Tumor-induzierendes Plasmid
TM	<i>target motif</i> , Zielmotiv
TMV	<i>Tabacco Mosaic Virus</i> , Tabakmosaikvirus
TRX	Thioredoxin-Domäne
UGI	<i>glycosylase inhibitor</i> , Glykosylase-Inhibitor
UTR	<i>untranslated region</i> , untranslatierte Region
UV	ultraviolett

VPg	<i>viral genome-linked-Protein</i>
WDV	<i>Wheat Dwarf Virus, Weizenverzweigungsvirus</i>
Wisskomm	Wissenschaftskommunikation
wt	<i>wild-type, Wildtyp</i>
ZF	Zinkfinger
ZFN	Zinkfinger-Nuklease
Zm	<i>Zea mays</i>
ZmUBI1	<i>Zea mays POLYUBIQUITIN1-Gen</i>

1. Allgemeine Einleitung

1.1. Eine kurze Geschichte der Pflanzenzüchtung

Die Neolithische Revolution ist die Grundlage vieler heutiger Kulturen und der Ausgangspunkt der modernen, arbeitsteiligen Welt. Als Menschen sesshaft wurden, Tiere züchteten und Ackerbau betrieben, anstatt als Jäger und Sammler durch die Lande zu ziehen, wurden Kapazitäten frei, die es den Menschen erlaubten, auf andere Weise als durch die Nahrungssuche zur Gemeinschaft beizutragen. Die Basis dessen waren Kulturpflanzen, also aus wilden Vorfahren „gezähmte“ Pflanzen, die auf die Bedürfnisse der Menschen und ihrer Landwirtschaft angepasst waren (Martínez-Ainsworth & Tenailon, 2016). Diese Anpassungen basieren auf genetischen Veränderungen und nachfolgender Selektion von Pflanzen mit vorteilhaften Eigenschaften. Im Laufe der Geschichte haben Forschende ein immer besseres Verständnis über Genetik und genetische Veränderungen von Pflanzen erlangt und ihre Erkenntnisse flossen in die Pflanzenzüchtung ein. Diese Entwicklungsgeschichte soll anhand einiger wichtiger Meilensteine (siehe Abbildung 1-1) und ausgewählter Personen im folgenden Kapitel nachvollzogen werden.

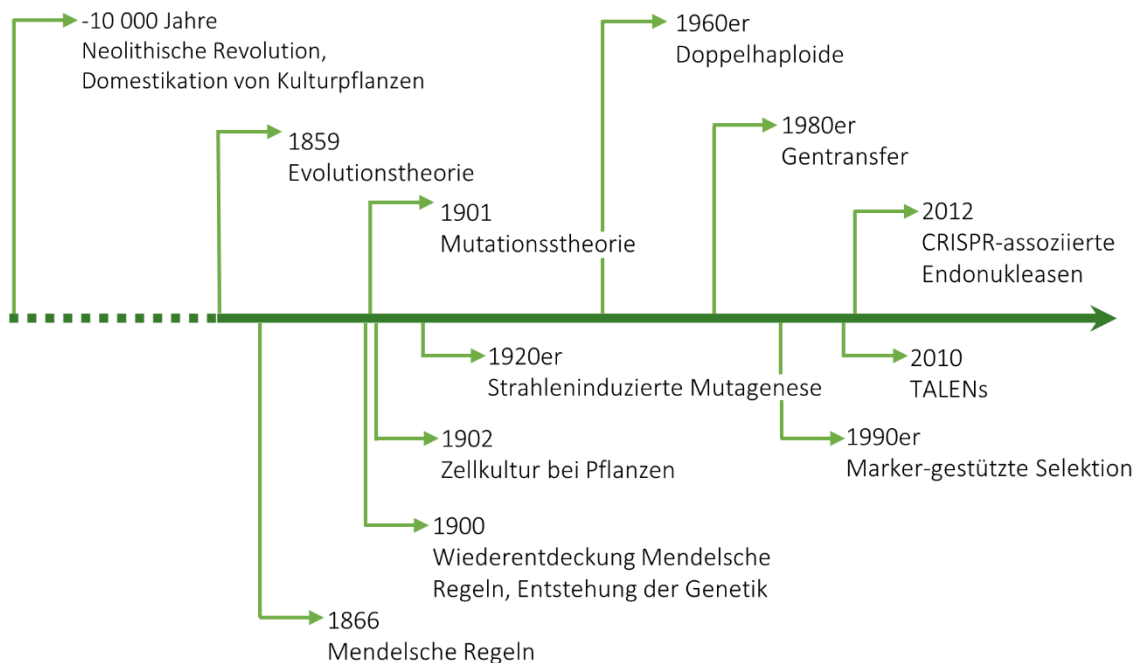


Abbildung 1-1: Meilensteine der Pflanzenzüchtung und Genetik

1.1.1. Die Zähmung der Pflanzen: Domestikation

Die Domestikation verschiedener Pflanzen begann unabhängig voneinander in mehreren Regionen der Welt, in Süd- und Mittelamerika, in Afrika, Süd-Ost-Asien und dem Nahen Osten (Martínez-Ainsworth & Tenailon, 2016). Getreide wie Gerste (*Hordeum vulgare* L.) oder Einkorn (*Triticum monococcum* L.) gehörten zu den ersten Pflanzen, die von Menschen vor etwa 10.000 Jahren im Fruchtbaren Halbmond, der Region des heutigen Israel, Jordanien, Südost-Türkei, Syrien, Iran und Irak, kultiviert wurden (Pankin & Korff, 2017; Haas et al., 2019). Schon früh war damit verbunden, wilde Gräser an die neuen Bedingungen des Anbaus durch den Menschen anzupassen. Ein wichtiges Domestikationsmerkmal, welches Getreide aus der Familie der Süßgräser gemeinsam haben, ist die Spindelfestigkeit der Ähre: Nach Abschluss der Kornreife bleibt die Spindel intakt, sodass die Körner nicht freigesetzt werden, wie es bei wilden Gräsern geschieht. Stattdessen können die an der Ähre verbleibenden Körner gemeinsam geerntet werden

(Pourkheirandish et al., 2015; Pourkheirandish et al., 2017). Dieses Beispiel verdeutlicht, wie schon bei der frühen Domestikation auf Eigenschaften selektiert wurde, die der Pflanze in der Natur keinen Evolutionsvorteil bieten würden. So wuchsen die Unterschiede zwischen Kulturpflanzen und ihren wilden Vorfahren immer mehr. Moderne Genomik ermöglicht es, die genetischen Grundlagen dieser phänotypischen Unterschiede immer besser zu erforschen und zu verstehen. Neben vielen polygen vererbten, quantitativen Eigenschaften wie Ertrag oder Anpassung an abiotische Stressfaktoren werden auch zahlreiche agronomisch relevante Eigenschaften von einzelnen Genen bestimmt (Haas et al., 2019). So basiert die zuvor erwähnte Spindelfestigkeit der Gerste auf Mutationen der Gene *Btr1* oder *Btr2*, die jeweils zum Funktionsverlust eines der Gene und so zur Spindelfestigkeit führen (Pourkheirandish et al., 2015).

1.1.2. Kombination verschiedener Merkmale: Kreuzungszüchtung mit System

Es wird davon ausgegangen, dass durch Domestikation ca. 2.500 Pflanzenarten für den Anbau durch den Menschen nutzbar gemacht wurden. Die größten Gruppen stellen dabei die Süßgräser (*Poaceae*) und die Hülsenfrüchtler (*Fabaceae*) dar, die zusammen 30 % aller Kulturpflanzen ausmachen (Dirzo & Raven, 2003). Von dieser großen Zahl liefern jedoch nur drei Grasarten - Reis, Weizen und Mais - weltweit 60 % der Kalorien für die menschliche Ernährung.

Im 18. Jahrhundert begannen Forscher und Gärtner mit Experimenten zum Kreuzen von Pflanzen. Zum einen haben sie Zierpflanzen im Blick, um sie gärtnerisch zu nutzen, zum anderen sind es Versuche zur Hybridisierung von verschiedenen Arten. Vor allem unter dem Eindruck der Erkenntnisse zur Evolutionstheorie von Charles Robert Darwin (1809-1882) untersuchten sie so die Veränderlichkeit von Merkmalen über die Zeit. Die Beobachtungen zeigten, dass bei einigen Merkmalen in den Nachkommenschaften Mischformen der Eltern auftreten, sich bei anderen Merkmalen aber einer der Eltern durchsetzt. Dies war der Anfangspunkt für weitere Forschung, die ein Grundstein der Genetik werden sollte: Im mährischen Brünn, heute Brno in der Tschechischen Republik, führte der Naturforscher und Mönch Gregor Johann Mendel (1822-1884) über mehrere Jahre Kreuzungsversuche mit verschiedenen Pflanzenarten durch. Er wollte zeigen, dass sich bestimmte Eigenschaften von den Eltern auf ihre Nachkommen und auch folgende Generationen nach bestimmten Regeln vererben. Ebenso intensiv an Mathematik interessiert, fasste er seine Beobachtungen in Formeln zusammen und beschrieb diese in seiner Publikation „Versuche über Pflanzen-Hybriden“ (Mendel, 1866). Seine Ergebnisse stützten sich auf mehrere hundert Kreuzungen von verschiedenen Erbsenvarietäten, die er von Gärtnereien und Züchtern bezog und vorab für zwei Jahre im Anbau testete. Insgesamt untersuchte Mendel nach eigenen Angaben über 10.000 Pflanzen. Dabei bonitierte er sieben Merkmale: Form der reifen Samenkörner, Farbe des Endosperms, Farbe der Samenschale, Form der Hülse, Farbe der unreifen Hülse, Stellung der Blüten und Länge der Sprossachse. Er führt in seiner Arbeit bis heute bestehende Begriffe wie „dominante“ und „rezessive Eigenschaft“ ein und beschreibt ihr Vererbungsverhalten an den verschiedenen untersuchten Merkmalen. In der ersten Nachkommengeneration seiner Hybriden erkennt er eine Verteilung von dominantem zu rezessivem Merkmal im Verhältnis von 3:1. In der folgenden Generation beobachtet er aber die Aufspaltung der Merkmale in einem Teil der Hybriden mit dem dominanten Merkmal und in einen anderen Teil mit dem rezessiven Merkmal. Die „Erbfaktoren“ treten also in einem anderen Verhältnis auf, weil die dominante Variante die rezessive in einem Teil der Nachkommen „überdeckt“. Letztlich fasst er seine Beobachtungen im Term „ $A + 2 Aa + a$ “ zusammen, wobei A für die dominierende Variante der Erbfaktoren, a für die rezessive und Aa für „Hybridform“ steht. Auch die voneinander unabhängige Vererbung und die daraus resultierende neue Kombination verschiedener Merkmale beobachtet Mendel in seinen Experimenten und versucht sie in solchen mathematischen Termen zu beschreiben. Er postuliert:

„Alle constanten Verbindungen, welche bei Pisum durch Combinirung der angeführten 7 charakteristischen Merkmale möglich sind, wurden durch wiederholte Kreuzung auch wirklich erhalten. Ihre Zahl ist durch $2^7 = 128$ gegeben. Damit ist zugleich der factische Beweis geliefert, dass constante Merkmale, welche an verschiedenen Formen einer Pflanzensippe vorkommen, auf dem Wege der wiederholten künstlichen Befruchtung in alle Verbindungen treten können, welche nach den Regeln der Combination möglich sind.“

Gregor Mendel (1822-1884)

Mendel hebt vor allem auf die Konstanz der Merkmale ab, die zwar in den Hybriden mitunter von der jeweils dominanten Merkmalsausprägung überdeckt werden kann, doch in den Nachkommen unverändert in festen Verhältnissen wieder auftreten. Das widerspricht dem damaligen Zeitgeist, der sich vor allem an Darwins Evolutionstheorie und der darin beschriebenen kontinuierlichen Veränderlichkeit von Merkmalen im Laufe der Zeit orientiert. Dies ist eine der Erklärungen, warum Mendels Ergebnisse seinerzeit wenig Beachtung fanden und, wenn überhaupt, eher kritisiert wurden (Schwarzbach et al., 2014). So gerieten sie vorerst in Vergessenheit.

Unabhängig von der so gebremsten Entwicklung der Genetik als wissenschaftlicher Disziplin spezialisierten sich in der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts zunehmend Landwirte und Gärtner zu Pflanzenzüchtern und begannen durch Auslese aus den damals üblichen Pflanzenpopulationen oder Landrassen einzelne Individuen auszuwählen und so erste Sorten zu entwickeln. Einige der heute noch aktiven Züchtungsfirmen gehen auf diese Ursprünge zurück. Insbesondere in der Region um Quedlinburg und Halberstadt nahm diese Entwicklung Fahrt auf. Ihre Blumen- und Gemüseneuzüchtungen verkauften Firmen wie Sachs, Dippe und Mette bald in die ganze Welt.

In der Getreidezüchtung machte sich Wilhelm Rimpau (1842-1903) in Schlanstedt bei Halberstadt in dieser Zeit einen Namen. Er übertrug die wissenschaftlichen Erkenntnisse in die praktische Pflanzenzüchtung und stand dabei in engem Austausch mit den Forschenden seiner Zeit, hatte Briefkontakt mit Darwin und traf sich mit Hugo de Vries, einem der Wiederentdecker der Mendelschen Regeln. Rimpau war der erste, dem es gelang, mit der artübergreifenden Kreuzung zwischen Weizen (*Triticum aestivum*) und Roggen (*Secale cereale*) die Qualität des Weizens mit den Anspruchslosigkeit des Roggens zu kombinieren und dabei stabile und vor allem fertile Hybriden zu erzeugen. So schuf er eine neue Kulturpflanze, Triticale (\times Triticosecale). Rimpau klärte wichtige Grundlagen der Blütenmorphologie der europäischen Getreidearten auf und zeigte anhand der künstlichen Befruchtung von Weizen, dass auch bei Selbstbefruchtern Merkmale neu kombiniert werden können. Damit war er mit seinen Weizenkreuzungen ganz ähnlichen Gesetzmäßigkeiten der Vererbung von Merkmalen auf der Spur, wie Mendel sie beschrieb (Meinel, 2008). Rimpau gilt deshalb als Begründer der wissenschaftlichen Pflanzenzüchtung. Jedoch verstarb er, als gerade erst die von Mendel beschriebenen Vererbungsregeln ab 1900 wiederentdeckt und verstanden wurden und schaffte es nicht mehr, seine Erkenntnisse und die von Mendel in gemeinsamen Kontext zu bringen.

Im Jahr 1900 veröffentlichten Hugo de Vries (1848-1935), Carl Correns (1864-1933) und Erich von Tschermak (1871-1962) parallel ihre Arbeiten über die unabhängige Vererbung von Merkmalen in „Pflanzenbastarden“, die dabei beobachtete Aufspaltung entlang fester Verhältnisse von 3:1 und 1:2:1 und beriefen sich unter anderem auf die Ergebnisse von Mendel. In seiner Schrift „Mendel's Principles of Heridity: A Defence“ (Bateson, 1902) rehabilitierte der britische Genetiker William Bateson (1861-1926) Mendel letztlich und gab ihm die notwendige Bekanntheit im Kreise der Wissenschaft. Bateson ordnete Mendels Erkenntnisse außerdem in den größeren Zusammenhang ein, dass sie nicht nur für Hybridisierungen durch den Menschen gelten, sondern im Prinzip für alle sich sexuell reproduzierenden Organismen. Darüber hinaus prägte Bateson Begriffe wie „Allel“, „homozygot“ und „heterozygot“ und gab der Wissenschaft der

Vererbung ihren Namen: Genetik (Gayon, 2016). Als das Mendelsche Modell von unabhängigen Vererbungsfaktoren außerdem noch in die Chromosomentheorie integriert werden konnte, war die klassische Genetik als wissenschaftliche Disziplin etabliert (Schwarzbach et al., 2014; Gayon, 2016). Mendels später in die drei bekannten Uniformitätsregel, Spaltungsregel und Unabhängigkeitsregel zusammengefassten Erkenntnisse sind heute Standardlehrstoff im Biologieunterricht.

1.1.3. Grundlage von Evolution und Züchtung: Mutationen

Die beschriebenen Erkenntnisse wurden auch in der Pflanzenzüchtung praktisch genutzt. Unterschiedliche Eigenschaften konnten durch Kreuzung nun gezielt kombiniert und somit verbesserte Kulturpflanzen gezüchtet werden. Bis heute ist dies die Grundlage aller neuen Sorten. Allerdings ist die Kreuzungszucht auf die natürlich vorkommende Variabilität angewiesen. Grundlage dafür sind genetische Veränderungen: Mutationen. Diese können auf Genomebene stattfinden (z.B. Polyploidisierung), auf Chromosomenebene (z.B. Inversionen, Translokationen, Deletionen oder Duplikationen von ganzen Chromosomenabschnitten) oder auf Genebene (z.B. Deletionen, Insertionen oder Substitutionen einzelner oder weniger Basenpaare). Untersuchungen in *Arabidopsis* belegen über 200 spontane Basenmutationen und über 60 Deletionen oder Insertionen (InDels) pro Generation bzw. ca. 7×10^{-9} Mutationen pro Base pro Generation (Ossowski et al., 2010; Yang et al., 2015). Bezogen auf die 120 Millionen Basenpaare des *Arabidopsis*-Genoms sind das knapp zwei Mutationen pro eine Million Basenpaare und Generation. Auch wenn diese Zahlen aus Kreuzungsexperimenten und anschließenden Genomsequenzierungen beruhen, war bereits zu Beginn des 20. Jahrhunderts die Veränderlichkeit von Erbanlagen erkannt worden. Den Begriff „Mutation“ für diese spontanen, „stoßweisen“ Veränderungen von Organismen prägte Hugo de Vries mit seiner Monographie „Die Mutationstheorie – Versuche und Beobachtungen über die Entstehung von Arten im Pflanzenreich“ im Jahr 1901 (de Vries, 1901). Er stellte seine Theorie der plötzlichen Veränderung der erblichen „Elemente“ der damals vorherrschenden Selektionstheorie von Darwin gegenüber, wonach neue Arten kontinuierlich allein aus der Selektion vorhandener Arten durch ihre Umwelt hervorgehen. Hugo de Vries erkannte, dass das nicht allein auf Grundlage der üblichen Variation innerhalb einer Art möglich ist, sondern es zu sprunghaften Veränderungen („Mutationen“) kommen muss, damit eine neue Art daraus hervorgehen kann. Zwar liegt der Schwerpunkt seiner Arbeit bei der Entstehung der Arten in der Natur, doch erkennt de Vries auch gleich die Bedeutung für die Pflanzenzüchtung und geht dieser auch experimentell nach. Visionär schreibt er dann im Vorwort zu seinem Buch:

„Die Kenntniss der Gesetze des Mutirens wird voraussichtlich später einmal dazu führen, künstlich und willkürlich Mutationen hervorzurufen und so ganz neue Eigenschaften an Pflanzen und Thieren entstehen zu lassen. Und wie man durch das Selectionsverfahren veredelte, ertragsreichere und schönere Zuchtrassen heranbilden kann, so wird man vielleicht auch dereinst im Stande sein, durch die Beherrschung der Mutationen dauernd bessere Arten von Culturpflanzen und von Thieren hervorzubringen“.

Hugo de Vries (1848-1935)

Bereits rund 20 Jahre nach dieser Hypothese lieferte Emmy Stein (1879-1954) erste Beweise dafür. 1921 berichtete sie in einem Vortrag anhand von *Antirrhinum* darüber, dass ionisierende Strahlung Mutationen in Organismen induzieren kann (Stubbe, 1930; Schiemann, 1955). Ähnliche Arbeiten von Hermann Joseph Muller mit Röntgenstrahlung an *Drosophila* wurden 1946 mit dem Nobelpreis für Physiologie oder Medizin ausgezeichnet (Muller, 1930). Aufbauend auf diesen Erkenntnissen wurden ab den 1930er Jahren zunehmend Röntgen- und Gammastrahlen

eingesetzt, um von diversen Kulturpflanzen Mutantenkollektionen zu erzeugen und darin nach neuen, vorteilhaften Eigenschaften zu suchen, die für die weitere Züchtung genutzt werden konnten. Erfolgreich waren diese Züchtungsansätze beispielsweise in Getreide wie Hartweizen und Gerste. Der Umfang der so gezüchteten Sorten ist schwer abzuschätzen. Die Internationale Atomenergiebehörde IAEA führt eine Datenbank mit aktuell über 3000 Einträgen, vor allem von Reis, Gerste, Chrysantheme, Weizen, Soja und Mais (IAEA, 2022). Jedoch ist die Eintragung freiwillig und es wurde zudem nur in wenigen Fällen erfasst, welche nachfolgenden Sorten mit den Mutanten weitergezüchtet worden waren. Demnach dürfte die Zahl der Sorten mit induzierten Mutanten im Stammbaum noch deutlich höher sein, zumal zusätzlich zur Strahlenmutagenese auch chemische Mutagene wie Ethylmethansulfonat (EMS) eingesetzt werden, deren Produkte in der Datenbank der IAEA noch weniger erfasst sind.

Ein Beispiel für eine erfolgreiche Strahlenmutante ist die Braugerste „Diamant“. Sie ist das direkte Resultat einer Röntgenbestrahlung von Gerstenkörnern der Sorte „Valticky“ und wurde 1965 in der Tschechoslowakei angemeldet. Sie zeichnete sich besonders durch ihren kurzen Halm und damit verbundene hohe Erträge und Standfestigkeit aus (IAEA, 2022). Durch chemisch induzierte Mutagenese von „Diamant“ mittels EMS konnte 1967 unter 20.000 M₂-Nachkommen eine mehлтаuresistente Pflanze mit Chlorophylldefekt identifiziert werden (Schwarzbach, 1967; Nover & Schwarzbach, 1971). Die Mehлтаuresistenz und der Chlorophylldefekt segregierten unabhängig, sodass anschließend mit „SZ 5139 b“ eine normal grüne, mehлтаuresistente Pflanze selektiert werden konnte. Die resistenzvermittelnde Mutation stellte sich später als Funktionsverlust des *Mlo1*-Gens heraus. Dieses induzierte *mlo-9*-Allel gehört mit dem natürlich aufgetretenen *mlo-11*-Allel bis heute zu den wichtigsten Quellen für die dauerhafte Mehлтаuresistenz in Gerste (Schwarzbach, 1967; Kusch & Panstruga, 2017). Die Sorte „Alexis“ (Saatzucht Breun, 1986) vereinte die Kurzstrohigkeit von „Diamant“ und die Mehлтаuresistenz von „SZ 5139 b“ mit der außerordentlich hohen Brauqualität von „Trumpf“ (Hadmersleben, 1973, seinerseits selbst ein Nachfahre von „Diamant“) und wurde damit über viele Jahre zur Standardbraugerste in Europa (Landesanstalt für Landwirtschaft Bayern, 2022). Die moderne Genomforschung macht das Erbe der Mutagenesezüchtung im Pangenom der Gerste deutlich: Eine große Inversion von 5 Mb auf Chromosom 7H geht sehr wahrscheinlich auf die Strahlenbehandlung von „Valticky“ zurück, woraus „Diamant“ hervorging. Über „Trumpf“ und „Alexis“ ist „Diamant“ in den Stammbäumen der meisten europäischen Gerstensorten enthalten, sodass in vielen aktuellen Elitesorten dieselbe Inversion zu finden ist (Jayakodi et al., 2020).

Der Vorteil der induzierten Mutagenese ist, dass schnell eine sehr große genetische Variabilität erzeugt werden kann, ohne dass dafür konkretes Wissen über Gene notwendig ist, denen bestimmte Merkmale zugrundeliegen. Auch diese Form der Züchtung funktioniert noch allein anhand des Phänotyps. Doch genau das macht die Mutagenesezüchtung auch aufwendig: Da sowohl Strahlen- als auch chemisch induzierte Mutagenese völlig ungerichtet im gesamten Genom Mutationen auslösen, sind solche Veränderungen, die zu züchterisch wünschenswerten Eigenschaften führen, eher die Ausnahme als die Regel und müssen durch mehrere Generationen von Rückkreuzungen mühsam von den vielen nachteiligen Mutationen getrennt werden.

1.1.4. Biotechnologie in Pflanzenforschung und -züchtung

Parallel mit den Fortschritten der Genetik und dem Verständnis über Mutationen entwickelte sich ein zweites Fach, welches die Pflanzenzüchtung deutlich voranbringen sollte: Die Pflanzenbiotechnologie.

Im Februar 1902 veröffentlichte der österreichische Botaniker Gottlieb Haberlandt (1854-1945) die Ergebnisse seiner Versuche mit Zellkulturen der Purpurroten Taubnessel (*Lamium purpureum*) und der Dickstieligen Wasserhyazinthe (*Eichhornia crassipes*). Mehrere Tage lang kultivierte er Mesophyllzellen (Palisaden- und Schwammparenchym) aus Hochblättern der

1. Allgemeine Einleitung

Taubnessel in verschiedenen Nährlösungen, beobachtete ihr Wachstum unter dem Mikroskop und maß die Assimilation über Jodfärbungen der Stärke in Chloroplasten (Haberlandt, 1902). Ähnlich ging er mit der Wasserhyazinthe vor. Obwohl er in seinen Versuchen keine Zellteilungen der kultivierten Explantate beobachtete, schloss er aus damals bereits beschriebenen Versuchen mit tierischen Zellkulturen, dass sich auch die somatischen Zellen aus Pflanzen regenerieren lassen müssten. Er spricht in diesem Zusammenhang bereits von „Wuchsenzymen“, deren „stoffliche Reizung“ die Zellen wohl zur Anregung der Zellteilung bräuchten, aber die seine Kulturmedien noch nicht enthielten. Er postulierte:

„Ohne mich auf weitere Fragestellungen einzulassen, glaube ich zum Schlusse keine allzu kühne Prophezeiung auszusprechen, wenn ich auf die Möglichkeit hinweise, dass es auf diese Weise vielleicht gelingen wird, aus vegetativen Zellen künstliche Embryonen zu züchten.“

Gottlieb Haberlandt (1854 – 1945)

Haberlandt führte seine Versuche jedoch nicht weiter und widmete sich anderen Studien an Pflanzen. Seine Ideen inspirierten allerdings andere und so wurde bereits in den 1920er Jahren von erfolgreichen Zellkulturen von Wurzelspitzen verschiedener Pflanzenarten berichtet, in denen sich die kultivierten Zellen auch teilten. Anhand von Gerste wurden in dieser Zeit auch erste Embryonenkulturen durchgeführt (Thorpe, 2012). Bei Experimenten mit artübergreifenden Kreuzungen zwischen *Linum perenne* und *Linum anstriacum* beobachtete Friedrich Laibach (1885-1967), dass sich zwar Samen bildeten, die Embryonen darin aber deformiert und tot waren. Er isolierte deshalb nach der Kreuzung Embryonen aus unreifen Samen und kultivierte sie *in vitro* auf Baumwollwatte, die er mit einer Zuckerlösung tränkte. Unter diesen Bedingungen entwickelten sich die Embryonen weiter und reiften aus. Auf feuchtem Filterpapier keimten sie später und entwickelten sich zu ganzen Pflanzen, die ihrerseits blühten und fertil waren (Laibach, 1929). Dieses „*Embryo Rescue*“ wurde zu einer wichtigen Methode, um Pflanzen aus artübergreifenden Kreuzungen zu generieren, zum Beispiel in *Brassica*-Arten wie dem Raps (*Brassica napus*) (Kaneko & Bang, 2014).

Ab den 1940er Jahren erfuhr die pflanzliche Zellkultur einen deutlichen Schub. Die Entdeckung von Kokoswasser als hilfreichen Zusatz für die Kulturmedien verbesserte die Entwicklung der Explantate deutlich (Thorpe, 2012). Die Zellkultur wurde zu einem wichtigen Werkzeug für die Erforschung der Zellentwicklung und der Physiologie von Pflanzen. So entdeckten Skoog & Miller (1957) das Kinetin (ein Cytokinin) als Antagonist von Auxinen, welche bereits in den 1920er Jahren in Form von Indolelessigsäure entdeckt worden waren. Auch weitere Phytohormone wie Gibberellin und Ethylen wurden in Zellkulturen entdeckt und angewendet, um die Entwicklung der kultivierten Zellen zu steuern. Damit gelang es Vasil & Hildebrandt (1965), rund 60 Jahre nach Haberlandts nicht „allzu kühner Prophezeiung“ zum ersten Mal, aus einer somatischen Zelle wieder eine komplette Tabakpflanze zu regenerieren. Damit wurde die Zellkultur auch für die Praxis relevant. So können zum Beispiel über die Kultur von Sprossspitzenmeristemen klonal vermehrte Pflanzen virusfrei erhalten werden. Die Zellkultur kam somit in der Pflanzguterhaltung und Vermehrung, insbesondere von Zierpflanzen und Obstgehölzen, zunehmend zum Einsatz. Auch die Nutzung von somaklonaler Variation, also dem veränderten Phänotyp von in Zellkultur regenerierten Pflanzen, wurde züchterisch genutzt. Problematisch dabei war jedoch, dass die beobachteten Effekte teils auf epigenetischen Veränderungen beruhten und deshalb nicht erblich waren. Aber beispielsweise durch *In-vitro*-Mutagenese trug Zellkultur schon früh zur Entwicklung neuer Sorten bei (Thorpe, 2012). Besondere Bedeutung für die Pflanzenzüchtung bekam auch die Produktion von Doppelhaploiden durch Kultur von haploiden Zellen wie zum Beispiel Mikrosporen. Näheres dazu wird im folgenden Absatz (1.1.5) beschrieben.

Mit der Zellkultur eröffneten sich noch weitere Möglichkeiten, Pflanzenzüchtung und Molekularbiologie zu kombinieren. Seit den 1970er Jahren waren Restriktionsenzyme verfügbar,

mit denen DNA geschnitten und neu zusammengesetzt werden konnte (siehe dazu auch 1.1.6). Seit den 1980er Jahren wurde damit experimentiert, solche rekombinierten DNA-Fragmente in Protoplasten zu übertragen, beispielsweise mithilfe von Polyethylenglycol (PEG), Elektroporation oder Mikroinjektion. Da sich jedoch nur wenige Pflanzen aus Protoplasten regenerieren lassen, war dies wenig praxistauglich. Es brauchte also einen geeigneten Vektor, der DNA-Abschnitte in Pflanzenzellen übertragen kann, aus denen anschließend mittels Zellkultur wieder ganze Pflanzen regeneriert werden können.

Schon 1941 berichteten Philip White und Armin Braun, dass sich an Sonnenblumen, die mit *Agrobacterium tumefaciens* infiziert waren, auch fernab der Infektionsstelle Tumore bildeten, die aber frei von Bakterien waren. Bemerkenswert war, dass Zellen aus diesen Tumoren *in vitro* ohne Auxine kultiviert werden konnten. Sie postulierten ein „Tumor-induzierendes Prinzip“, welches die Bakterien auf die Pflanzenzellen übertragen, die das Tumorstadium dann auch ohne die Anwesenheit der Bakterien beibehalten (White & Braun, 1941). Es dauerte jedoch noch einige Jahrzehnte, bis dieses „Prinzip“ in den 1970er Jahren verstanden wurde: Die Forschungsgruppe um den belgischen Molekularbiologen Jozef Stefaan (Jeff) Schell (1935-2003) identifizierte 1974 besondere Plasmide in pathogenen *Agrobacterium*-Stämmen, die den nicht-pathogenen Stämmen fehlten (Zaenen et al., 1974). Auch wenn sie noch nicht wussten, was auf diesen Plasmiden codiert war, womit sie die Tumore in Pflanzen auslösten, waren sie den Grundlagen der Agrobakterien-Infektion so einen wichtigen Schritt nähergekommen. Anschließend wurden die weiteren Details erforscht: Teile des Tumor-induzierenden Plasmids (Ti-Plasmid), die Transfer-DNA (T-DNA), enthalten Tumor-induzierende Gene und solche für die Opine-Biosynthese in den Pflanzenzellen. Das Agrobakterium nutzt die Produkte dieser Gene als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle, nachdem es die T-DNA in die Pflanzenzellen übertragen hat und die Gene der T-DNA dort translatiert worden sind. Nachdem dieser Mechanismus verstanden war, lag die Idee nahe, das Ti-Plasmid als „Genfähre“ zu nutzen, um gezielt DNA in Pflanzenzellen zu übertragen. 1980 publizierte das Team um Schell die erfolgreiche Insertion des bakteriellen Transposons Tn7 in das Ti-Plasmid eines pathogenen Agrobakterienstamms, welches dieser dann auf Pflanzenzellen von Sonnenblume, Tabak, Kartoffel und Kalanchoe übertragen konnte (Hernalsteens et al., 1980). Durch weitere Modifikationen am Ti-Plasmid, insbesondere durch geeignete Promotoren konnten die übertragenen, „fremden“ Gene in den Pflanzenzellen auch exprimiert werden (Herrera-Estrella et al., 1983). Damit war der zweite große Durchbruch der Pflanzenbiotechnologie gelungen: Mittels Gentransfer konnten somit Gene aus verschiedensten Organismen in Pflanzen übertragen werden.

Diese neuen Möglichkeiten stellten die Getreidebiotechnologie aber noch vor große Herausforderungen. In den 1980er Jahren galt Getreide noch als kaum transformierbar (Kumlehn & Hensel, 2009; Hensel, 2020). *Agrobacterium* befällt eigentlich nur dikotyle Pflanzen und Getreide ist kein Wirt dieses Pflanzenpathogens. Deshalb wurde hier zunächst auf die Biolistik gesetzt, also den Gentransfer mittels Goldpartikeln, die mit der zu übertragenden DNA beschichtet und dann mit einer „Gen-Kanone“ in pflanzliche Explantate geschossen werden (Becker et al., 1994; Wan & Lemaux, 1994). Die Effizienzen dabei waren jedoch gering und ein bedeutender Nachteil dieser Methode liegt darin, dass es relativ häufig zu multiplen Integrationen des Transgens kommt, was dessen Vererbung komplizierter macht und außerdem zur epigenetischen Abschaltung des Transgens durch *Gene Silencing* führen kann.

Durch die Entwicklung hypervirulenter Agrobakterienstämme wie LBA4404/ pSB1 oder AGL1 und den Einsatz geeigneter Explantate gelang es Mitte der 1990er Jahre, auch Weizen und Gerste mit Agrobakterien zu transformieren (Komari et al., 1996; Cheng et al., 1997; Tingay et al., 1997). Speziell für Gerste konnte die Effizienz der Agrobakterien-vermittelten Transformation weiter gesteigert werden, sodass diese über den Raten der biolistischen Transformation liegt. Besonders effizient gelingt der Agrobakterien-vermittelte DNA-Transfer mit unreifen Embryonen der Sommergerste „Golden Promise“ (Hensel et al., 2008), der auch im Rahmen dieser Arbeit zum

Einsatz kam. Darüber hinaus existiert für die Wintergerste „Igri“ eine weitere Transformationsmethode, die embryogene Pollenkulturen als Ausgangsmaterial für die Agrobakterien-vermittelte Transformation nutzt (Kumlehn et al., 2006). Der Vorteil kallusbildender Pollen liegt dabei in der Haploidie der Zielzellen. Kommt es erst nach der Integration der T-DNA zur spontanen oder chemisch induzierten Verdopplung des Genoms, sind die resultierenden doppelhaploiden Pflanzen homozygot transgen (siehe dazu auch 1.1.5).

In der Forschung und in der Züchtung entwickelten sich Zellkultur und Gentransfer zu grundlegenden Methoden, mit deren Hilfe verschiedenste wissenschaftliche und züchterische Ziele erreicht werden können. *In-vitro*-Erhaltung und -Vermehrung sind heute Standardverfahren der Zierpflanzenproduktion. Transgene Pflanzen werden in der landwirtschaftlichen Praxis mittlerweile auf über 190 Millionen Hektar Ackerfläche in 26 Staaten weltweit angebaut. Den größten Anteil haben daran Soja, Mais und Baumwolle. Bei den Zuchtzielen dominieren Insektenresistenz (v.a. über Expression der Cry-Gene aus *Bacillus thuringiensis* (Bt-Toxine)) und Herbizidtoleranzen. Insgesamt sind weltweit über 400 gentechnisch erzeugte *Events* in verschiedenen Pflanzenarten zugelassen (ISAAA, 2022).

1.1.5. Mutationen nutzbar machen: DHs, MAS und TILLING

Wie unter 1.1.3 beschrieben, sind nach induzierter Mutagenese oder weiten Kreuzungen mit wilden Vorfahren oder verwandten Arten von Kulturpflanzen zahlreiche Rückkreuzungen nötig, um den Anteil nachteiliger Allele zu reduzieren. Um die Zahl der Rückkreuzungsschritte zu verringern, sind Doppelhaploide (DHs) hilfreich. Dabei handelt es sich um Pflanzen, die aus Gewebe mit haploidem (1n) Chromosomensatz regenerieren und spontan oder chemisch induziert (bspw. mit Colchizin) den Chromosomensatz verdoppeln (2n) und damit 100 % homozygot sind (Seguí-Simarro et al., 2021). In der Pflanzenforschung und -Züchtung werden induzierte DHs genutzt, die entweder über Kreuzungen mit DH-Inducerlinien oder durch *In-vitro*-Kultur von haploiden Zellen produziert werden (siehe auch 1.1.4 oder detailliert zusammengestellt von Dunwell (2010)). Meist werden dafür Mikrosporen als Ausgangsmaterial genutzt, die nach der meiotischen Reduktionsteilung aus der Pollenmutterzelle hervorgehen und das erste Stadium der Pollenentwicklung repräsentieren. Im frühen Stadium werden sie für die *In-vitro*-Kultur isoliert und dann auf Nährmedien kultiviert. Üblicherweise entsteht zunächst Kallusgewebe, aus dem dann durch Embryogenese eine doppelhaploide Pflanze regeneriert wird. Dies wurde erstmals 1965 erfolgreich beschrieben und seither für zahlreiche Kulturpflanzen etabliert. Vor allem in Kulturen, wo reinerbige Linien für die Hybridzüchtung (bspw. Mais) benötigt oder direkt Liniensorten vermarktet werden (bspw. Gerste), werden DHs in Züchtungsprogrammen eingesetzt, um nach Kreuzungen oder Mutagenese mit weniger Generationen als durch Selbstung zu reinerbigen Linien zu gelangen. Die durch Kreuzung, induzierte Mutagenese oder gentechnische Veränderung neu geschaffene Biodiversität wird einer meiotischen Rekombination unterzogen und dann in Populationen genetisch fixierter (doppelhaploider) Individuen manifestiert (Guha & Maheshwari, 1964; Ho & Jones, 1980; Dunwell, 2010; Tuvevsson et al., 2021), siehe dazu auch Abbildung 1-2.

Bei der Selektion der so verbesserten Genotypen nach induzierter Mutagenese oder nach Kreuzungen, sind molekulare Marker besonders hilfreich. Sie erlauben es, Eigenschaften mit genetischen Mustern zu assoziieren und so nach (Rück-) Kreuzungen in Nachkommenschaften schon im Keimlingsstadium auf eine gewünschte Eigenschaft zu selektieren. So konnte der Selektionsaufwand seit den 1990er Jahren deutlich reduziert und Züchtung beschleunigt werden (Hasan et al., 2021; Thudi et al., 2021). Die *Marker-assisted Selection* (MAS) eignet sich vor allem für monogen vererbte Eigenschaften, die schwierig oder nur sehr aufwendig zu phänotypisieren sind oder für quantitative Eigenschaften, die von mehreren Loci (QTL, *Quantitative Trait Loci*) vererbt werden. Ein Beispiel für eine sehr erfolgreiche Nutzung molekularer Marker in

1. Allgemeine Einleitung

Kombination mit Doppelhaploiden war das Einkreuzen der *rym4*- und *rym5*-Resistenzallele gegen die Gelbmosaikvirose in Wintergerste (Miedaner & Korzun, 2012), wovon im Folgenden (siehe 1.2.4) noch ausführlicher die Rede sein wird. Die resistenzvermittelnden Allele wurden aus der kroatischen Landrasse „Ragusa“ (*rym4*) und dem Genotyp „Resistant Ym No. 1“ (*rym5*) mittels Doppelhaploidentechnik und molekularer Marker in Europäische Wintergerste eingekreuzt (Ordon et al., 1999). Die Marker-basierte Selektion erlaubt es, mit weniger Aufwand mehr Pflanzen zu untersuchen und so auch schneller zum Züchterfolg zu kommen (siehe Abbildung 1-2). Im Vergleich zu den bisher genannten Züchtungsmethoden basiert die Selektion hierbei nicht mehr (allein) auf dem Phänotyp, sondern es sind auch Informationen über den dahinterstehenden Genotyp notwendig. Allerdings genügt es, wenn ein molekularer Marker zuverlässig mit einem Phänotyp korreliert, ohne dass das dafür verantwortliche Gen selbst bekannt sein muss. Genetische Marker werden beim *Map-based Cloning* aber auch genutzt, um mit Kartierungspopulationen den Locus, in dem das für die gewünschte Eigenschaft codierende Gen vorhanden ist, immer weiter einzugrenzen und so letztlich auch das verantwortliche Gen selbst zu identifizieren. Diesen vorwärtsgenetischen (*forward Genetics*) Ansätzen, die über die Marker und die generierten Kreuzungspopulationen der Züchtung unmittelbar zugutekommen können, steht der umgekehrte Weg: Ein Gen ist bekannt und seine Funktion soll untersucht werden. Hier läuft die Untersuchung rückwärts (*reverse Genetics*), geht also nicht vom Phänotyp zum Genotyp, sondern umgekehrt vom Gen aus.

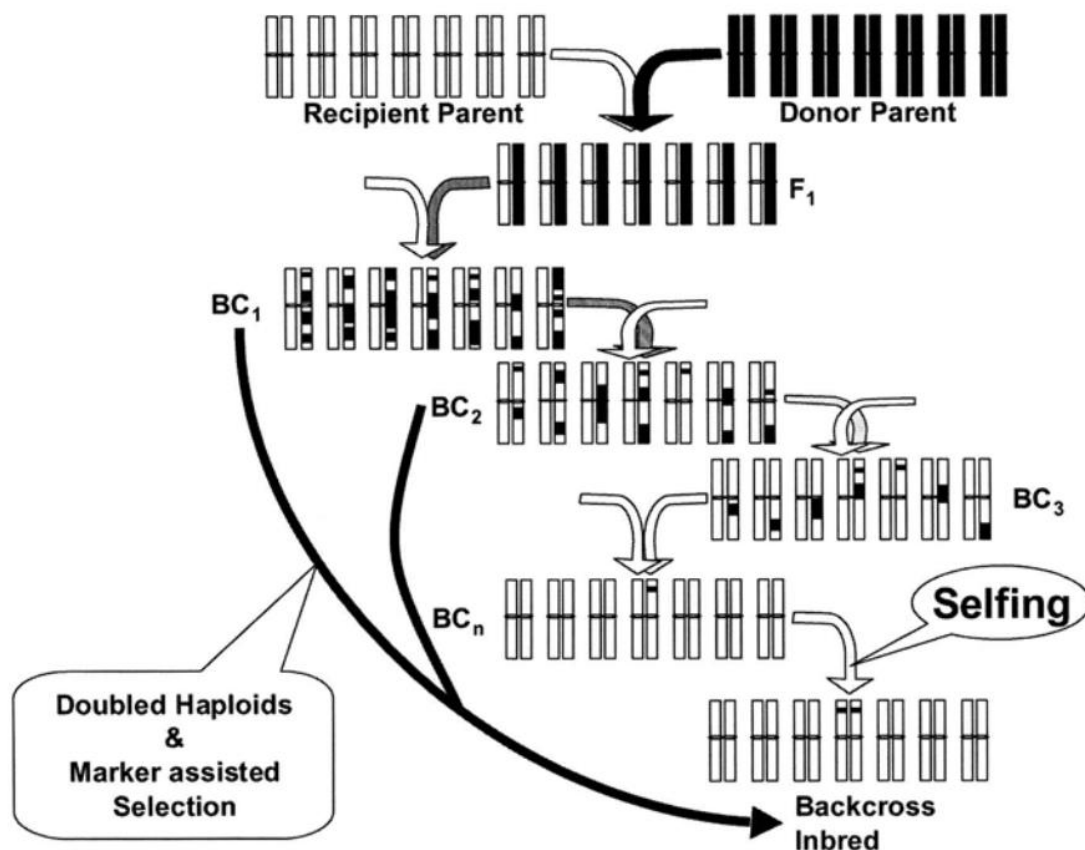


Abbildung 1-2: Schema zu Doppelhaploiden und Marker-gestützter Selektion nach Kreuzung

Die Empfängerlinie (zum Beispiel Elitesorte) wird mit der Donorlinie (zum Beispiel Landrasse) gekreuzt. Die F_1 besteht je zu 50 % aus den Allelen der Eltern. Durch Rückkreuzungen (*Backcrosses*, BC) wird der genetische Anteil der Donorlinie immer weiter reduziert. Dabei muss auf die wünschenswerte Eigenschaft (phänotypisch) selektiert werden. Nach mehreren Generationen (BC_n) erfolgt eine Selbstung, um zu einer homozygoten Inzuchtlinie mit dem wünschenswerten Allel der Donorlinie zu gelangen. Mittels Doppelhaploiden und Marker-gestützter Selektion (genotypisch) kann diese Prozedur deutlich verkürzt werden. Abbildung aus Thomas et al. (2003).

Im Zusammenhang mit induzierter Mutagenese ermöglichte das TILLING (*Targeting Induced Local Lesions IN Genomes*) ab den 2000er Jahren deutliche Fortschritte (McCallum et al., 2000): Saatgut einer Pflanze wird dabei zunächst mit Ethylmethansulfonat (EMS) behandelt. Diese Chemikalie wirkt alkylierend auf DNA und führt so zu G/C-zu-A/T-Substitutionen. Mittels PCR werden dann in der M₂-Mutantenpopulation Teile des Kandidatengens amplifiziert und ursprünglich mittels denaturierender HPLC, heute vor allem über Sequenzierungen solche Individuen ausgewählt, die eine gewünschte Mutation in diesem Gen tragen. Kommt es dadurch zu einem Funktionsverlust des Gens, beispielsweise durch die Entstehung eines vorzeitigen Stopp-Codons, können mit solchen *Knockout*-Linien Untersuchungen zur Genfunktion durchgeführt werden (Colbert et al., 2001; Till et al., 2018). Für Forschungszwecke, wurden so ganze TILLING-Populationen erstellt, die als Ressource für genetische Untersuchungen zur Verfügung stehen. So wurde für Gerste beispielsweise eine solche Population aus über 10.000 M₂-Mutanten durch EMS-Mutagenese der Braugerste „Barke“, seinerseits als Nachfahre von „Alexis“ bereits ein Produkt der strahleninduzierten Mutagenese, für revers-genetische Untersuchungen hergestellt (Gottwald et al., 2009). Die vererbare Mutationsrate betrug hierbei in codierenden Genombereichen ungefähr zwei Mutationen pro eine Million Basenpaare. Schreiber et al. (2019) beschreiben für ihre TILLING-Population der Sommergerste „Golden Promise“ sogar über sechs Mutationen pro eine Million Basenpaare. Solche Kollektionen wurden und werden vor allem für Forschungszwecke genutzt, während in der praktischen Züchtung der vorwärtsgenetische Ansatz, also die EMS-induzierte Mutagenese mit anschließender Phänotypisierung im Feld, überwiegt. Alle bisher genannten Mutageneseansätze sind dabei gänzlich ungerichtet. Sie induzieren Mutationen zufällig im gesamten Genom und die genetischen Veränderungen, die zu vorteilhaften Eigenschaften führen, müssen hinterher selektiert und von nachteiligen Mutationen durch Kreuzung getrennt werden. Trotz mehrerer Generationen von Rückkreuzungen bleiben jedoch immer Hintergrundmutationen in unterschiedlich hohen Anteilen zurück, die sich mitunter auch negativ auf die Leistungsfähigkeit der Pflanzen auswirken können (Jung & Till, 2021).

1.1.6. Zielen und Treffen: Genomeditierung in der Pflanzenzüchtung

Die ungerichtete Mutagenese war und ist sowohl für die Forschung als auch für die Züchtung von großem Nutzen. Jedoch ist die Anwendung für viele Fragestellungen wegen der genannten Nachteile unpraktisch. Seit den 1970er Jahren wurde deswegen nach Möglichkeiten gesucht, DNA-Doppelstrangbrüche gezielt zu induzieren, um so ausschließlich gewünschte Genbereiche zu mutieren. Zunächst wurde dabei vor allem *in vitro* gearbeitet, um mit Restriktionsenzymen aus Mikroorganismen Plasmid-DNA zu schneiden und dadurch mutieren zu lassen (Shortle et al., 1982). In eukaryotischen Zellsystemen wurden solche Ansätze außerdem genutzt, um DNA-Reparaturmechanismen, wie sie auch infolge ionisierender Bestrahlung aktiv werden, zu untersuchen (Rudin et al., 1989; Lutze et al., 1993).

Anfang der 1990er Jahre wurden Forschende auf die Endonuklease I-SceI aufmerksam, die in den Mitochondrien der Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) identifiziert wurde. I-SceI erkennt eine 18-bp-DNA-Sequenz, induziert dort einen Doppelstrangbruch und hinterlässt dabei einzelsträngige 4-bp-Überhänge am 3'-Ende des DNA-Strangs (Plessis et al., 1992). Der Vorteil gegenüber den meist bakteriellen Restriktionsenzymen war die seltenere Erkennungssequenz, sodass nur an sehr wenigen Zielsequenzen eines ganzen Genoms ein DNA-Doppelstrangbruch induziert werden kann (Chandrasegaran & Carroll, 2016). Durch Übertragung dieser Endonuklease in Modelorganismen konnte die DNA-Reparatur nach der Induktion des Doppelstrangbruchs an bekannter Position im Genom untersucht werden (Rouet et al., 1994). Nachteilig war dabei jedoch, dass die Erkennungssequenz selbst nicht flexibel war und, wenn sie im Zielorganismus nicht vorhanden war, erst durch Gentransfer eingebracht werden musste (Puchta et al., 1993).

1. Allgemeine Einleitung

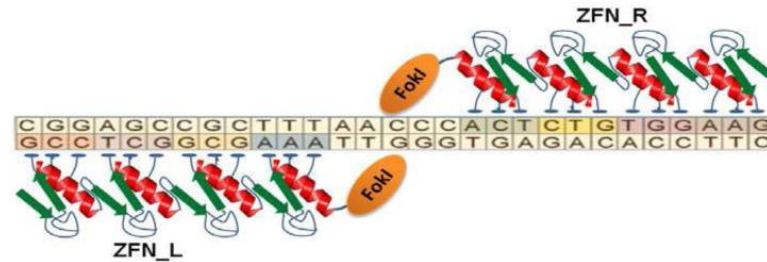


Abbildung 1-3: Zinkfinger-Nukleasen (ZFNs)

Schematische Darstellung eines ZFN-Paares. Je ein Zinkfinger-Protein bindet strangauf- und strangabwärts der Zielsequenz spezifisch an die DNA durch Interaktion jeweils einer Zinkfingerdomäne mit 3 DNA-Basen. Durch Fusion mit jeweils einer FokI-Nukleasedomäne wird die DNA zwischen den beiden ZFNs geschnitten. Abbildung aus Chandrasegaran & Carroll (2016).

Deshalb wurde intensiv daran gearbeitet, programmierbare, sequenzspezifische Endonukleasen zu entwickeln, die gezielt jede gewünschte DNA-Sequenz durchschneiden können. Eine Idee dafür war es, die aus Transkriptionsfaktoren bekannten Zinkfinger-Proteine (ZF) zu nutzen. Die ZF-Domänen binden spezifische DNA-Triplets (Miller et al., 1985; Pavletich & Pabo, 1991). Durch Kombination der unterschiedlichen spezifischen Domänen konnte so die gewünschte Zielsequenz angesteuert werden. Durch Fusion mit der FokI-Nuklease entstand erstmals eine programmierbare Genschere – die Zinkfinger-Nukleasen (ZFNs) – mit der an vorhersagbarer Position im Genom eines Organismus DNA-Doppelstrangbrüche und damit infolge fehlerhafter Reparatur Mutationen induziert werden konnten (Li et al., 1992; Kim et al., 1996), siehe Abbildung 1-3. Zwar wurden die ZFNs in vielen Organismen eingesetzt, doch aufgrund der komplizierten Programmierung mit den Zinkfinger-Modulen blieb der praktische Nutzen begrenzt (Chandrasegaran & Carroll, 2016).

Die Entwicklung einer weiteren programmierbaren Endonuklease hatte ihren Ursprung in der Pflanzenforschung. Pflanzenpathogene Bakterien der Gattung *Xanthomonas* geben bei Befall ihrer Wirtspflanze Proteine, sogenannte „*Transcription-Activator like Effectors* (TALEs)“ in die Zelle ab, die spezifisch an Promoterbereiche von Genen der Wirtspflanze binden und deren Expression heraufregulieren (Bonas et al., 1989; Kay et al., 2007). Ähnlich wie ZFs binden auch die TALEs spezifisch über Protein-DNA-Interaktion an die Zielsequenz. Wie die Gruppe um Ulla Bonas und Jens Boch 2009 parallel mit Matthew Moscou und Adam Bogdanove entschlüsseln konnte, sind zwei variable Aminosäuren in den 33-35 Aminosäure langen *Repeats* der TALEs für die

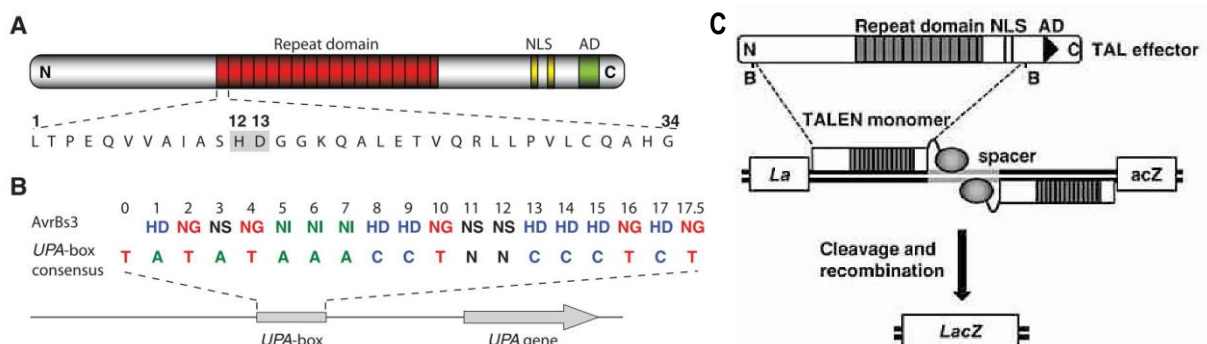


Abbildung 1-4: Modell des TALE-Codes und Fusion mit Nuklease zu sequenzspezifischen TALENs

A: Modell des Transcription-activator like effector (TALE) AvrBs3 aus *Xanthomonas* mit Aminosäuresequenz eines der konservierten Repeats (1-34). Die variablen Aminosäuren 12 und 13 sind grau hinterlegt. **B:** Variable Aminosäurepaare des TALE AvrBs3 sequenzspezifisch für das UPA-Gen der Wirtspflanze. Abbildung aus Boch et al. (2009). **C:** TALE-Nuklease (TALEN)-Paar bestehend aus zwei TALEs jeweils ober- und unterhalb der Zielsequenz und fusioniert mit je einer FokI-Nukleasedomäne zur sequenzspezifischen Induktion eines DNA-Doppelstrangbruchs, hier zur Rekonstitution eines LacZ-Gens. Abbildung aus Christian et al. (2010).

1. Allgemeine Einleitung

Basenspezifität verantwortlich (siehe Abbildung 1-4A und 1-4B). Mit dem Wissen um diesen Code lassen sich TALEs *in vitro* programmieren, um nach dem Transfer in die Zielzellen an die gewünschte DNA-Sequenz zu binden (Boch et al., 2009; Moscou & Bogdanove, 2009). Das gleiche Prinzip der Fusion der ZFs mit der FokI-Nukleasedomäne wurde auch auf die TALEs angewandt und durch die Fusion entstanden die TALE-Nukleasen (TALENs) (Christian et al., 2010), siehe Abbildung 1-4C. Durch die individuelle Klonierung der TALENs für jede einzelne Base, lassen sich damit praktisch alle Zielsequenzen ansteuern. Anders als bei den ZFNs gibt es keine Limitationen durch die Tripletbindung. Die TALENs wurden bereits nach kurzer Zeit sowohl in der Pflanzen- als auch in der medizinischen Forschung eingesetzt und es sind bereits damit gezüchtete Pflanzen – z.B. eine Sojabohne mit verbesserter Ölqualität - auf dem Markt (Haun et al., 2014). Auch eine erfolgreiche Gentherapie mit TALENs gegen Leukämie wurde schon beschrieben (Qasim et al., 2017). Bei der Klonierung der TALENs ergaben sich allerdings Nachteile durch die hochrepetitiven Sequenzen, was viele Labore vor Probleme stellte.

Eine weitere revolutionäre Entwicklung für die gezielte Veränderung von Genomen nahm in der Grundlagenforschung der Mikrobiologie ihren Anfang (Ishino et al., 2018). Im Dezember 1987 publizierten Ishino et al. die Sequenz eines Gens im Phosphat-Stoffwechsel von *Escherichia coli*. Bei den Untersuchungen der vor- und nachgelagerten Sequenzbereiche stießen sie am Ende der Terminatorregion auf eine auffällige Abfolge kurzer, palindromischer, sich wiederholender DNA-Sequenzen. Deren Funktion blieb aber noch bis in die 2000er Jahre unklar. In der Zwischenzeit wurden die besonderen Sequenzmuster in zahlreichen weiteren Bakterien und Archaea gefunden. Nachdem es einige Verwirrung gab, weil diese sehr ähnlichen Muster in verschiedenen Prokaryoten unterschiedliche Bezeichnungen erhielten (z.B. SRSRs, LCTRs oder SPIDRs), versuchte 2002 die Arbeitsgruppe von Ruud Jansen in enger Abstimmung mit Francisco J.M. Mojica, einen einheitlichen Namen einzuführen. Um die bis dahin bekannten Eigenschaften zusammenzufassen, entwickelten sie das Akronym aus „*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*“, kurz „CRISPR“ (Jansen et al., 2002). Parallel dazu wurden mehrere

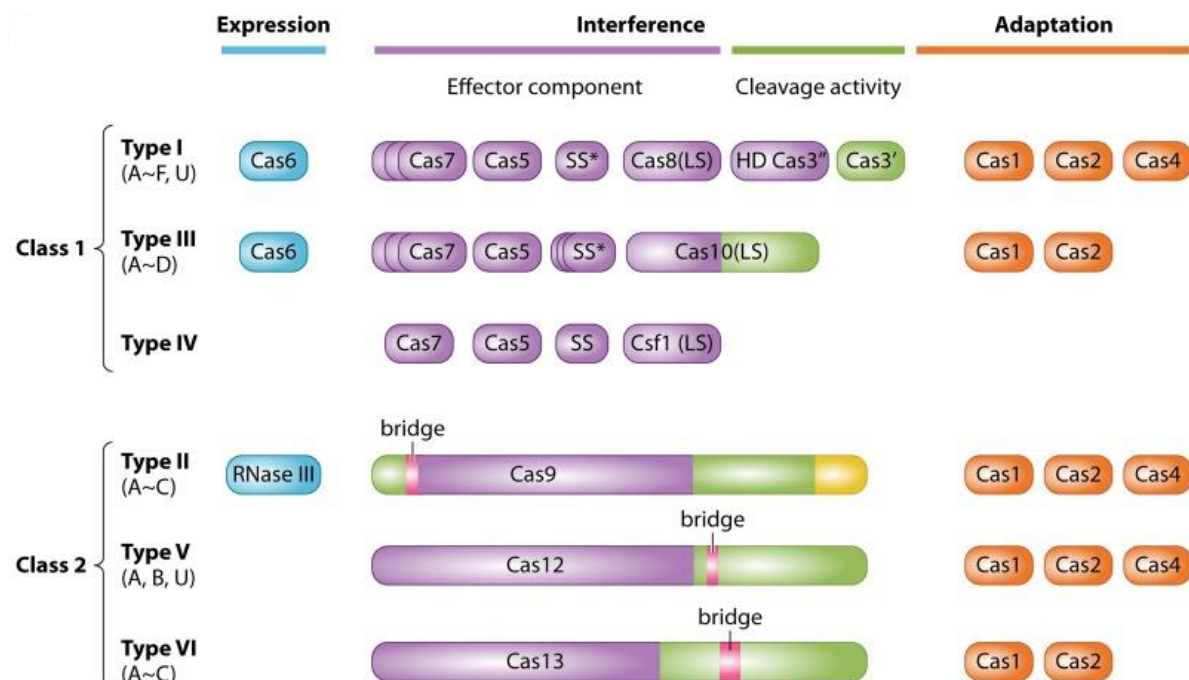


Abbildung 1-5: Klassen und Typen des prokaryotischen CRISPR-Cas Immunsystems

Die prokaryotischen CRISPR-Cas-Systeme werden in zwei Klassen eingeteilt, die sich vor allem durch die Zahl der Effektorkomponenten, die für die Interferenz mit dem Erbgut der Bakteriophagen verantwortlich sind, unterscheiden. Innerhalb der Klassen werden anhand der unterschiedlichen Komponenten verschiedenen Typen unterschieden. In der Biotechnologie spielen vor allem die Typ II (Cas9) und Typ V (Cas12) eine Rolle. Abbildung aus Ishino et al. (2018)

1. Allgemeine Einleitung

proteincodierende Gene gefunden, die stets mit den CRISPR-Loci gemeinsam auftraten und deshalb „*CRISPR-associated – Cas*“ genannt wurden (Jansen et al., 2002). Da die CRISPR-Loci bei den Prokaryoten hoch konserviert waren, ging man bereits von einer relevanten biologischen Funktion aus, konnte aber noch nicht abschätzen, welche es sein sollte. Der Nebel lichtete sich langsam, als 2005 drei Forschungsgruppen, darunter auch jene von Mojica, parallel berichteten, dass die *Spacer*-Sequenzen aus Bakteriophagen stammen und Bakterienstämme nicht von solchen Bakteriophagen befallen werden können, deren „Sequenzschnipsel“ sie in ihrem CRISPR-Locus tragen (Bolotin et al., 2005; Mojica et al., 2005; Pourcel et al., 2005). Dies war der erste starke Hinweis darauf, dass es sich bei „CRISPR“ um ein adaptives Immunsystem von Prokaryoten handelte. Zunächst wurde von einem System vergleichbar mit der eukaryotischen RNA-Interferenz ausgegangen. Den experimentellen Beleg für die Immunsystem-Theorie lieferte Forschung, die von der Lebensmittelindustrie betrieben wurde: In der Molkereibranche wurden Stämme von *Streptococcus thermophilus* genutzt, die anfällig für Infektionen mit Bakteriophagen waren und andere, die resistent waren. Bei der Forschung an der Ursache dafür, belegten Barrangou et al. (2007) experimentell, dass Bakterien nach Infektion mit Bakteriophagen Teile von deren Erbgut als *Spacer* in den CRISPR-Locus integrieren und damit eine Resistenz gegen den jeweiligen Phagen aufbauen. Außerdem konnten sie das Resistenzprofil der Bakterien ändern, in dem sie *in vitro* *Spacer* hinzufügten oder entfernten. Weitere Forschungsarbeiten fanden ein immer größeres Netzwerk von Cas-Proteinen, die mit den in den CRISPR-Loci codierten RNAs interagierten. Heute werden im prokaryotischen CRISPR-Cas-System zwei Klassen mit insgesamt sechs Typen und einer Vielzahl von Cas-Proteinen unterschieden (siehe Abbildung 1-5).

Bei der Erforschung des CRISPR-Cas-Systems stach früh Cas9 hervor, ein Enzym das mit den durch den CRISPR-Locus codierten RNAs (crRNAs) interagiert. Die Arbeitsgruppen um Emmanuelle Charpentier und Jennifer Doudna sowie die Gruppe von Virginijus Siksnys konnten 2012 zeigen, dass Cas9 zusammen mit crRNAs in *In-vitro*-Versuchen die von der RNA codierten Zielsequenzen zerschneiden konnte (Gasiunas et al., 2012; Jinek et al., 2012), siehe Abbildung 1-6. Dieses System ließ sich außerdem über die Auswahl der RNA-Sequenz gezielt umprogrammieren. Mit dem Nachweis von Cong et al. (2013), dass die Cas9-Endonuklease sich mithilfe einer entsprechenden RNA auch an Ziele in eukaryotischen Genomen steuern ließ und dort DNA-Doppelstrangbrüche verursachte, war der Grundstein für dieses bahnbrechende Werkzeug der Genomeditierung

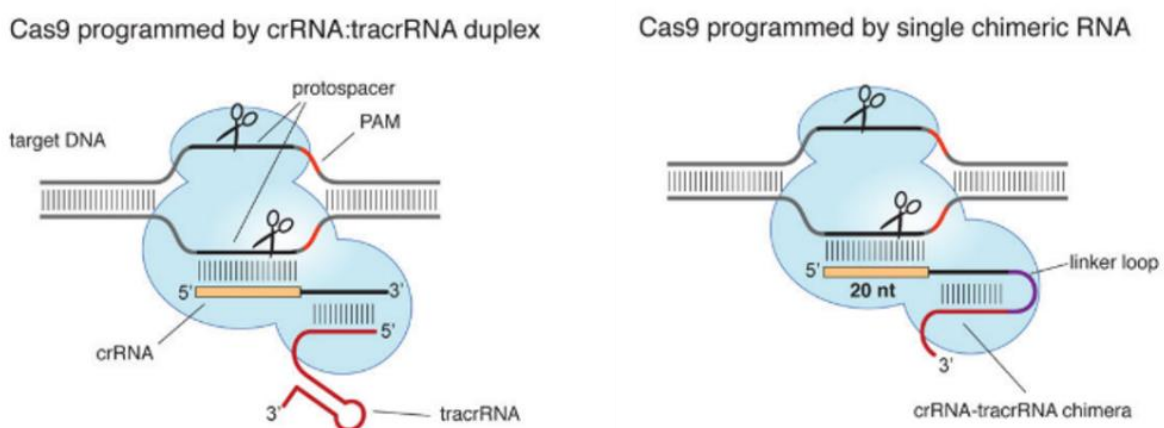


Abbildung 1-6: Cas9-induzierter DNA-Doppelstrangbruch

Die Zielsequenz von Cas9 wird neben dem *Protospacer-adjacent Motif* (PAM) durch den variablen, Basenkomplementären *Spacer*-Teil der crRNA festgelegt. Über die tracrRNA interagiert die crRNA mit der Cas9-Endonuklease, die die Zielsequenz durchtrennt (links). Durch Austausch des variablen *Spacer*-Teils lässt sich der Komplex auf andere Zielsequenzen *in vitro* umprogrammieren. Außerdem können crRNA und tracrRNA durch eine *Linker*-Sequenz in Form einer *single guide RNA* (sgRNA) als ein chimäres Molekül exprimiert werden. Abbildung aus Jinek et al. (2012).

1. Allgemeine Einleitung

gelegt. Von nun an entwickelte sich dieses Anwendungsfeld mit rasanter Geschwindigkeit und Cas-Endonukleasen wurden innerhalb weniger Jahre in allen Bereichen der molekularbiologischen Forschung genutzt, weiterentwickelt und so zu einem vielseitigen Werkzeugkasten, um Mutationen gezielt an vorhersagbaren Positionen im Genom praktisch aller Organismen auszulösen (Liu et al., 2022).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Cas9-Endonuklease genutzt, um Kandidatengene für Virusresistenzen in Gerste (siehe 1.2) gezielt zu verändern. Die Anwendung dieser Technologie in Getreide, insbesondere in Gerste und Weizen, sowie die technischen Besonderheiten bei der Auswahl der Zielmotive, der Konstruktion der Vektoren und dem Transfer in die Pflanzenzelle sowie neuere Entwicklungen für mehr Präzision werden in Kapitel 2 „Cas Endonuclease Technology — A Quantum Leap in the Advancement of Barley and Wheat Genetic Engineering“ ausführlich beschrieben.

1.2. Wenn die Gerste „Grippe“ hat

Gerste ist nach Weizen, Mais und Reis mit 157 Mio. t Produktion im Jahr 2020 die viertwichtigste Kulturpflanze der Welt (FAOSTAT, 2022). Sie findet Verwendung als Tierfutter, Nahrungs- und Genussmittel. Sie gehört zu den ältesten Kulturpflanzen, wurde bereits von den ersten Bauern kultiviert (siehe 1.1.1) und wird heute in praktisch allen Ackerbauregionen der Welt angebaut, wie Abbildung 1-7 zeigt. Gerste war über Jahrtausende hinweg das wichtigste Getreide vieler Kulturen im Nahen Osten und Europa und das Gerstenkorn diente seit der Antike als Grundlage für Längen- und Gewichtsmaße (Miedaner, 2014). Die erste vollständige Genomsequenz der Gerste wurde 2012 publiziert und mittlerweile ist ein Pangenom verfügbar (Mayer et al., 2012; Jayakodi et al., 2020).

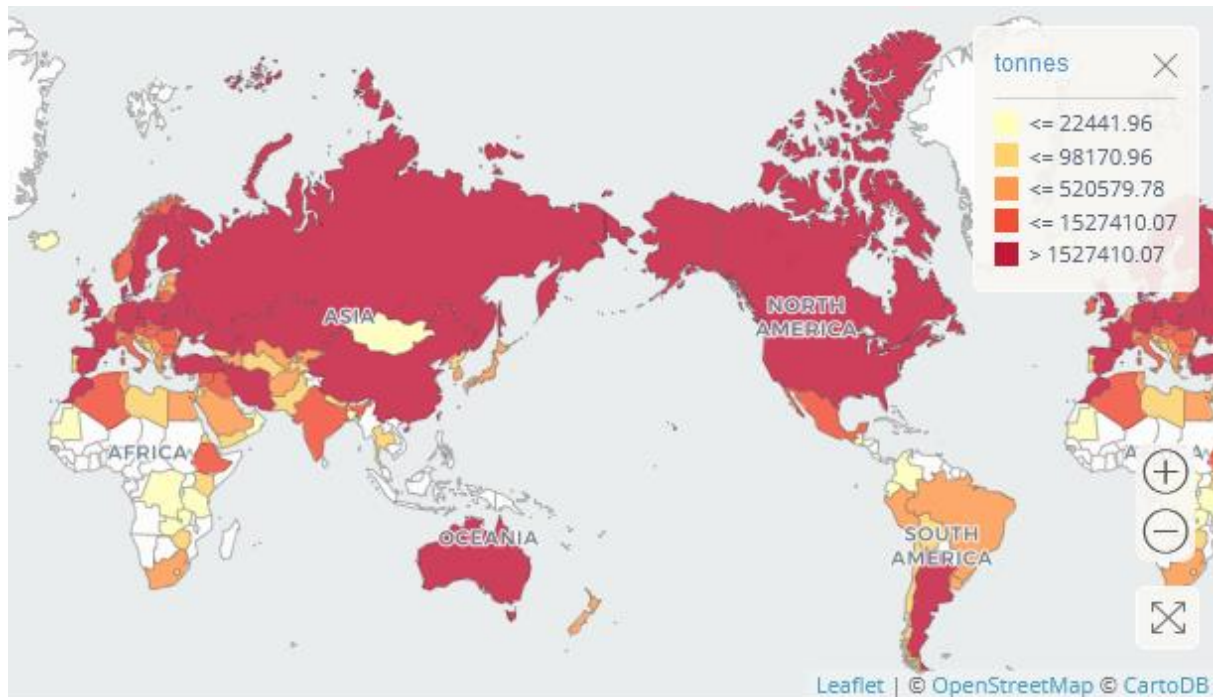


Abbildung 1-7: Karte der weltweiten Gerstenproduktion

Produktion von Gerste weltweit in Tonnen. Karte von FAOSTAT (2022).

Die Gerste hat eine Genomgröße von ca. 4,2 Gb und ist diploid ($2n = 2x = 14$ Chromosomen). In der Kulturpflanzenforschung ist Gerste neben ihrer eigenen wirtschaftlichen Bedeutung auch als Modellpflanze zur Erforschung der Triticeen-Getreide von Relevanz.

Der Anbau von Gerste erfolgt nahezu weltweit überall dort, wo Ackerbau möglich ist. In der gemäßigten Zone werden sowohl Wintergerste (vor allem zur Futternutzung) und Sommergerste (als Braugerste), in nördlicheren und südlicheren Klimazonen vor allem Sommergerste (auch zur menschlichen Ernährung) angebaut. Europa produziert etwa 60 % der weltweiten Ernte und Deutschland ist nach Russland auf Platz 2 der größten Gerste-Produzenten (FAOSTAT, 2022). Insekten spielen als Pathogene bei Gerste eine untergeordnete Rolle. Neben Pilzen sind es vor allem Viren wie das Gerstengelverzweigungsvirus oder Gerstengelbmosaikviren, die zu Ertrags- und Qualitätseinbußen im Anbau führen. Im folgenden Abschnitt wird deshalb kurz auf die Bedeutung von Pflanzenviren im Allgemeinen und insbesondere auf die Bymoviren der Getreide eingegangen. Zudem wird herausgestellt, welche Möglichkeiten die Resistenzzüchtung bietet, um die Gerste vor Virus-Infektionen zu schützen.

1. Allgemeine Einleitung

1.2.1. Pflanzenviren und ihre Bedeutung

Im Jahre 1886 beschrieb Adolph Mayer (1843-1942) erstmals, dass sich mit Blattsaft von Tabakpflanzen, die von der sich damals in den Niederlanden ausbreitenden Mosaikkrankheit befallen waren, gesunde Pflanzen infizieren ließen. Er ging zunächst noch davon aus, dass die Ursache dafür ein sehr kleines Bakterium sein müsse (Scholthof, 2004). 1889 beschrieb Martinus Beijerinck (1851-1931), dass es sich bei dem Erreger jedoch nicht um einen Mikroorganismus, sondern um andersartige „infektiöse Einheiten“ handelte. Er nannte sie „*Contagium vivum fluidum*“ (Scholthof et al., 2011). In den darauffolgenden Jahren wurde beschrieben, dass es sich beim Tabakmosaikvirus (TMV) um eine in einer Proteinhülle verpackte Nukleinsäure handelte, die Symptome wie Vergilbungen, Blattnekrosen und Wachstumsreduktionen bei Tabak verursacht. Diese Beobachtungen begründeten ein neues Forschungsfeld: die Virologie.

Tabelle 1-1: Familien und Genera der pflanzenpathogenen Viren und Beispiele

Die verschiedenen Gruppen pflanzeninfizierender Viren mit ihren jeweiligen Familien/ Genera sowie je ein Beispiel. ds: doppelsträngig, ss: einzelsträngig, +: positive Orientierung des RNA-Strangs, -: negative Orientierung des RNA-Strangs. Einteilung nach Drews et al. (2004)

Gruppe	Familie/ Genus	Beispiel
dsDNA-Viren	<i>Caulimoviridae</i>	<i>Cauliflower Mosaic Virus</i> (CaMV)
ssDNA-Viren	<i>Geminiviridae</i> , <i>Nanoviridae</i>	<i>Wheat Dwarf Virus</i> (WDV)
dsRNA-Viren	<i>Reoviridae</i> , <i>Partitiviridae</i>	<i>Rice Dwarf Virus</i> (RDV)
ss(+)RNA-Viren, isometrische Partikel	<i>Sequiviridae</i> , <i>Tombusviridae</i> , <i>Tymoviridae</i> , <i>Bromoviridae</i> , <i>Comoviridae</i> , <i>Luteoviridae</i> , <i>Umbravirus</i> , <i>Sobemovirus</i> , <i>Ourmiavirus</i>	<i>Barley Yellow Dwarf Virus</i> (BYDV)
ss(+)RNA-Viren, Stäbchen	<i>Tobamovirus</i> , <i>Tobravirus</i> , <i>Hordeivirus</i> , <i>Furovirus</i> , <i>Pecluvirus</i> , <i>Benyvirus</i>	<i>Soil-borne Wheat Mosaic Virus</i> (SBWMV)
ss(+)RNA-Viren, fädige Partikel	<i>Potyviridae</i> , <i>Clavoviridae</i> , <i>Foveavirus</i> , <i>Capillovirus</i> , <i>Trochovirus</i> , <i>Vitivirus</i> , <i>Allexivirus</i> , <i>Carlavirus</i> , <i>Potexvirus</i>	<i>Barley Yellow Mosaic Virus</i> (BaYMV)
ss(-)RNA-Viren	<i>Rhabdoviridae</i> , <i>Bunyaviridae</i> , <i>Tenuivirus</i> , <i>Ophiovirus</i>	<i>Eggplant Mottled Dwarf Virus</i> (EMDV)

Viren gehören neben Insekten und Pilzen zu den wichtigsten biotischen Schaderregern bei Pflanzen und haben in zahlreichen Kulturen wirtschaftliche Bedeutung. Die Einordnung von Viren erfolgt anhand der Organisation ihres Genoms, was sowohl als DNA oder RNA doppelsträngig (*double stranded*, ds) oder einzelsträngig (*single stranded*, ss) vorliegen kann. Bei den ssRNA-Viren wird außerdem unterschieden, ob die RNA direkt in der codierenden Orientierung (positiv, +) oder in der nichtcodierenden (negativ, -) Form vorliegt. Innerhalb dieser Ordnungen werden die Viren klassischerweise anhand der Struktur ihres Hüllproteins eingeteilt, das von Ikosaederförmig bis hin zu fädigen Stäbchen reichen kann (Drews et al., 2004). Mittlerweile wird die Einteilung vor allem anhand molekulargenetischer Verwandtschaftsuntersuchungen vorgenommen, wodurch sich einige historische Artbezeichnungen geändert haben (Adams et al., 2005). Die Namen von Viren leiten sich in der Regel von typischen Symptomen ab, die sie in ihren Wirten verursachen. Eine Übersicht über die Pflanzenviren gibt Tabelle 1-1.

1.2.2. Potyviridae: pflanzenpathogene RNA-Viren

Mit ungefähr 75 % repräsentieren ss(+)RNA-Viren den größten Anteil der pflanzenpathogenen Viren (Hillman, 1998). Innerhalb dieser Klasse stellen die *Potyviridae* mit 198 Arten die größte Familie dar (Drews et al., 2004). Allen Viren dieser Familie ist neben dem ss(+)RNA-Genom die Morphologie als flexibles Stäbchen von 680-900 nm Länge gemeinsam (Gibbs et al., 2020). Die Familie besteht aus sechs Genera, die sich molekulargenetisch sowie durch die Art der Übertragung unterscheiden. Das größte Genus bilden die Potyviren, die von Blattläusen

1. Allgemeine Einleitung

übertragen werden. Weitere Genera sind Ipomoviren (Übertragung durch Weiße Fliege), Macluraviren (Übertragung durch Blattläuse), Rymoviren (befallen nur Gräser, Übertragung durch *Abacarus* Milben), Tritimoviren (befallen nur Gräser, Übertragung durch *Aceria* Milben) und die Bymoviren (befallen nur Gräser, Übertragung durch bodenbürtigen Schleimpilz (*Plasmodiophorida*) *Polymyxa graminis*) (Adams et al., 2005; Revers & García, 2015). Das RNA-Genom der *Potyviridae* hat eine Größe von 8-11 kb und ist innerhalb der Familie hoch konserviert. Es codiert ein Polyprotein, das durch proteolytische Spaltung in zehn funktionale Proteine prozessiert wird (siehe Abbildung 1-8). Eine Ausnahme bilden dabei die Bymoviren, deren Genom aus zwei RNAs besteht, wobei RNA1 (8 Proteine) weitgehend homolog zum 3'-Teil der RNA der monopartiten Viren ist, während RNA2 weniger Ähnlichkeiten zu den codierenden Sequenzen der anderen Familienmitglieder hat (Adams et al., 2005; Gibbs et al., 2020).

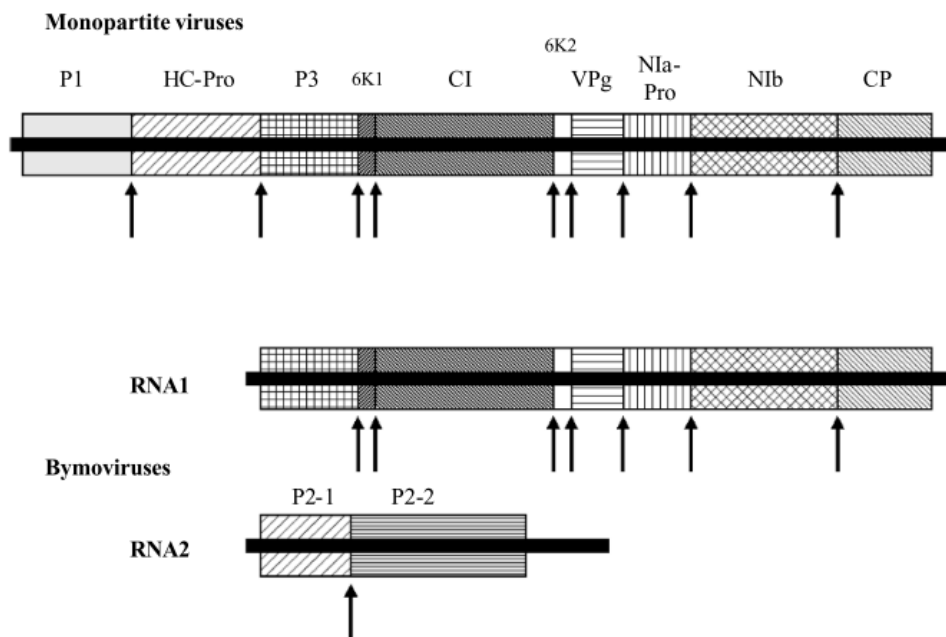


Abbildung 1-8: Genom der *Potyviridae*

Oben das Polyprotein monopartiter Potyviren mit den Spaltpositionen (schwarze Pfeile). Unten die von RNA1 und RNA2 codierten Polyproteine der bipartiten Bymoviren. P1: Protein 1, HC-Pro: *Helper Component Protein*, P3: Protein 3, 6K1: erstes 6K-Peptid, CI: *Cylindrical Inclusion Protein*, 6K2: zweites 6K-Peptid, VPg: *viral genome-linked protein*, NIa-Pro: *intranuclear crystal protein a*, NIb: *intranuclear crystal protein b*, CP: *coat protein*. Abbildung aus Adams et al. (2005)

Die potyvirale RNA trägt am 5'-Ende eine Kappe aus dem terminalen *Viral Genome-linked Protein* (VPg) gefolgt von einer nicht-codierenden Region (NCR). Daran anschließend ist das Polyprotein in einer konservierten Anordnung der einzelnen Proteine (siehe Abbildung 1-8) codiert. Am 3'-Ende trägt die RNA eine weitere nicht-codierende Region und abschließend ein Poly-A-Terminationssignal (Revers & García, 2015). Die codierten Proteine übernehmen zahlreiche Funktionen bei der Interaktion mit dem Wirt, der Vermehrung des Virus und seiner Übertragung durch den Vektor. Abbildung 1-9 gibt eine Übersicht über die jeweilige Funktion der Proteine. Hier soll dabei nur auf einzelne Beispiele eingegangen werden, die besonders relevant für die vorliegende Arbeit sind.

Helper Component (HCpro) hat eine Reihe von Funktionen für die Infektion und die Virusvermehrung. Es interagiert dabei mit mehreren Wirtsfaktoren wie dem Eukaryotischen Translations-Initiationsfaktor 4E (eIF4E) und seiner Isoform (eIF(iso)4E) oder Enzymen des *RNA Silencing* (Ala-Poikela et al., 2011; Valli et al., 2018). Außerdem stabilisiert es das virale *Coat Protein* (CP) (Ivanov et al., 2014; Revers & García, 2015).

1. Allgemeine Einleitung

Das *Cylindrical Inclusion Protein* (CI) hat ebenfalls mehrere Funktionen. So ist es als RNA-Helikase an der Virusvermehrung beteiligt sowie an der Virusausbreitung innerhalb der Pflanze von Zelle zu Zelle über die Plasmodesmata (Revers & García, 2015). Auch für CI konnte eine Interaktion mit eIF4E als Wirtsfaktor gezeigt werden (Tavert-Roudet et al., 2012).

Das VPg bindet an das 5'-Ende der viralen RNA. Durch seine flexible Struktur kann es mit einer Reihe von Wirtsfaktoren interagieren und sorgt so für die Translation des viralen Polyproteins. Hierbei ist die Interaktion mit eIF4E/ eIF(iso)4E von besonderer Bedeutung. Durch die Bindung von eIF4E/ eIF(iso)4E an die VPg-Kappe der viralen RNA kommt es zur Assemblierung des Translationskomplexes, wodurch letztlich das Ribosom an die virale RNA bindet und die codierte Proteinsequenz übersetzt (Jiang & Laliberté, 2011).

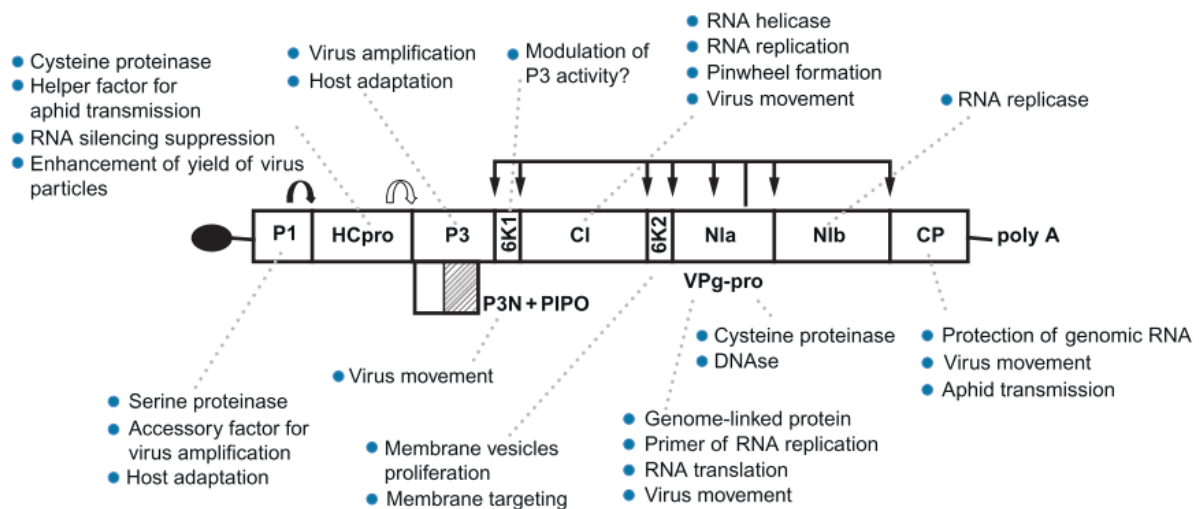


Abbildung 1-9: Funktionen der potyviralen Proteine

Der offene Leserahmen (open reading frame, ORF) der monopartiten Potyviren wird als Box dargestellt, die einzelnen codierten Proteine sind entsprechend benannt. Die schwarze Ellipse symbolisiert das terminale VPg. Abbildung aus Revers & García (2015).

Das intranuklear kristallisierende Protein b (NIb) sorgt als RNA-abhängige RNA-Polymerase (*RNA-dependent RNA polymerase*, RDRP) für die Vervielfältigung der viralen Erbinformation und damit für die Vermehrung des Virus in der Wirtspflanze (Knuhtsen et al., 1974; Ivanov et al., 2014; Revers & García, 2015).

Ungefähr 2000 Untereinheiten des CP bilden als Hülle des viralen Genoms die flexiblen, fädigen Viruspartikel. Darüber hinaus hat es Funktionen bei der Übertragung des Virus auf und die Virusausbreitung innerhalb der Pflanze (Revers & García, 2015).

Nach der Infektion wird die virale RNA in der Wirtszelle freigesetzt und es erfolgt die erste Translation durch die wirtseigene Proteinbiosynthese. Daraufhin kann sich das Virus replizieren und in der Pflanze ausbreiten. Die Replikation findet in Vesikeln statt, die mobil sind und so als aktive Einheiten über die Plasmodesmata auch Nachbarzellen infizieren können (Jiang & Laliberté, 2011; Wang, 2021). Der Langstreckentransport innerhalb der Pflanze erfolgt dagegen in Form von Viruspartikeln über das Phloem (Hipper et al., 2013).

Wie eingangs beschrieben, befallen Potyviren praktisch alle Pflanzen. Die einzelnen Viren sind dabei jedoch sehr eng auf ihre jeweilige Wirtspflanze spezialisiert. Bei Getreide sind unter den Potyviren vor allem Bymoviren von (wirtschaftlicher) Bedeutung. In Gerste verursachen sie die Gelbmosaikvirose, die im Folgenden genauer vorgestellt wird.

1.2.3. Gerstengelbmosaikvirose: Eine neue Krankheit mit großer Bedeutung

Die Gerstengelbmosaikvirose wurde in den 1940er Jahren in Japan beschrieben. Die typischen Symptome an Wintergerste – hellgrüne bis gelbliche Streifen auf den Blättern, reduzierter Wuchs, Verlust der Winterfestigkeit, Nekrosen und eine Ertragsreduktion von etwa 50 % – wurden 1978 in Deutschland erstmals auf Feldern im östlichen Niedersachsen, bald darauf aber auch um Hannover, in Hessen und Westfalen beobachtet. Nur drei der damals verfügbaren Gerstensorten zeigten eine Resistenz gegen den neuen Erreger (Huth & Lesemann, 1978).

Die Krankheit wird von den beiden eng verwandten, meist im Komplex auftretenden Bymoviren Gerstengelbmosaikvirus (*Barley Yellow Mosaic Virus*, BaYMV) und Mildes Gerstenmosaikvirus (*Barley Mild Mosaic Virus*, BaMMV) verursacht. Übertragen werden sie vom bodenbürtigen Schleimpilz *Polymyxa graminis*, der seinerseits die Wurzeln von Wintergetreide im Herbst bei kühlfeuchter Witterung befällt und dabei eine Reihe von Getreideviren übertragen kann (Estes & Brakke, 1966; Kühne, 2009).

In Japan sind zwei Stämme von BaMMV (BaMMV-Ka1 und BaMMV-Na1) sowie drei Stämme von BaYMV (BaYMV-I, -II, und -III) bekannt. In Europa traten zunächst ein BaMMV-Stamm und ein BaYMV-Stamm (BaYMV-1) auf. Ende der 1980er Jahre wurde mit BaYMV-2 ein neuer Stamm identifiziert, der die bis dahin genutzte *rym4*-Resistenz durchbrach. Anfang der 2000er Jahre trat zunächst in Frankreich ein neuer Stamm des Mildes Gerstenmosaikvirus' (BaMMV-Sil) auf, der auch Gerste mit *rym5*-Resistenz infizieren konnte (Hariri et al., 2003). Bei Feldversuchen in Deutschland wurden außerdem zwei Jahre später in einer bis dahin als resistent geltenden Sorte („Tokyo“) in Eikeloh (Nordrhein-Westfalen) und Aschersleben (Sachsen-Anhalt) die typischen Symptome beobachtet. In den betroffenen Pflanzen konnte ein weiterer neuer Virusstamm (BaMMV-Teik/ -Tasl) identifiziert werden, der ebenfalls die von *rym5*-vermittelte Resistenz überwunden hatte (Habekuss et al., 2007).

1.2.4. Genetischer Pflanzenschutz: Identifizierte Resistenzloci in der Gerstenzüchtung

Da es keine Möglichkeiten des chemischen Pflanzenschutzes gegen BaYMV und BaMMV oder den Vektor *Polymyxa graminis* gibt, kommt der Resistenzzüchtung bei der Bekämpfung dieser Erkrankung eine besondere Bedeutung zu (Jiang et al., 2020a). Wie oben erwähnt, waren beim ersten Auftreten der Gerstenmosaikvirose in den 1970er Jahren bereits wenige Sorten resistent. Dies konnte auf das *rym4*-Allel aus der kroatischen Landrasse „Ragusa“ zurückgeführt werden, die seit den 1920er Jahren als Resistenzdonor, vor allem gegen Mehltau, in der Züchtung genutzt wurde (Ordon et al., 2009; Landesanstalt für Landwirtschaft Bayern, 2022). Das *rym4*-Allel vermittelt eine Resistenz gegen BaYMV-1 und BaMMV-1. Bei weiteren Untersuchungen resistenter Genotypen, vor allem aus Asien, konnte mit *rym5* ein weiterer Locus identifiziert werden, der Resistenz gegen alle damals in Europa bekannten BaYMV- und BaMMV-Stämme vermittelte (Graner et al., 1995). Wie zuvor bereits erwähnt (siehe 1.1.5), ermöglichte die Entwicklung genetischer Marker die Züchtung resistenter Sorten basierend auf diesen beiden Resistenzgenen und rettete so den Wintergerstenanbau in Europa gegen die sich seit den 1970er Jahren ausbreitende Viruskrankheit. Heute sind praktisch alle zugelassenen Wintergerstensorten gegen die verbreitetsten Stämme resistent (Bundessortenamt, 2021). Mittlerweile sind insgesamt 18 resistenzvermittelnde Loci (*Resistance against Yellow Mosaic, rym*) in Gerste bekannt (*rym1-18*). Sie vermitteln rezessive, zumeist Stamm-spezifische Resistenzen gegen BaYMV oder BaMMV (Jiang et al., 2020a). Neben der aus *Hordeum bulbosum* stammenden, dominanten *Rym14^{Hb}*-Resistenz, gehört *rym11* zu den wenigen Resistenzgenen, die gegen alle bekannten Stämme wirken (Yang et al., 2014).

Von den bekannten Loci wurden bisher nur für zwei die verantwortlichen Gene identifiziert: *Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E (EIF4E)* für die Allele *rym4*, *rym5*, *rym6* und *rym10* (Kanyuka et al., 2005; Stein et al., 2005) sowie *Protein Disulfide Isomerase-Like 5-1 (PDIL5-1)* für

rym1 und *rym11* (Yang et al., 2014). Ersteres wurde in der Züchtung bereits umfassend genutzt, *PDIL5-1* stellt hingegen eine neue Resistenzquelle dar. Bei möglichen Resistenzgebern wie der Landrasse „Russia 57“ oder einigen ost-asiatischen Landrassen handelt es sich jedoch um sehr exotisches Zuchtmaterial für die europäische Wintergerste, was die Nutzung mittels Kreuzungszucht sehr erschwert (Yang et al., 2016).

1.2.5. Resistenzmechanismen gegen Pflanzenviren: aktive und passive Verteidigung

Pflanzen sind gegen Virusinfektion durch ihre Zellwand eigentlich sehr gut geschützt. Um diese zu überwinden, benötigen Viren entweder Zugang durch verletztes Gewebe oder einen Vektor, der sie ins Innere der Pflanzenzelle schleust. Dort einmal angekommen, sind Viren auf den Stoffwechsel ihres Wirtes angewiesen und interagieren vielfältig mit ihm (siehe dazu 1.2.2). Um sich gegen Virusinfektionen zu verteidigen, setzen Pflanzen auf vielfältige Strategien, die von Pallas & García (2011) sowie Mandadi & Scholthof (2013) umfassend beschrieben werden. Ähnlich zur Reaktion auf Infektionen mit Pilzen und Bakterien kann es zu einer Hypersensitivreaktion (HR) kommen. Dabei wird durch Interaktion von pflanzeneigenen Resistenzproteinen (R-Proteinen) und viralen Avirulenzproteinen (Avr-Proteinen) aktiv eine Reaktionskaskade in den infizierten und deren benachbarten Zellen ausgelöst. Am Ende dieser Kaskade akkumulieren reaktive Sauerstoffspezies in den betroffenen Zellen und führen so zum kontrollierten Zelltod, wodurch die Virusausbreitung in der Pflanze unterbunden wird (Pallas & García, 2011). Bei den R-Proteinen handelt es sich meist um solche mit Nukleotid-Bindedomäne und Leucin-reichen Wiederholungen (*Nucleotide binding Site – Leucine-rich Repeats*, NB-LRRs), die Proteine des Virus erkennen und so die auf den Infektionsherd begrenzte Abwehrreaktion einleiten (Mandadi & Scholthof, 2013).

Ein weiterer Resistenzmechanismus ist das *RNA Silencing*: virale, doppelsträngige RNA, wie sie etwa bei der RNA-Replikation auftritt, wird von der Pflanzenzelle durch *Dicer-like* (DCL) RNasen erkannt und in siRNA-Moleküle (*small interfering RNA*) prozessiert. Diese binden dann an Argonaut- (AGO) Proteine und bilden so *RNA-induced Silencing*-Komplexe (RISC), welche homologe, einzelsträngige RNA erkennen und diese abbauen oder die Translation verhindern. Durch Homologien von viral abgeleiteten siRNAs mit pflanzeneigenen RNAs kann es so aber auch zum *Silencing* von Wirts-RNA kommen, wodurch einige Virussympptome wie Vergilbungen verursacht werden können (Pallas & García, 2011).

Passive Resistenzen basieren auf der engen Interaktion zwischen dem Virus und seinem Wirt. Durch Mutationen, die zum Funktionsverlust solcher pflanzeneigenen Interaktionsfaktoren führen, kann es zur Bildung (rezessiver) Resistenzen kommen, da das Virus diese nicht mehr für seine Vermehrung nutzen kann. Dies ist bei praktisch jedem Schritt im Lebenszyklus des Virus möglich: Von der Infektion über die Translation und Replikation bis hin zum Transport des Virus innerhalb der Pflanze (Mandadi & Scholthof, 2013; Schmitt-Keichinger, 2019). Auch bei den in Gerste identifizierten Resistenzallelen von *HvEIF4E* und *HvPDIL5-1* handelt es sich um Veränderungen oder Funktionsverluste solcher pflanzlichen Interaktionspartner, die Bymoviren für ihren Lebenszyklus in der Gerstenpflanze rekrutieren.

PDIL5-1 ist im Endoplasmatischen Reticulum (ER) lokalisiert und katalysiert als Chaperon die Bildung von Disulfid-Bindungen bei der Faltung von Proteinen. Die genaue Interaktion mit dem Virus ist noch nicht aufgeklärt. *PDIL5-1* ist aber in allen Eukaryoten hochkonserviert und für die homologen Protein-Disulfidisomerasen (PDIs) im Menschen werden verschiedene Interaktionen mit Viren sowohl beim Entpacken des Virus zum Eintritt ins ER als auch bei der Faltung viraler Proteine im ER beschrieben (Kohli et al., 2021; Mahmood et al., 2021). Es ist also anzunehmen, dass *HvPDIL5-1* im Zusammenhang mit Bymoviren in Gerste ähnliche Funktionen hat. Gerste ist bisher allerdings die einzige Pflanzenart, für die die Resistenz gegen Bymoviren mit dem Funktionsverlust von *PDIL5-1* nachgewiesen wurde. Aufgrund der Konservierung dieses Gens ist

1. Allgemeine Einleitung

jedoch davon auszugehen, dass der Resistenzmechanismus auch in anderen Pflanzenarten auf ähnliche Weise funktionieren würde.

Im Gegensatz zu PDIL5-1 ist eIF4E ein in vielen Pflanzenarten bekannter Interaktionsfaktor mit RNA-Viren (siehe auch 1.2.2). So wurden *EIF4E*-assoziierte Resistenzen bereits für Paprika, *Arabidopsis*, Melone, Erbse, Salat und zahlreiche weitere Pflanzen beschrieben (Lellis et al., 2002; Ruffel et al., 2002; Nieto et al., 2006; Sanfaçon, 2015). Gerste war die erste monokotyle Pflanze, in der *EIF4E* als Virusresistenzfaktor identifiziert wurde (Kanyuka et al., 2005; Stein et al., 2005). EIF4E bindet zur Initiation der Proteinbiosynthese an die m⁷G-Kappe der eukaryotischen mRNA und leitet damit die Bildung des Translationskomplexes ein, sodass das Ribosom an die mRNA binden und diese in die codierte Aminosäuresequenz übersetzen kann (siehe Abbildung 1-10). ss(+)RNA-Viren schleusen ihre genomische RNA direkt in diesen Prozess ein, indem sie mit dem *Viral-genome-linked* Protein (VPg) die Struktur der m⁷G-Kappe der eukaryotischen mRNA imitieren, sodass die virale RNA ebenfalls von eIF4E gebunden und so die Translation in das Polyprotein eingeleitet wird (Wittmann et al., 1997; Léonard et al., 2000; Li & Shirako, 2015; Sanfaçon, 2015). Darüber hinaus gibt es Hinweise darauf, dass die Interaktion zwischen VPg und eIF4E weitere Funktionen bei der Replikation und der Ausbreitung des Virus innerhalb der Zelle hat (Jiang & Laliberté, 2011).

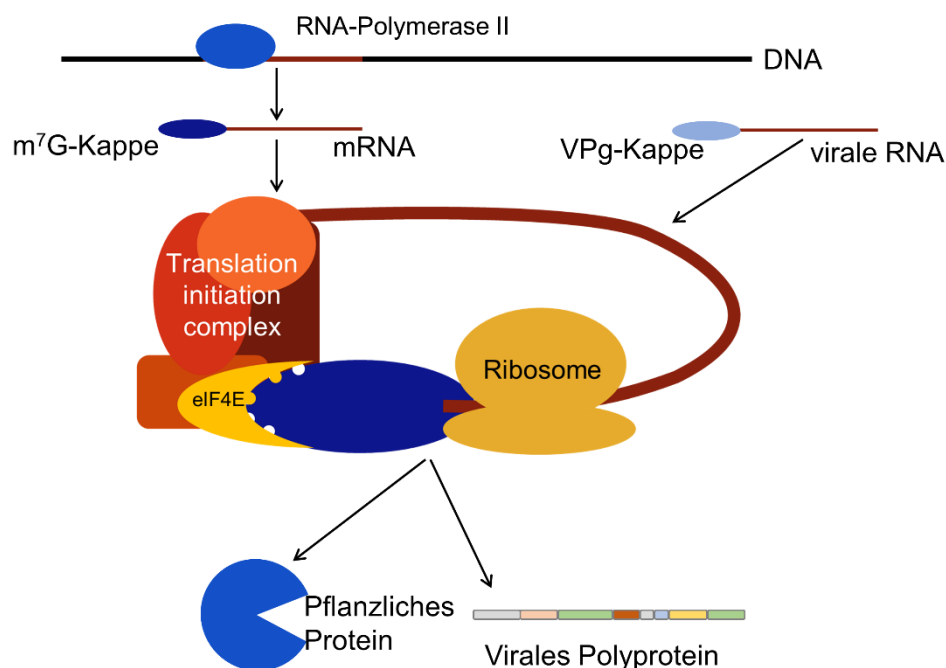


Abbildung 1-10: Schema der Translation von pflanzlicher mRNA und viraler RNA

Zum Beginn der Translation wird die m⁷G-Kappe der pflanzlichen mRNA vom Eukaryotischen Translationsinitiationsfaktor 4E (eIF4E) gebunden und damit die Bildung des Translationsinitiationskomplexes aus *PolyA-binding Protein* (PABP), eIF4G, eIF4A und weiteren Faktoren eingeleitet, der die mRNA am 5'- und am 3'-Ende bindet, sodass ein Translationsloop entsteht. An diesen bindet das Ribosom, welches die mRNA-Sequenz in die Aminosäuresequenz übersetzt. Durch Imitation der Kappenstruktur mit dem *Viral Genome-linked Protein* (VPg) wird die virale RNA ebenfalls von eIF4E gebunden und so in die Translationsmaschinerie der Pflanze geleitet und virale Proteine translatiert.

Für eine Reihe von Pflanzenarten, darunter *Arabidopsis*, Cassava, Tomate und Reis, ist der gezielte *Knockout* von *EIF4E* oder seiner Isoform *EIF(iso)4E* beschrieben und führte zu Resistenz gegen verschiedene Bymoviren (Pyott et al., 2016; Gomez et al., 2019; Kalinina et al., 2020; Yoon et al., 2020). Die Isoformen sind dabei weitgehend redundant, interagieren in der weiteren Bildung des Translationskomplexes aber wiederum jeweils vorzugsweise mit eIF4G oder eIF(iso)4G und auch die verschiedenen Viren können sich auf eine der Isoformen spezialisieren (Duprat et al., 2002; Sanfaçon, 2015).

Die in Gerste bisher bekannten *EIF4E*-Allele, welche zur Virusresistenz führen, enthalten verschiedene Einzelbasenaustausche (*Single Nucleotide Polymorphisms*, SNPs), die zu veränderten Aminosäuren an der jeweils codierten Position führen (Stein et al., 2005; Hofinger et al., 2011; Yang et al., 2016). Damit verändert sich die Bindedomäne des eIF4E-Proteins, sodass die VPg-Kappe der viralen RNA nicht mehr erkannt und somit letztere nicht translatiert wird. Infolgedessen kann sich das Virus nicht in der Pflanzenzelle vermehren und die Pflanze ist somit resistent (Sanfaçon, 2015). Die Bindung an die m⁷G-Kappe der pflanzeigenen mRNA wird davon jedoch nicht so stark beeinträchtigt, dass es zu einem Funktionsverlust für die Pflanze kommt. Stattdessen steht ihr das Protein weiterhin zur Verfügung. Auf Grundlage dieses Mechanismus sind fast alle Wintergerstensorten in Europa derzeit resistent gegen BaMMV und BaYMV (Bundessortenamt, 2021). Allerdings haben einzelne Virusstämme durch Anpassung der Struktur ihrer VPg-Kappe an die veränderte Bindedomäne diese Resistenz überwunden (siehe dazu 1.2.4) und können Gerste mit den *rym4*- oder *rym5*-Allelen von *EIF4E* befallen (Li et al., 2016). Daraus ergibt sich der Bedarf, neue Resistenzallele und -mechanismen für die Gerstenzüchtung nutzbar zu machen. Hier setzt die vorliegende Arbeit an.

1.3. Zielstellungen dieser Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit soll die zielsequenzspezifische Mutagenese mit RNA-geleiteten Cas-Endonukleasen (siehe 1.1.6 und 2) anhand von Gerste (*Hordeum vulgare* L.) für monokotyle Kulturpflanzen verbessert und ihre Anwendung für züchterisch relevante Eigenschaften am Beispiel von Resistenzen gegen die Gerstengelbmosaikvirose demonstriert werden.

Dafür wurden die zwei Zielgene *HvEIF4E* und *HvPDIL5-1* ausgewählt, die bereits im Zusammenhang mit Virusresistenz in Gerste bekannt waren (siehe 1.2.5), um in anfälligen Gerstenlinien durch gezielt induzierte Mutationen Resistenzen gegen die Infektion mit BaMMV herbeizuführen. Die Ziele dabei waren, neue resistenzvermittelnde Allele von *EIF4E* zu erzeugen sowie die unterschiedlichen bekannten resistenzvermittelnden Allele von *PDIL5-1* in anfälligen Genotypen nachzubilden. Dafür wurden unterschiedliche Ansätze der gezielten Mutagenese mittels Cas9 und der Baseneditierung verfolgt.

Kapitel 3 beschreibt die Arbeiten und ihre Ergebnisse zum Mutageneseansatz mit der Cas9-Endonuklease an *HvEIF4E* und Kapitel 4 beschreibt die entsprechenden Arbeiten an *HvPDIL5-1*. Kapitel 5 stellt die bisher erste Nutzung einer nCas9-Fusion mit Baseneditoren in Gerste vor, um Einzelbasensubstitutionen in *HvEIF4E* zu induzieren.

In Kapitel 6 sollen die Ergebnisse der Experimente noch einmal im Gesamtkontext diskutiert werden.

1.4. Eigene Beiträge im Rahmen der kumulativen Arbeit

Forschung ist Teamarbeit und in einer kumulativen Dissertation wird das besonders deutlich. Damit meine eigenen Anteile an den in den Kapiteln 2 bis 5 vorgestellten Arbeiten besser eingeordnet werden können, möchte ich sie im Folgenden kurz benennen und quantifizieren.

Das Manuskript im Kapitel 2 haben wir gemeinsam konzeptioniert und die Ausarbeitung der einzelnen Abschnitte verteilt. Ich habe die Abschnitte 2.3 und 2.4 inklusive Tabelle 2-1 verfasst, alle Autoren haben alle Teile gelesen und überarbeitet. Mein Gesamtanteil liegt damit bei 25 %.

Für die Arbeiten in den Kapiteln 3 und 4 habe ich die Zielmotive ausgewählt, die Cas9-gRNA-Konstrukte kloniert, die Protoplasten-Assays mit durchgeführt und anschließend die Proben sequenziert und ausgewertet. Des Weiteren habe ich die Primärmutanten genotypisiert und Familien für die Resistenztests ausgewählt. Die Virus-Infektionsversuche mit den M₂-Familien wurden am Institut für Resistenzforschung und Stresstoleranz des Julius-Kühn-Instituts von den Kolleginnen und Kollegen dort vorgenommen. Ich habe anschließend die Pflanzen sequenziert und die Ertragsdaten erfasst, alle Ergebnisse zusammengestellt und ausgewertet sowie die Manuskripte geschrieben und die Abbildungen erstellt. Alle Co-Autorinnen und -Autoren haben die Manuskripte gelesen und gegebenenfalls überarbeitet. Mein Gesamtanteil an diesen Arbeiten liegt bei 80 %.

Für die Baseneditierung in Kapitel 5 habe ich ebenfalls die Zielmotive ausgewählt und die Vektoren mit dem CasCADE-System kloniert. Ich habe den Protoplasten-Assay mit durchgeführt und die Sequenzierung der Proben vorgenommen und ausgewertet, die Primärmutanten genotypisiert und die M₂-Familien ausgewählt und sequenziert. Ich habe die gesammelten Daten ausgewertet, das Manuskript verfasst und die Abbildungen erstellt. Mein Gesamtanteil an dieser Arbeit liegt bei 90 %.

Der allgemeine Mantelteil dieser Dissertation in Form der Kapitel 1, 6, 7 und 8 wurde zu 100 % von mir ausgearbeitet und verfasst.

2. Cas Endonuclease Technology — A Quantum Leap in the Advancement of Barley and Wheat Genetic Engineering

Iris Koepfel[†], Christian Hertig[†], Robert Hoffie[†], Jochen Kumlehn

Plant Reproductive Biology Group, Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK) Gatersleben, 06466 Seeland, Germany

[†]These authors contributed equally to this work

Review article published on 29 May 2019 in the *International Journal of Molecular Sciences*, 20(11), 2647; <https://doi.org/10.3390/ijms20112647>

Abstract

Domestication and breeding have created productive crops that are adapted to the climatic conditions of their growing regions. Initially, this process solely relied on the frequent occurrence of spontaneous mutations and the recombination of resultant gene variants. Later, treatments with ionizing radiation or mutagenic chemicals facilitated dramatically increased mutation rates, which remarkably extended the genetic diversity of crop plants. However, a major drawback of conventionally induced mutagenesis is that genetic alterations occur simultaneously across the whole genome and at very high numbers per individual plant. By contrast, the newly emerging Cas endonuclease technology allows for the induction of mutations at user-defined positions in the plant genome. In fundamental and breeding-oriented research, this opens up unprecedented opportunities for the elucidation of gene functions and the targeted improvement of plant performance. This review covers historical aspects of the development of customizable endonucleases, information on the mechanisms of targeted genome modification, as well as hitherto reported applications of Cas endonuclease technology in barley and wheat that are the agronomically most important members of the temperate cereals. Finally, current trends in the further development of this technology and some ensuing future opportunities for research and biotechnological application are presented.

Keywords: cereals; CRISPR; crops; genetic engineering; genome editing; plant; *Triticeae*

2.1. Introduction

2.1.1. Historical View of Genetic Modification in Crop Plants

For more than 10,000 years, plants have been cultivated to feed humans and their livestock, as a source of raw materials and to generate energy. Over time, the driving forces of evolution, domestication, and breeding of cultivated plants have changed according to environmental conditions and societal demands. To cope with the growth of the world's population and the consequent increase in demand for food, the total production needs to be substantially increased during the next decades [1, 2]. Not only is the growing world population a challenge, but also the expected climatic changes [3, 4]. Thus, the plants of the future also have to be better adapted to harsh weather conditions [5, 6]. In addition, the demands of modern society are increasing; food should be of better and consistent quality, healthier, and more diverse. At the same time, society calls for a substantially reduced application of fertilizers and pesticides to render agriculture more sustainable [2].

In nature, mutations occur spontaneously and alterations that provide an advantage under the given conditions are likely to prevail over time. For modern plant breeding, however, the rate of spontaneous mutations is too low to keep up with the demands for crop improvements. Moreover, it is in the nature of spontaneous mutations that they are unpredictable in terms of both position and resultant nucleobase sequence. In the 1930s, mutation breeding emerged, in which mutations are deliberately induced with chemicals such as ethylmethanesulfonate (EMS) or with ionizing radiation. Induced mutagenesis breeding has so far produced over 3000 approved varieties [7] and for many further cultivars it has not been documented which induced mutations they have inherited from germplasms they derive from. Using this technology, however, thousands of mutations occur at different sites in a single plant's genome at a time. Therefore, a vast number of undesirable mutations have to be eliminated via cumbersome and time-consuming back-crossing procedures [5]. The method of Targeted Induced Local Lesions in Genomes (TILLING) represented a significant progress in the detection of mutations. With TILLING or Eco-TILLING, respectively, it is possible to readily identify induced and spontaneous mutations in known genes of interest [8, 9].

The method of gene transfer using *Agrobacterium tumefaciens* was introduced in the 1980s [10]. Ever since, genes derived from unrelated organisms or genetically modified gene variants can be introduced into plant genomes. This technique makes it possible to modify or introduce performance-determining genes into cultivated plants more quickly and in a more targeted manner. However, there are some limitations, such as the fact that the transferred gene is integrated at a random position in the genome and that changes to the plant's own genes are only possible to a very limited extent. The insertion site in the genome then also determines whether and how effectively the introduced gene is expressed, and thus to what extent the respective trait will be modified. In addition, not all plants can be transformed equally well by the use of *Agrobacterium*, with cereal species being a particular challenge in this respect [11].

With the new methods for targeted genome modification that are based upon customizable endonucleases, it is possible to modify DNA sequences at a previously defined site of choice in the host genome. The standard application of this technology is site-directed mutagenesis, in which the location of the mutation can be precisely determined, whereas the resulting nucleobase sequence is random [12]. However, the precision can be increased by a variety of approaches. The most sophisticated one involves the use of an artificial DNA repair template implemented via homology-directed DNA repair. By this still very challenging principle, any sequence of choice can be created at any predefined genomic locus.

Wheat (*Triticum aestivum*) and barley (*Hordeum vulgare*) are among the most important cereals in the world. Among all crops, wheat occupies the largest cultivated area in the world, and barley is one of the oldest domesticated crops, currently being the fourth most frequently cultivated

cereal (<http://faostat/fao.org>). With a size of about 17 Gbp, wheat has a very large and complex genome. Only recently has the wheat genome been almost completely read out and this data has been made publicly available [13]. Hexaploid bread wheat evolved via hybridizations from several ancestors. This process involved allopolyploidization, resulting in a total of three diploid subgenomes [14]. In contrast to wheat, barley has a genome with a size of 5.1 Gbp. Already in 2012, a detailed draft of the barley genome was published [15], which was recently complemented by much improved data, including genomic sequences of a large number of representative gene bank accessions [16, 17].

2.1.2. Platforms of Customizable Endonucleases

In plant research and biotechnology, four platforms of customizable endonucleases have been used so far; meganucleases, zinc-finger nucleases (ZFNs), transcription activator-like effector nucleases (TALENs), and the RNA-guided, clustered, regularly interspaced, short palindromic repeats (CRISPR)-associated (Cas) endonucleases.

Meganucleases are naturally occurring endonucleases that recognize and cut comparatively long (>12 bp) DNA sequences. The most commonly used meganuclease is the I-SceI from *Saccharomyces cerevisiae* [18, 19]. The ability of this endonuclease to induce double-strand breaks in plants was first demonstrated by Puchta et al. [20] using *Nicotiana* protoplasts. Meganucleases are very specific and efficient. It is, however, very difficult to reengineer these enzymes for target sequences other than their native ones [21]. Hence, their use is fairly restricted as compared to the alternative endonuclease platforms [22, 23]. As a consequence, meganucleases have been used in plants almost exclusively for basic research, in particular for DNA repair mechanisms [24].

Zinc-finger nucleases are hybrid proteins with a DNA recognition domain consisting of at least three zinc-fingers combined with a FokI restriction endonuclease domain [25]. Each zinc-finger specifically interacts with three base pairs (bp) of the genomic target sequence and several zinc-fingers can be consecutively assembled to recognize and bind a total of 9 to 12 bp of DNA [26]. Zinc-finger nucleases must always be used in pairs, since their FokI endonuclease domain is only catalytically active if it is present as a dimer [25]. The target motifs on the DNA are selected in such a way that the two zinc-finger nuclease monomers bind to the target DNA in antiparallel orientation and at a suitable distance to each other. A DNA double-strand break (DSB) is then catalyzed in the interspace between the two binding sites [27, 28]. In addition to the particularly complex production process of zinc-finger nucleases, there are limitations in the selection of possible binding sites, as well as unpredictable neighbor effects between adjacent zinc-fingers on the DNA binding specificity [22].

In 1989, it was shown for the first time how transcription activator-like effector (TALE) proteins are transferred from a pathogenic bacterium of the genus *Xanthomonas* into a host plant [29]. The TALE-based nucleases (TALENs) act, similarly to zinc-finger nucleases, as dimers [30]. The DNA-binding domains consist of up to 30 copies of highly conserved repeats of typically 34 amino acids. Only the amino acid positions 12 and 13 (called repeat-variable di-residues) of each repeat are not uniform, because they specify the different DNA base pairs to bind [31]. A FokI endonuclease bound to such a TALE binding domain induces the double-strand break in the target motif [30]. Since each repeat recognizes just one nucleobase of the DNA target, the design and assembly of the binding domain is more straightforward and versatile than with zinc-finger nucleases [31].

The platform of RNA-guided Cas endonucleases is derived from the CRISPR/Cas adaptive immune system of microbes. The most commonly used Cas endonuclease is from *Streptococcus pyogenes* (Sp). The two-component system consists of the Cas restriction enzyme and an artificial guide RNA (gRNA) that navigates the Cas protein to a cognate DNA sequence motif [12]. The gRNA consists of a structurally functional and a variable part. The 3'-tail forms a spatial structure

required for binding with Cas to form a ribonucleoprotein complex. The variable part of the gRNA located at the 5'-end usually comprises 20 nucleotides and defines the DNA-binding specificity of the gRNA according to the principle of complementary base pairing. The genomic target motif of such ribonucleoprotein complex includes the same nucleotide sequence as the variable part of the gRNA, which enables the gRNA to specifically bind the opposite DNA strand. This part of the target DNA is often referred to as the protospacer, a term adopted from the microbial immune system these molecules originate from. In addition, this major part of the target motif is complemented by the so-called protospacer-adjacent motif (PAM), which is recognized and bound by the Cas protein. In the case of *SpCas9*, the nucleobase triplet NGG, in which N stands for any of the four nucleobases, represents the PAM site [12]. The high versatility of the gRNA 5'-end allows a wide variety of target sequences of choice to be addressed. The comparatively simple application and the efficiency and reliability achievable in higher organisms have rendered this platform the most popular and frequently used tool for site-directed genome modification today [32, 33].

2.2. Methodological Aspects of Cas Endonuclease Technology

2.2.1. System Components

When employing Cas endonuclease technology in plants, there are a number of opportunities and some specific requirements in terms of the construction of transformation vectors. Cas9 endonucleases have been modified in various ways for use in plants. Importantly, the coding sequences were complemented by one or two nuclear localization signals (NLSs) and the codon usage of the protein biosynthesis was optimized for use in plants in general, for monocots and dicots, or even more specifically for individual species, such as wheat and barley [34, 35, 36].

Depending on the host organism, also various promoters have been used to drive endonuclease expression. In crop plants, the doubled enhanced cauliflower mosaic virus (2x35S) promoter has been mainly used for test systems [34, 37, 38] and *UBIQUITIN* promoters for the generation of heritable modifications. Accordingly, the maize *POLYUBIQUITIN1* promoter (*ZmUBI1*) has been commonly used for cas9 expression to generate heritable changes in barley and wheat [37, 39, 40]. Alternatively, Cas endonuclease-encoding genes can also be expressed by self-replicating virus particles in the plant cell [41]. This expression system ensures a comparatively high gene dosage, which may be particularly useful for homology-based approaches that are described in more detail below. Gil-Humanes et al. [42] have shown that the Wheat Dwarf Virus, a replicon-based geminivirus, can be modified to express gRNA and cas9 in wheat, albeit this approach has not yet been shown to be applicable for the generation of plants with heritable modifications.

The expression cassette for a gRNA typically consists of plant-derived RNA polymerase III (Pol III)-processed promoters and terminators derived from small nuclear RNA (snRNA)-encoding genes. Somehow surprisingly, it also proved to be sufficient in plants to use the transcriptional termination signal of bacterial CRISPR RNAs, which solely consists of a stretch of five to seven thymidines [34, 43]. A comparative test in maize protoplasts had shown that wheat and rice *U3* promoters were more efficient than the Arabidopsis *U6* promoter that has been preferentially used in dicots [44]. The wheat *U6* promoter has hitherto been mostly used for barley and wheat [37, 39, 40]. More recently, a study of Kumar et al. [45] indicated that the barley *U3* promoter might be more efficient in site-directed mutagenesis of barley than the frequently used rice *U3* promoter.

The preference of the *U3* and *U6* promoters for A and G as the first transcribed nucleotides limits the selection of target motifs to GN₂₀GG and AN₂₀GG, respectively [43]. However, there are thus far no examples where gRNAs were directly driven by Polymerase II-compatible promoters. The mRNAs otherwise expressed by Pol II promoters are processed at both ends and these modifications significantly alter the structure of the gRNA, and thus compromise the ability to bind both Cas9 and the target motif that is to be processed with sufficient efficiency [43].

Several systems have been developed for the expression of multiple gRNAs. Mostly, each gRNA is expressed by a separate Pol III promoter [44, 46, 47]. Alternatively, multiple gRNAs can be located on only one transcript and post-transcriptionally separated, as has already been demonstrated with wheat [48]. However, such expression systems have not yet led to improved efficiency of the technology with regard to individual target motifs in plant genomes [43, 49, 50].

2.2.2. Criteria for Target Motif Selection and in silico gRNA Design

Thanks to the opportunity to equip the gRNA with any target-specific 5'-sequence, the plant genomic target site of the gRNA/Cas complex can, in principle, be chosen at will. However, the Cas9 endonuclease requires the aforementioned two guanines that are part of the protospacer-adjacent motif (PAM) at the 3'-end of the target sequence. In addition, there are further preferences of the target-specific part of the gRNA, some of which can have a considerable impact on the functionality of the gRNA/Cas9 complex. For instance, it was determined for the so-called seed region, that is, the six nucleotides residing immediately upstream of the PAM site, that a GC content above 50 percent increases the probability of sufficient gRNA functionality [51]. With regards to the entire target motif, an enrichment of guanines and low adenine content was shown to cause increased binding stability and activity of the gRNA/Cas9 complex [52].

The target sequence-specific part of the gRNA usually has a length of 20 nucleotides [12, 53]. As previously stated, the transcriptional start defined by the U3 and U6 promoters, which are preferred to drive gRNAs in plants, are A and G, respectively, which requires the selection of genomic targets having the same nucleobases at their 5'-end [38]. In human cell lines and zebrafish, it has been shown that the length of the target-specific part of the gRNA can be shortened to 18 nucleotides without a noticeable effect on mutation efficiency. Surprisingly, such shorter gRNAs even had increased specificity for the on-target sequence as compared with off-targets [52, 54, 55]. Guide-RNAs with less than 20 target-specific nucleobases also showed high performance in *Arabidopsis* and barley [56, 57]. On the other hand, an extension of the gRNA 5'-part beyond 20 nucleotides was reported to cause reduced cleavage efficiency [58].

Quite a number of online platforms have been developed for the selection of target motifs and corresponding gRNAs. For instance, CRISPR-Plant was especially developed for plants [59, 60]. While a whole array of plant reference genomes can be directly screened in this platform, the barley and wheat genomes are not implemented. However, for the selection of gRNAs in cereals, DeskGen is a highly instrumental alternative, as these cereal genomes are available for target validation [61, 62]. This platform offers a comparatively large scope of options, including various Cas endonucleases and a useful range of lengths of the target-specific gRNA 5'-part. Also, the CRISPOR online tool can be specifically used for barley and wheat. It comprises a comprehensive choice of different Cas enzymes [63, 64]. In addition to the selection of gRNAs predicted to be well-performing at their target motif, all above online tools are also capable of indicating potential off-targets in the chosen reference genome. WU-CRISPR is another useful platform, as its algorithm is comparatively strict in selecting particularly useful target motifs. However, this tool is confined to SpCas9 and does not offer off-target screens in reference genomes [65]. A general disadvantage of all these platforms is that their algorithms have been established using data from other organisms than plants, which is thought to be one of the reasons that the reliability of their results is still fairly limited.

Liang et al. [66] have focused on the preservation of the gRNA secondary structure. They determined that three of the stem loops frequently occurring in the gRNA 3'-part are essential to appropriately bind to the Cas9 protein, and hence are also of decisive importance to the overall functionality of the gRNA/Cas complex. These authors also found out that 98 percent of well-performing gRNAs have no more than a total of 12 base pairs formed between their target-specific and 3'-parts and no more than 7 target-specific nucleobases consecutively involved in intra-

molecular base pairs. In addition, no more than 6 base pairs should be formed within the target-specific part of the gRNA. In order to ensure these gRNA features, it is recommended to thoroughly investigate the secondary structure of candidate gRNAs. For the prediction of RNA secondary structures, online platforms such as mfold [67, 68, 69] or RNAfold [70, 71] are available.

In cases where genetic modifications are intended to be performed in genotypes other than those with reference genomes, it is recommended to countercheck pre-selected target motifs for their presence and integrity, because even single nucleotide polymorphisms typically result in a dramatic drop in gRNA/Cas efficiency.

2.2.3. *Delivery of Cas Endonucleases and Associated Reagents into Plant Cells*

A number of methods are available for the transfer of DNA, RNA, and proteins into plant cells, which in principle can also be used for Cas endonucleases, customized gRNAs, DNA repair templates, and any further reagents that may be used to support site-directed genome modification. Nowadays, the most widely used approach is based on the genomic integration of expression units with gRNA and Cas-encoding DNA sequences. However, the production of stably transgenic plants is a particular challenge for cereals, because agrobacteria, which are mostly used for plant transformation, have a very limited compatibility with these non-host plants. Moreover, the formation of adventitious shoots from leaf or shoot explants, which is readily achieved in the context of DNA transfer methods applicable to most dicotyledonous species, has only been successful in exceptional, hardly reproducible cases in cereals [72]. On the basis of special methodological approaches, routine genetic transformation of barley and wheat is nevertheless possible, at least by using selected accessions that are comparatively amenable to methods of DNA transfer. Such experimental model genotypes are, for example, the barley cultivar Golden Promise and the Mexican wheat breeding line Bobwhite SH9826 [11]. For stable DNA transfer in cereal crops, immature zygotic embryos are most widely used. Importantly, such embryos must be of a developmental stage at which highly totipotent cells are still abundantly present. In immature embryos of barley and wheat, such cells are preferentially residing in the area that surrounds the shoot apical meristem and the scutellum, respectively. Stable transgenic wheat and barley plants were already produced by ballistic transfer of plasmid-coated gold particles to immature embryos in the early 1990s [73, 74]. Using hypervirulent bacterial strains, which had initially been used for the transformation of rice [75], thereafter it was soon also possible to generate transgenic barley and wheat plants using this principle [76, 77]. Today, it is routinely possible to generate stable transgenic plants from over 10% of inoculated immature embryos of barley [78], while in wheat, efficiencies of about 5 percent have been achieved both via *Agrobacterium*-mediated and ballistic DNA transfer [79, 80]. However, a largely improved protocol was more recently demonstrated to allow for much improved transformation efficiency in wheat ([81, 82]. The comparative examination of a variety of genotypes has shown that although some can indeed be transformed in addition to the model lines, the efficiency, however, is much reduced [83, 84]. Previous studies on Cas9-induced mutagenesis of barley have been based without exception on *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. In contrast to this, site-directed mutagenesis in wheat has mostly relied on ballistic gene transfer [85].

Another particularly interesting principle of DNA transfer into cereal cells is the use of immature, single-celled pollen (microspores), which can undergo cell proliferation and embryogenic development under suitable culture conditions [86]. Since pollen consists of haploid cells, it is possible that homozygous transgenic plants can be directly produced via this developmental pathway in association with DNA transfer and whole genome duplication. *Agrobacterium*-mediated DNA transfer in embryogenic pollen cultures of barley has the further advantage that a winter barley variety can be used, which is comparatively difficult via DNA transfer to immature embryos [87, 88]. A similar transformation method has been reported also for wheat, which is,

however, based on ballistic DNA transfer [89]. In the authors' laboratory, barley mutants have already been produced via the pollen embryogenesis pathway using TALENs [90], as well as by Cas endonucleases. Furthermore, the production of stable transgenic barley and wheat by ballistic DNA transfer into meristematic tissue from the shoot apex of embryos prepared from mature grains was also successful [91, 92]. This method has potential because of particularly low genotype dependence, since plant regeneration is based on conventional germination of the embryos, and therefore no formation of adventitious shoots is necessary. More recently, Hamada et al. [93] have also demonstrated that the production of plants with site-directed modifications using gRNA/cas9 constructs is possible using this method.

After alteration of the genomic target motif, the presence of transgenes coding for gRNA and endonuclease is not only unnecessary but also undesirable, as off-targets can still be mutated, even if they are not identical with the on-target. In this context, an advantage of the application of Cas endonucleases compared to conventional genetic engineering is that the integration site of the transgenes is mostly not coupled with the site of the desired genetic modification. Thus, the elimination of these transgenes by genetic segregation of progeny is comparatively straightforward while maintaining the desired modification. Endonuclease-triggered genetic alterations in primary transgenic plants are often heterozygous and restricted to tissue sectors. Therefore, progeny needs to be screened in order to select homozygously mutated individuals. Consequently, no extra time is required to obtain transgene-free mutants. Haploid technology is a particularly elegant solution for the separation of achieved genetic modifications from unnecessary transgene insertions or for the segregation of several mutations present in chimeric plants of the M₁ generation. With this technology, populations of completely homozygous recombinants can be obtained, in which desired genotypes are present at a much higher frequency than among offspring derived from conventional selfing [94, 95].

In addition to the various possibilities of genomic integration of gRNA and *cas* endonuclease genes, methods for transient expression have also been established, which is of considerable value for the preliminary validation of target-specific gRNAs, Cas endonuclease variants, and any further components used in this context. The most widely used transient expression method is based on the transfection of isolated mesophyll protoplasts, whose plasma membrane is rendered porous by application of polyethylene glycol. This enables transgenic plasmid DNA, *in vitro* transcribed RNA, bacterially pre-produced Cas protein, or ribonucleoprotein complexes to be taken up by the protoplasts. This has been exemplified, amongst others, in wheat and barley [39, 57, 96]. The activity of the transferred components can then be checked after amplification of the genomic target regions using the T7E1 assay, by Sanger or deep sequencing, as is described in more detail further down below. Another method for the functional validation of gRNA/*cas* constructs by transient expression is based on the ballistic transformation of leaf epidermis. Epidermal cells are comparatively well suited to be screened microscopically, for instance in regards to Cas-induced restoration of a reporter gene construct [97]. Barley leaf tissue has been used to demonstrate precise editing via homology-based DNA repair using a synthetic DNA repair template [98].

As an alternative to the expression of gRNA- and Cas-encoding DNA, *in vitro* transcribed RNA or Cas protein can be transferred to plant cells in order to make specific modifications to the genome. Guide RNA and Cas endonuclease can also be pre-assembled to form gRNA/Cas9 ribonucleoprotein complexes prior to their transfer into plant cells. The use of pre-produced RNA and protein molecules or complexes thereof has the advantage over DNA that their effective amount is independent of the expression profile and strength of plant promoters. In addition, the activity of these components is limited in time, as they are not continuously delivered by gene expression but are subject to cellular degradation. Accordingly, fewer mutations will occur in off-target motifs during the subsequent development of the plants. A further advantage is that mutated progeny do not have to be examined for the loss of integrated gRNA- and Cas9-encoding DNA sequences, as all mutated individuals can be used without restriction due to their transgene-

free nature. In wheat, the *GW2* gene was used as an example to show that the transfer of *in vitro* transcribed RNA coding for both gRNA and Cas9 leads to mutations in one percent of ballistically transformed cells [99]. About one third of the resulting plants were mutated in all six copies of the hexaploid genome. Compared to the transfer of gRNA and *cas9* transgenes, however, this method had a mutation rate that was about 60 percent lower. Liang et al. [96] achieved an improvement in mutation efficiency by assembling gRNA and Cas9 into ribonucleoprotein complexes before ballistic transfer into immature embryos. After selection-free plant regeneration, mutants were identified with a frequency of more than four percent, which is on a par with the efficiency of conventional wheat transformation.

2.2.4. From Site-Directed Mutagenesis to Precise Genome Editing

Current utilization of Cas endonuclease technology is still largely limited to random alterations of the DNA sequence at the user-defined genomic sites. This comparatively simple approach of site-directed mutagenesis relies on the error rate of the DNA repair mechanism, called non-homologous end-joining (NHEJ), which is predominant in plant cells. In this process, the two DNA ends resulting from a double-strand break are recognized and relegated irrespective of their nucleobase sequence.

Increased predictability of site-directed modifications was shown to result, for example, from two simultaneously induced DNA breaks, which can lead to the precise deletion of the interjacent fragment [22]. In addition, microhomology-based DNA repair produces predictable deletions in a comparatively simple way, provided that identical sequence repeats are present at both DNA ends that are to be relegated [100].

A more ambitious approach is the so-called base editing, in which a single nucleotide is specifically converted into another so that no more than one amino acid of the encoded protein is altered at a time [101]. For this purpose, a Cas-based nickase, that is, a Cas endonuclease derivative that cuts only one strand of DNA due to the mutative alteration of one of its two nucleolytic domains, is bound to a natural or artificial nucleobase deaminase enzyme [102]. Cytidine deaminases can convert C/G basepairs to T/A in the target region, whereas adenosine deaminases induce A/T to G/C conversions [102, 103]. The functionality of cytidine and adenosine deaminases has already been demonstrated in several plant species, including wheat [104, 105]. The effective base editing area ranges in dependence of the base editor used, e.g., the cytidine deaminase used by Zong et al. [104] can convert positions 1 to 17 within the target site and the adenosine deaminase used by Li et al. [105] is capable of converting positions 4 to 8.

In addition to the aforementioned error-prone non-homologous end-joining (NHEJ) DNA repair mechanism that predominates in plant cells, homology-directed repair (HDR) can also be used to generate precise genome alterations, albeit this process is much less active in somatic cells. Homology-directed repair naturally involves the sister chromatid of the same chromosome or the homologous chromosome as the correct sequence template, allowing the original sequence to be restored, even in cases of comparatively severe DNA damage. By using artificial DNA repair templates that are partially complementary to the site of the plant genome to be modified, it is possible to make even fairly large modifications precisely, as specified by the experimenter [106]. However, due to the methodological challenges, there are very few examples of this precise editing in plants published thus far. A first experimental approach involved the stable integration of the repair template together with the gRNA- and Cas-encoding expression units into the plant genome. The integrated repair template is flanked by the target sequences of the gRNA-mediated endonuclease used, so that it is cut out by the Cas restriction enzyme. This principle has proven to be sufficient in *Arabidopsis* [107]. The use of paired Cas9 nickases, which generate two single-strand breaks on the two opposite DNA strands, has increased the efficiency of homology-directed DNA repair [50, 108, 109]. With geminivirus replicons as carriers of the repair template, the dose

per cell is increased. In this case, a strain of the *Bean Yellow Dwarf Virus* was modified so that only the elements essential for the method remained and the artificial repair template was amplified with high frequency [110]. In barley and wheat, precise editing has been achieved either only at the cellular level [98] or has the limiting prerequisite that the obtained genetic modification leads to an in vitro selectable trait, e.g., an herbicide resistance [111].

2.2.5. Identification and Characterization of Site-Specifically Modified Plants

The presence of gRNA- and Cas-encoding expression units is usually tested by PCR amplification [112, 113]. In some studies, the expression of gRNA and cas9 was additionally assessed by RT-PCR, which can be very informative, especially in the process of method establishment [37]. For the detection of site-directed modifications, PCR products derived from the genomic target region can be analyzed using various methods. Digestion of the PCR product using conventional restriction enzymes is the most straightforward approach. However, the prerequisite for this is that the restriction site of the Cas endonuclease lies within a recognition sequence of the conventional restriction enzyme that then can be used for the test. In contrast to the wild-type sequence, PCR products of mutated target motifs cannot be digested by this enzyme [34]. A disadvantage of this method is that the choice of target motifs is substantially limited. This can be circumvented using the T7E1 assay, in which a mixture of PCR products of mutant and wild-type alleles is digested by the mismatch-sensitive T7 endonuclease I [39, 114]. Another disadvantage these methods have in common is that their sensitivity is low, i.e., if mutated alleles of a plant are limited to small tissue sectors, detection may be not possible. This leads to a certain number of mutants not being identified.

To avoid this problem, Liang et al. [115] used target-specific synthetic gRNA and Cas9 protein for in vitro digestion of PCR products from genomic targets. This method is independent of conventional restriction sites in the target motif and was reported to be extremely sensitive. However, a large-scale application of this approach is hampered by the fact that recombinant Cas protein is fairly expensive.

As compared with the aforementioned restriction-based assays, sequencing of PCR product derived from the genomic target region is more informative. In heterozygous or chimeric mutated plants, the sequencing chromatogram shows double and multiple peaks at the individual base positions, which usually starts at the restriction site of the Cas endonuclease and continues in the same direction as the sequencing was conducted. Various bioinformatic tools, such as Tracking of Indels by DEcomposition (TIDE) [116] and DSDecode [117], provide the opportunity to read out such peaks, thereby determining the different allele variants present in the analyzed plant sample. A more reliable approach involves the analysis of several single clones via Sanger sequencing, as this provides a detailed breakdown of the mutations present in the analyzed sample. In addition, more conclusive information on the proportions of the mutated alleles can be obtained. In this context, it is important to consider that Cas endonuclease-triggered mutations are usually heterozygous and often limited to sectors of the plant. Moreover, leaf samples are not necessarily representative for the whole plant. This phenomenon is reflected by the observation that not all mutations detected in primary mutants are inherited by subsequent generations. In addition to Sanger sequencing, deep sequencing methods can be used to analyze mutations in individual plants, which is particularly informative owing to the obtained amount of data [48, 118]. In practice, it is typically necessary to find a reasonable compromise between workload, conclusiveness of assays, and costs. Therefore, a combination of different methods is often the most suitable solution [40, 42].

The molecular analysis of candidate plants can also address accidental modification of so-called off-target sites, which can cause undesired side effects and also influence the efficiency of on-target mutagenesis. In plants, the proportion of off-target mutations is typically below 1% [119].

In contrast to human cells, this does not pose a serious problem. These mutations are often confined to small sectors that are usually not passed on to offspring. Furthermore, due to the high specificity of the gRNA/Cas complex, possible off-target sites are well predictable so that progeny can be readily tested to eliminate segregants with unwanted mutations.

Since primary mutants are often chimeric or heterozygous and integrated *cas9* and gRNA transgenes can be inherited, the analysis of progeny is essential to identify homozygous mutants that are null segregants in regards to the transgenes [35, 112]. It is not recommended to spend too much effort for phenotypic analyses of primary mutants, because in addition to their uncertain genetic homogeneity and zygoty, the general fitness of these individuals is typically strongly affected owing to the manipulation and culture procedure they have gone through [120]. Importantly, it is advisable to use non-transgenic, non-mutant segregants as wild-type controls for the analysis of plant traits, because the comparison with other plants bears a fairly high risk of obtaining misleading results. A survey of the general workflow of targeted genome modification in barley and wheat is depicted in Figure 2-1.

2.3. Applications

While in this section only some representative examples for applications of Cas endonuclease technology in barley and wheat are presented in more detail, Table 2-1 provides a comprehensive overview of studies hitherto published on these crops.

In 2013, Upadhyay et al. [37] were the first to show that Cas endonucleases are in principle applicable in a *Triticeae* species and especially in the large and complex genome of wheat. However, this study was still confined to site-directed mutagenesis in a cell suspension, from which no plants can be regenerated. Mutations were detected in 18 to 22 percent of the sequenced amplicons derived from target regions of the *INOSITOL OXYGENASE (TaINOX)*, and *PHYTOENE DESATURASE (TaPDS)* genes. The first plants carrying Cas endonuclease-induced mutations were presented by Wang et al. [39]. While heritable loss-of-function mutations were induced in all three homoeologues of the *MILDEW-RESISTANCE LOCUS O (TaMLO)* gene by the use of TALENs, Cas9-triggered mutations were still confined to the A subgenome. Using two wheat backgrounds, the authors produced a total of 687 gRNA/*cas9* primary transgenic plants, of which about 5 percent proved to carry mutations in the target motif. However, in contrast to the TALEN-induced ones, the heritability of these mutations was not shown.

The first published use of Cas endonucleases in barley aimed to induce mutations in *HvPM19* [35], which encodes an ABA-induced plasma membrane protein previously described in wheat as a positive regulator of dormancy. Four copies of this gene are present in barley. For two of those, knockout mutants were generated. Amongst 13 primary transgenic plants, three carried mutations in *HvPM19-1*, whereas one *HvPM19-3* mutant was found amongst ten T₀ plants. While this study was the first to provide evidence for the heritability of Cas9-induced mutations in a *Triticeae* crop, a resultant phenotype was not described.

Once the applicability of Cas endonuclease technology to achieve heritable mutations was shown for barley and wheat, this principle was used for many further approaches. Holme et al. [40] used Cas endonuclease-induced mutations to investigate the function of the *PHYTASE GENE A* of barley. *HvPAPhy_a* acts as the main regulator of phytase content in the barley grain. Phytases are important sources of bioavailable phosphorus, and therefore particularly important for germination. To reduce the activity of *HvPAPhy_a* independently of *HvPAPhy_b*, which is very similar in its gene sequence, Holme et al. specifically mutated the promoter of *HvPAPhy_a*. While small insertions and deletions in homozygous mutant progeny had only little effect, larger deletions, which also affected exon 1 of the target gene, caused a significant reduction of phytase activity.

2. Cas Endonuclease Technology – A Quantum Leap

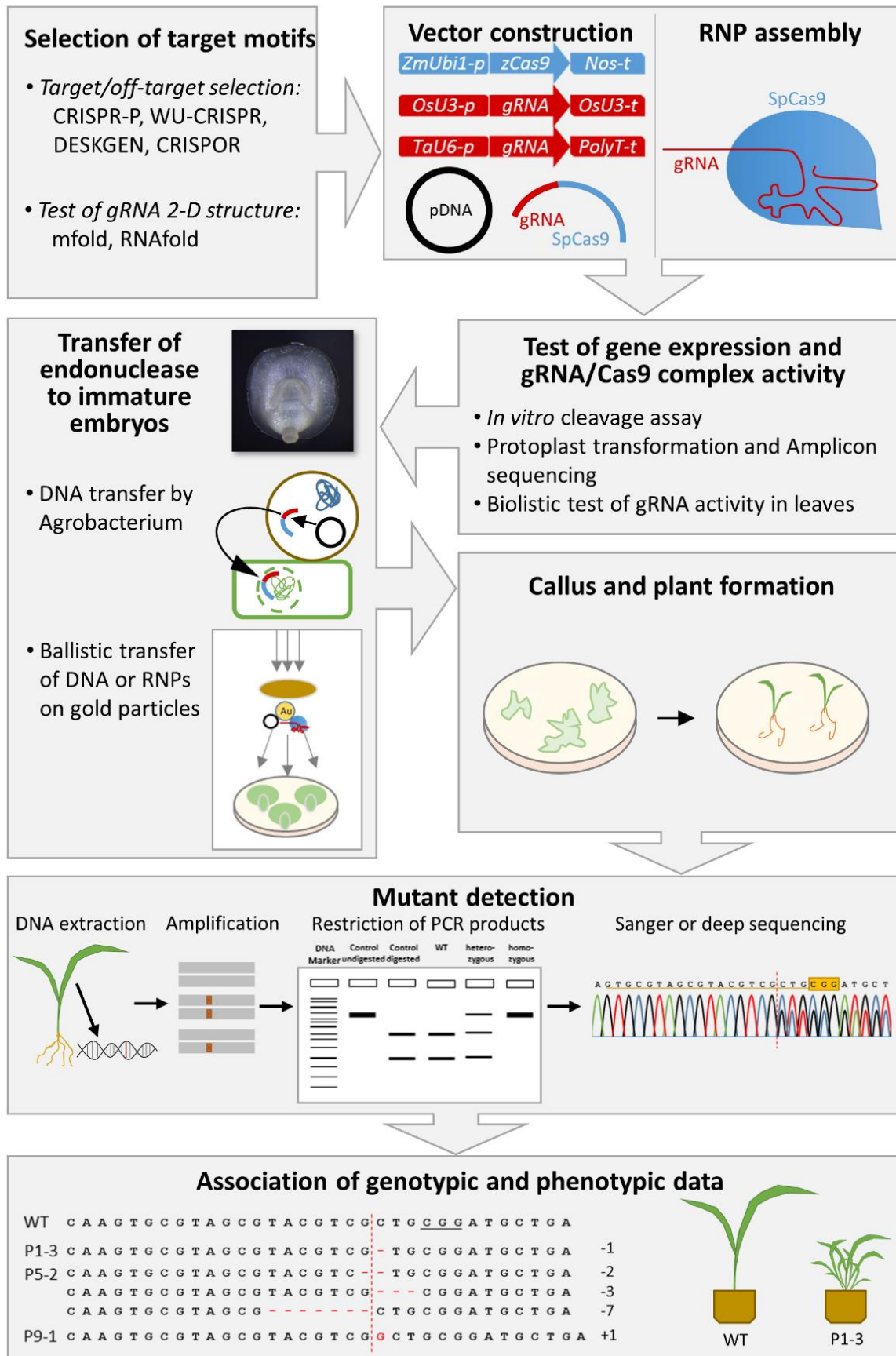


Figure 2-1: General workflow of targeted genome modification in barley and wheat, including target motif selection, vector construction, vector tests, gRNA and Cas9 delivery, plant regeneration, mutant detection, and genotypic and phenotypic analyses.

Taking a Cas9-mediated knockout approach, Wang et al. [118] investigated the function of the *GW2* gene of wheat. The rice orthologue of *TaGW2* had been previously described as a negative regulator of grain size and thousand-grain weight. Wang et al. produced knockout mutants for all three subgenomes of wheat by RNA-guided Cas9 and generated all possible combinations of mutated homeoalleles by crossing. The knockout of individual *TaGW2* homeologues in any of the subgenomes increased the size of the wheat grain, as well as the thousand-grain weight. Consequently, the authors concluded an additive effect of all three *TaGW2* homeologues [118]. Gluten in the wheat grain is relevant for the baking properties of the flour. This protein fraction is encoded by about 100 genes. Gluten intolerance is mainly based on the immune response to a particular peptide within the α -gliadins, which are encoded by 45 genes. Sánchez-León et al. [113] designed two guide-RNAs specific to the gene region encoding the hyperallergenic epitopes and produced bread and durum wheat lines with knockout mutations in up to 33 of the 45 α -gliadin genes. Thus, immunoreactivity was reduced by as much as 85 percent. The inheritance of the mutations and their effect on the α -gliadin content were followed over three generations. In order to further reduce the immunogenic α -gliadins in wheat, further work is still necessary [113]. In barley and wheat, Cas endonucleases have been mainly used for the investigation of gene functions by knockout, for the modification of metabolite contents and to increase resistance to fungal pathogens (Table 2-1). These studies show the great potential of this technology for research and breeding. In addition to the generation of random sequences at the target site, more recent work has demonstrated predictable nucleobase exchanges in wheat by the use of a chimeric Cas9 derivative, which consists of a nickase and an adenosine deaminase [105]. This base editing approach opens up further possibilities of generating functional gene variants rather than knockout alleles.

2.4. Regulation

Parallel to the development of the Cas endonuclease technology, science organizations, politicians, and society are dealing with the effects of the technology. The following section will briefly address some related aspects, in particular the regulation of plants that carry site-directed mutations. The focus here is on the USA and Europe, as these two have very contrasting approaches.

For the United States, Wolt and Wolf [121] summarized the regulation of the so-called green biotechnology, and in particular the use of customizable endonucleases. Commencing at the Asilomar conference on biosafety in 1975, a regulatory framework for plants with recombinant DNA has been developed in the USA since the mid-1980s. Over the years, this framework became more and more complex due to more accompanying research and the increasingly lengthy periods needed for decision-making. Although the focus of regulation in the United States is on the product, the procedure also includes process-based facets. For example, genetically engineered plants have to undergo special approval procedures. However, these differ between plants that have been transformed by use of the plant pathogen *Agrobacterium* and those that have been ballistically transformed. If plants with an identical trait are produced without genetic engineering, no special regulation takes place. For plants bred by use of customized endonuclease technology, the portal “Am I regulated?” has been established, in which the USDA made case-by-case statements at short notice as to whether a plant needs to be regulated or not. In 2017, work began on revising the regulations on biotechnology. The major trigger for regulation was shifted towards the process by a redefinition of “genetic engineering” as “mean techniques that use recombinant or synthetic nucleic acids with the intent to create or alter a genome”. This is not applied to processes of targeted genome modification that cause deletions or base edits or result in the targeted insertion of a DNA fragment, which would also be possible by conventional breeding, conventionally induced mutagenesis or even without any human intervention [121].

In a detailed report in 2017 [122], the European Academies' Science Advisory Council (EASAC) stressed the possibilities that targeted genome modification offers. In plant breeding, improved precision compared to undirected mutagenesis methods represents a significant advance. At the same time, some representatives of non-governmental organizations and political parties are viewing biotechnological breeding methods critically. According to EASAC, this gives science a special responsibility to explain its work. In regards to plant breeding, EASAC recommends to politicians not to regulate transgene-free plants carrying site-directed modifications as being "genetically engineered" in the sense of the EU Directive 2001/18/EC on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms. Additionally, it advises a revision of the European genetic engineering legislation with a stronger focus on the product instead of the breeding process. The need for international compatibility of regulation is emphasized and reference is also made to best practices from other countries, such as the United States, where site-directed mutagenesis is not regulated as genetic engineering [122].

While some countries, including the United States, Argentina, Brazil, Chile, and more recently Australia, have already made decisions to regulate targeted mutagenesis on a case-by-case or general basis not differently than conventional methods of plant breeding, in Europe, those varieties are the subject of the Directive 2001/18/EC. According to that, field trials with plants carrying targeted mutations need special permission on application, and placing respective varieties on the market needs tedious and very costly approval procedures. The European plant research community has responded to this with demands for a revision of European genetic engineering legislation. For more details see Sprink et al. [123] or the position paper of 95 European plant research institutions (<http://www.vib.be/en/news/Documents/Position%20paper%20on%20the%20ECJ%20ruling%20on%20CRISPR%2012%20Nov%202018.pdf>).

In many countries in the world, decisions on how to regulate plants generated using customized endonucleases are currently pending. They will play a key role in deciding how and by whom these technologies and their possibilities can be used.

2.5. Perspective

The new possibility of utilizing customized endonucleases in barley and wheat opens up a broad spectrum of opportunities for applications. A generally limiting aspect, however, is that the genetic transformation of cereals poses a particular challenge. In the context of the question for new or improved methods of transferring DNA into regenerable cells of cereals, it has to be considered that a number of methods have already been developed, but have not yet been utilized for the application of Cas endonucleases. A remarkable example of this is the use of isolated microspores or embryogenic pollen cultures generated from them for DNA transfer using *Agrobacterium* [87], ballistics [89] or electroporation [124]. When it comes to the development of new methods, particular attention must also be paid to the fact that they should be applicable to a broad spectrum of genetic backgrounds, which unfortunately does not apply to any of the methods used to date. On the other hand, the particular advantage of Cas endonuclease technology will only be fully exploited if it is possible to directly modify any plant genotype of choice. This is the only way to completely overcome the cumbersome introgression of advantageous gene variants into elite germplasms, and above all, the genetic coupling of desired alleles with undesired ones. In this context, the dissection and culture of ovules is another remarkable possibility for the *in vitro* regeneration of wheat and barley [125, 126]. For the *Agrobacterium*-mediated DNA transfer into cultivated ovules, in which the T-DNA is transferred into few-celled proembryos, it was shown that this method has comparatively low genotype dependence [127]. In all studies published to date in which heritable site-directed modifications have been achieved in the barley and wheat genomes using Cas endonuclease technology, the *POLYUBIQUITIN1*

promoter from maize was used to express the cas9 gene. For the stable expression of protein-encoding transgenes in the *Triticeae*, however, a vast number of further promoters with different activity profiles are available, some of which may also be used for Cas endonucleases [128, 129, 130]. In addition, there is, thus far, unexploited potential for the expression of gRNAs in barley and wheat. For instance in rice, a t-RNA processing-based system was established, in which multiple gRNAs are released from a complex transcript by endogenous RNases [50, 131].

To keep pace with the frequent emergence of novel Cas and gRNA formats, as well as regulatory and further functional elements, several modular vector systems have been developed that allow for a rapid and versatile assembly of any combination of components of choice. Some of these systems may also be useful for the application in the *Triticeae* cereals [45, 50].

Whereas site-directed mutagenesis represents the currently well-established state of the art of Cas endonuclease technology, more precise techniques of targeted genome modification have unfortunately not yet become routine, and are at best exemplary in plants. A portfolio of chimeric Cas derivatives is now available for the so-called base editing using nucleoside deaminases, which allows conversions from G to A, C to T, T to C, and A to G. Thus, the vast majority of spontaneous point mutations occurring in nature can be specifically generated, or if desired, the corresponding wild-type alleles can be restored as well [103]. A broad application of precise genome editing in association with DNA repair templates, on the other hand, still poses particularly great methodological challenges. Homology-based repair, for example, is comparatively rarely occurring, which entails a correspondingly low efficiency of conventional selection marker genes whose genomic integration and expression is too poorly associated with template-mediated repair events. In addition, the artificial repair templates must compete with the naturally recruited homologous sequences present in the cell on sister chromatid and homologous chromosome(s), which further reduces the efficiency of targeted modification.

A further limitation of Cas endonuclease technology is that the binding site of the gRNA/Cas complex cannot be predefined entirely at will. The most commonly used enzyme for target sequence-specific genome modification is Cas9 from *Streptococcus pyogenes*. This enzyme requires the aforementioned protospacer-adjacent motif (PAM) NGG for binding to the genomic target. However, there are several other Cas9 variants that require other cognate DNA motifs. Such Cas9-orthologous enzymes are known from various representatives of the genera *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Campylobacter*, and *Neisseria* [132, 133, 134]. In *Arabidopsis*, for example, the *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus thermophilus* Cas9 variants have already been used in addition to the standard SpCas9 [135]. Furthermore, in order to extend the flexibility in the choice of targets beyond the naturally occurring PAMs, Hu et al. [136] developed an artificial Cas9 variant. The advantage of this “expanded” Cas9 (xCas9) is that almost any nucleobase triplet is accepted for its binding to the genomic target. The synthetic Cas9-NG, which was developed in a different way and published shortly thereafter, proved to be even more efficient than xCas9 in many PAM variants [137].

While Cas9 endonucleases are widely employed in plants, Zetsche et al. [138] described another Cas endonuclease, namely Cas12a (Cpf1) from *Francisella novicida*, that can also be used to induce targeted alterations in genomes. Later, Cas12a-orthologous enzymes from other bacteria were also successfully used [139]. Besides some other peculiarities, Cas12a, in contrast to Cas9, produces 5'-overhangs rather than blunt DNA ends. This provides a particularly attractive option for the establishment of robust methods of precise genome editing using homology-directed DNA repair.

Cas endonucleases have also been modified in such a way that they induce single-strand breaks in double-stranded DNA. Among such nickases, there are specific variants for each of the two DNA strands [12, 140]. In *Arabidopsis*, paired nickases derived from Cas9 were used to demonstrate that both the specificity of the binding to the genomic DNA and the efficiency of homology-directed DNA repair can be increased [50,108,109].

Whereas knockouts are the standard outcome of site-directed mutagenesis, the possibility to achieve quantitative changes in the functionality of target genes has not yet been exploited in cereals. Using tobacco as experimental model, Schedel et al. [141] have shown that in-frame mutations can maintain gene functionality to a reduced extent. This can be of particular value for the targeted modification of genes that are essential for the plant or the generation of new allelic diversity for the use in plant breeding. In a particularly elegant approach, Rodriguez-Leal et al. [142] produced tomato lines with various *CLAVATA3* alleles by simultaneous expression of several gRNAs specified for different target motifs in the promoter of this gene. The resultant gene variants led to a whole series of lines with different fruit sizes according to the individual strength of *CLV3* expression.

In other crop plants, there are various application examples of customizable endonucleases, which may also be considered for breeding programs in the *Triticeae* cereals. Since every characteristic of plants is largely genetically determined, it must in fact be possible to improve every trait that is relevant for the utility value of crops by employing Cas endonuclease technology. Due to these extensive possibilities, only a few of the promising options can be mentioned here as examples. A potential field of application for Cas endonucleases is the establishment of resistance to various potyviruses, which has already been achieved, for example, in cucumber. The established resistance relies on the knockout of the host plant's *EIF4E* gene, which is essential for the translation of viral mRNAs [143]. Resistance-conferring alleles are also known from a related barley gene [144, 145]. In addition, there are a number of susceptibility genes for diseases caused by other pathogens, which is similarly suitable for resistance breeding.

The ability of Cas endonucleases to completely eliminate the function of a gene seems particularly attractive when it comes to freeing crops from toxic, carcinogenic, allergenic, or bad-tasting gene products or metabolites. The aforementioned study by Sanchez-Léon et al. [113] on the production of wheat with gluten, whose fraction of immunodominant gliadins is drastically reduced, is a promising example in this respect. Another potential use of Cas endonuclease technology results from the fact that most modern durum wheat varieties carry a mutation in a heavy metal transporter gene, which entails a reduced sequestration of cadmium in the roots so that this toxic element accumulates in the grain to an extent that is of concern in terms of human health [146]. The restoration of the corresponding wild-type allele would, therefore, be a particularly promising way of improving the quality of pasta, which is widely consumed across the entire globe.

As has already been demonstrated in potato [147] and rice [148], it is also possible to modify the starch quality by specifically modulating the biosynthesis of the major starch components amylose and amylopectin. While amylose-free starch is of particularly high value for the paper and chemical industries, starch with reduced amylopectin content is referred to as resistant starch, which, due to its fiber-like properties, has the potential to counteract type-2 diabetes, a civilization disease that is now increasingly spreading even in developing countries.

For future approaches, it is also conceivable to modify many different genes in one step, for instance to influence complex processes such as photosynthesis [149]. Cas endonuclease technology offers unprecedented prerequisites for this due to the option of simultaneous use of numerous gRNAs.

In summary, it can be stated that the establishment of Cas endonuclease technology represents a quantum leap for plant research and breeding. Even with regard to major methodological challenges, the current pace of research and development in this field means that further very useful solutions are highly probable in the near future. The implementation of this technology, especially in the agronomically important cereals of the *Triticeae* cereals, will likely continue to gain momentum, and is thus expected to increasingly contribute to the effective production of sufficient and high-quality food, feed, and industrial raw materials, while ensuring largely improved environmental compatibility of agriculture.

2.6. Author Contributions

Conceptualization, J.K.; collection of information, I.K., C.H., R.H., J.K.; writing—original draft preparation, I.K., C.H., R.H., J.K.; writing—review and editing, I.K., C.H., R.H., J.K.; supervision, J.K.; funding acquisition, J.K.

2.7. Funding

This research was funded by the German Federal Ministry of Education and Research, project grants OSIRIS (FKZ 031B0201) and IDEMODERESBAR (FKZ 031B0199).

2.8. Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

2. Cas Endonuclease Technology – A Quantum Leap

Table 2-1: Survey of studies employing Cas endonuclease technology in wheat and barley. If not stated otherwise, gRNA and Cas9 were delivered as transgenes, the outcome was site-directed mutagenesis (i.e., random InDels at the target sites), and genetic modifications were shown to be heritable. IEs: immature embryos, RNP: gRNA/Cas9 ribonucleoprotein.

Target Gene	Reagent Delivery, Recipient Cells, Genotype, Notes	Aim of the Study	Efficiency of Targeted Mutagenesis	Observed Phenotype	Reference
Wheat					
<i>INOSITOL OXYGENASE (INOX), PHYTOENE DESATURASE (PDS)</i>	Agrobacterium, callus-derived cell suspension, genotype not reported	method establishment	mutations detected in cell suspension, no plants generated	not reported	[37]
<i>MILDEW RESISTANCE LOCUS O (MLO)</i>	ballistic, IEs of “Kenong199” and “Bobwhite”	resistance to powdery mildew	4 out of 72 T ₀ plants mutated in A-genome, heritability not shown	not reported	[39]
<i>GRAIN WIDTH 2 (GW2)</i>	ballistic transfer of RNP, IEs of “Kenong199”, selection-free regeneration	method establishment	28 primary mutants from 640 IEs, heritability not shown	not reported	[96]
<i>α-GLIADIN</i> gene family	ballistic, IEs of “BW208”, “THA53”, “Don Pedro”	reduced α-gliadin content in grains	Mutation rate in T ₀ not reported, 17 out of 17 analyzed T ₁ plants mutated, heritability of genotype and phenotype shown up to T ₃	reduced α-gliadin content in grains	[113]
<i>ENHANCED DISEASE RESISTANCE 1 (EDR1)</i>	ballistic, IEs of “KN199”	reduced susceptibility to <i>Blumeria graminis</i>	5 mutant T ₀ plants identified, 5 out of 207 analyzed T ₁ plants homozygously mutated in all 3 copies	resistance shown in homozygous T ₁ mutants	[150]
<i>PHYTOENE DESATURASE (PDS)</i>	Agrobacterium, IEs of “Fielder”	method establishment	up to 13 out of 73 T ₀ plants mutated, homozygous mutations in individual subgenomes shown in T ₂	not reported (no homozygous triple mutants)	[85]
<i>DEP1, GRAIN WIDTH 2 (GW2)</i>	PEG-mediated transfection, protoplasts of “Kenong199”, ballistic, IEs of “Kenong199”	establishment of base editing using adenosine deaminase fusion to nCas9	up to 7.5% of NGS reads from target amplicons showed A → G conversion, 5 (<i>DEP1</i>) and 2 (<i>GW2</i>) regenerated T ₀ plants showed heterozygous mutations, no heritability reported	not reported	[105]

2. Cas Endonuclease Technology – A Quantum Leap

Target Gene	Reagent Delivery, Recipient Cells, Genotype, Notes	Aim of the Study	Efficiency of Targeted Mutagenesis	Observed Phenotype	Reference
<i>ZIP4-B2</i> (homoeolog of B genome only)	Agrobacterium, IEs of “Fielder”	increase of crossover frequency	4 out of 81 analyzed T ₀ plants mutated, 24 T ₁ plants (progeny of 1 T ₀ plant) analyzed	increase of homologous crossovers in KO-mutants under presence of magnesium	[151]
<i>GRAIN WIDTH 2 (GW2-ABD)</i> , <i>9-LIPOXYGENASE (LPX-1-BD)</i> , <i>MILDEW RESISTANCE LOCUS O (MLO)</i>	Ballistic, IEs of “Bobwhite”	GW2: increased grain size and weight, LPX-1 and TaMLO: resistance to fungi	20 out of 102 T ₀ plants with triple gRNAs mutated, 6 out of 61 T ₀ plants with GW2-gRNA mutated, heritability analyzed by amplicon NGS in progeny of 2 T ₀ plants, several T ₁ plants heterozygous for GW2 or MLO, homozygous T ₁ for GW2	GW2-KO: increased thousand-grain weight by 27%	[48]
<i>MALE STERILITY 45 (MS45)</i>	Agrobacterium, IEs of “Fielder” and ‘SBC0456D’	male sterility	25 out of 181 analyzed T ₁ plants mutated in different combinations (single, double, triple KOs)	triple mutants (ABD-KO) proved to be male sterile	[152]
<i>GRAIN WIDTH 2 (GW2)</i>	ballistic, IEs of “Bobwhite”	increased grain size and weight	T ₁ , T ₂ , T ₃ mutants derived from Wang et al. (2018a) used to generate single, double, and triple KO-mutants	thousand-grain weight increased, dosage effect of homeoalleles shown	[118]
<i>PURINDOLINE b (PINb)</i> , <i>GRANULE-BOUND STARCH SYNTHASE (WAXY)</i> , <i>DA1</i>	Agrobacterium, IEs of “Fielder” (DA1 only)	PINb: grain hardness, WAXY: starch composition, DA1: grain size	13 out of 24 T ₀ plants DA1-target mutated in A or B genome, heritability not shown	not reported	[153]
Barley					
<i>PM19-1</i> and <i>PM19-3</i>	Agrobacterium, IEs of ‘Golden Promise’	seed dormancy	3 out of 13 analyzed T ₀ plants mutated (<i>PM19-1</i>), 1 out of 10 analyzed T ₀ plants mutated (<i>PM19-3</i>), heritability of mutations shown in progeny of 4 identified mutants in T ₂ , off-target mutations found in other copies of <i>PM-19</i>	not reported	[35]

2. Cas Endonuclease Technology – A Quantum Leap

Target Gene	Reagent Delivery, Recipient Cells, Genotype, Notes	Aim of the Study	Efficiency of Targeted Mutagenesis	Observed Phenotype	Reference
Promoter of <i>PHYTASE GENE A (PAPhy_a)</i>	Agrobacterium, IEs of “Golden Promise”	reduced phytase content in the grain	28 out of 64 T ₀ plants 28 mutated, heritability shown in T ₂	homozygous T ₁ mutants showed reduced phytase activity	[40]
<i>ENDO-N-ACETYL-β-D-GLUCOSAMINIDASE (ENGase)</i>	ballistic and Agrobacterium, IEs of “Golden Promise”, co-transformation for fragment deletion	N-glycan modification in the grain	ballistic: 7 out of 8 T ₀ plants mutated, Agrobacterium: 15 out of 23 T ₀ plants mutated, 6 plants with targeted deletion between two targeted positions, heritability shown in T ₁ , homozygous mutants	N-glycan modification in the grain	[112]
<i>CYTOKININ DEHYDROGENASE (CKX)</i>	Agrobacterium, IEs of “Golden Promise”	gene function in cytokinin metabolism	15 out of 23 T ₀ plants mutated, heritability shown in T ₁ , 4 homozygous KO-mutants selected for further analysis	KO-mutants showed higher cytokinin content and slightly reduced root growth	[154]
<i>PHYTOENE DESATURASE (PDS)</i>	Agrobacterium, IEs of “Golden Promise”	photo-bleaching	6 out of 40 T ₀ plants mutated, heritability not reported	chimeric photobleaching in T ₀ mutants	[85]
Member of <i>MICRORCHIDIA GHKL ATPASE</i> subfamily (<i>MORC1</i>)	Agrobacterium, IEs of “Golden Promise”	resistance to fungal pathogens	callus screened for mutations, progeny of randomly selected T ₀ plants screened for mutations, 12 and 10 T ₁ families analyzed for two constructs, mutations in 19 of the 22 families, proportion of mutated plants not reported	homozygous <i>morc1</i> -KO T ₁ plants were less susceptible to fungal pathogens and showed higher expression of transposons	[45]
<i>PROTEIN TARGETING TO STARCH 1 (PTST1), GRANULE-BOUND STARCH SYNTHASE (GBSS1a)</i>	Agrobacterium, IEs of “Golden Promise”	starch accumulation in the grain	6 out of 8 (<i>PTST1</i>) and 5 out of 9 (<i>GBSS1a</i>) T ₀ plants mutated, heritability shown in T ₁	<i>ptst1</i> -KO: starch-free grains, no germination, <i>gbss1a</i> -KO: amylose-free grains	[155]

2.9. References Chapter 2

1. Baulcombe, D.; Crute, I.; Davies, B.; Dunwell, J.; Gale, M.; Jones, J.; Pretty, J.; Sutherland, W.; Toulmin, C. Reaping the Benefits: Science and the Sustainable Intensification of Global Agriculture; The Royal Society: London, UK, 2009; p. 72.
2. Ronald, P. Plant genetics, sustainable agriculture and global food security. *Genetics* **2011**, *188*, 11–20.
3. Global Warming of 1.5 °C; IPCC Special Report; IPCC: Geneva, Switzerland, 2018; Available online: <https://www.ipcc.ch/sr15/> (accessed on 28 May 2019).
4. Modrzejewski, D.; Hartung, F.; Sprink, T.; Krause, D.; Kohl, C.; Schiemann, J.; Wilhelm, R. What is the available evidence for the application of genome editing as a new tool for plant trait modification and the potential occurrence of associated off-target effects: A systematic map protocol. *Environ. Evid.* **2018**, *7*, 11.
5. Parry, M.A.J.; Madgwick, P.J.; Bayon, C.; Tearall, K.; Hernandez-Lopez, A.; Baudo, M.; Rakszegi, M.; Hamada, W.; Al-Yassin, A.; Ouabbou, H.; et al. Mutation discovery for crop improvement. *J. Exp. Bot.* **2009**, *60*, 2817–2825.
6. Reynolds, M.; Foulkes, M.J.; Slafer, G.A.; Berry, P.; Parry, M.A.J.; Snape, J.W.; Angus, W.J. Raising yield potential in wheat. *J. Exp. Bot.* **2009**, *60*, 1899–1918.
7. Sovová, T.; Kerins, G.; Demnerová, K.; Ovesná, J. Genome Editing with Engineered Nucleases in Economically Important Animals and Plants: State of the Art in the Research Pipeline. *Curr. Issues Mol. Biol.* **2017**, *21*, 41–62.
8. McCallum, C.M.; Comai, L.; Greene, E.A.; Henikoff, S. Targeting Induced Local Lesions IN Genomes (TILLING) for Plant Functional Genomics. *Plant Physiol.* **2000**, *123*, 439–442.
9. Comai, L.; Young, K.; Till, B.J.; Reynolds, S.H.; Greene, E.A.; Codomo, C.A.; Enns, L.C.; Johnson, J.E.; Burtner, C.; Odden, A.R.; et al. Efficient discovery of DNA polymorphisms in natural populations by Ecotilling. *Plant J.* **2004**, *37*, 778–786.
10. Herrera-Estrella, L.; Depicker, A.; van Montagu, M.; Schell, J. Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector. *Nature* **1983**, *303*, 209–213.
11. Kumlehn, J.; Hensel, G. Genetic transformation technology in the Triticeae. *Breed. Sci.* **2009**, *59*, 553–560.
12. Jinek, M.; Chylinski, K.; Fonfara, I.; Hauer, M.; Doudna, J.A.; Charpentier, E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* **2012**, *337*, 816–821.
13. Ramírez-González, R.H.; Borrill, P.; Lang, D.; Harrington, S.A.; Brinton, J.; Venturini, L.; Davey, M.; Jacobs, J.; van Ex, F.; Pasha, A.; et al. The transcriptional landscape of polyploid wheat. *Science* **2018**, 361.
14. Brenchley, R.; Spannagl, M.; Pfeifer, M.; Barker, G.L.A.; D'Amore, R.; Allen, A.M.; McKenzie, N.; Kramer, M.; Kerhornou, A.; Bolser, D.; et al. Analysis of the bread wheat genome using whole-genome shotgun sequencing. *Nature* **2012**, *491*, 705–710.
15. International Barley Genome Sequencing Consortium; Mayer, K.F.; Waugh, R.; Brown, J.W.; Schulman, A.; Langridge, P.; Platzer, M.; Fincher, G.B.; Muehlbauer, G.J.; Sato, K.; et al. A physical, genetic and functional sequence assembly of the barley genome. *Nature* **2012**, *491*, 711–716.
16. Mascher, M.; Gundlach, H.; Himmelbach, A.; Beier, S.; Twardziok, S.O.; Wicker, T.; Radchuk, V.; Dockter, C.; Hedley, P.E.; Russell, J.; et al. A chromosome conformation capture ordered sequence of the barley genome. *Nature* **2017**, *544*, 427–433.
17. Milner, S.G.; Jost, M.; Taketa, S.; Mazón, E.R.; Himmelbach, A.; Oppermann, M.; Weise, S.; Knüpffer, H.; Basterrechea, M.; König, P.; et al. Genebank genomics highlights the diversity of a global barley collection. *Nat. Genet.* **2019**, *51*, 319–326.

18. Plessis, A.; Perrin, A.; Haber, J.E.; Dujon, B. Site-specific recombination determined by I-SceI, a mitochondrial group I intron-encoded endonuclease expressed in the yeast nucleus. *Genetics* **1992**, *130*, 451–460.
19. Pauwels, K.; Podevin, N.; Breyer, D.; Carroll, D.; Herman, P. Engineering nucleases for gene targeting: Safety and regulatory considerations. *New Biotechnol.* **2014**, *31*, 18–27.
20. Puchta, H.; Dujon, B.; Hohn, B. Homologous recombination in plant cells is enhanced by in vivo induction of double strand breaks into DNA by a site-specific endonuclease. *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 5034–5040.
21. Gao, H.; Smith, J.; Yang, M.; Jones, S.; Djukanovic, V.; Nicholson, M.G.; West, A.; Bidney, D.; Falco, S.C.; Jantz, D.; et al. Heritable targeted mutagenesis in maize using a designed endonuclease. *Plant J.* **2010**, *61*, 176–187.
22. Puchta, H.; Fauser, F. Synthetic nucleases for genome engineering in plants: Prospects for a bright future. *Plant J.* **2014**, *78*, 727–741.
23. Kouranova, E.; Forbes, K.; Zhao, G.; Warren, J.; Bartels, A.; Wu, Y.; Cui, X. CRISPRs for Optimal Targeting: Delivery of CRISPR Components as DNA, RNA, and Protein into Cultured Cells and Single-Cell Embryos. *Hum. Gene Ther.* **2016**, *27*, 464–475.
24. Vu, G.T.H.; Cao, H.X.; Watanabe, K.; Hensel, G.; Blattner, F.R.; Kumlehn, J.; Schubert, I. Repair of Site-Specific DNA Double-Strand Breaks in Barley Occurs via Diverse Pathways Primarily Involving the Sister Chromatid. *Plant Cell* **2014**, *26*, 2156–2167.
25. Kim, Y.G.; Cha, J.; Chandrasegaran, S. Hybrid restriction enzymes: Zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 1156–1160.
26. Voytas, D.F. Plant genome engineering with sequence-specific nucleases. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2013**, *64*, 327–350.
27. Smith, J.; Berg, J.M.; Chandrasegaran, S. A detailed study of the substrate specificity of a chimeric restriction enzyme. *Nucleic Acids Res.* **1999**, *27*, 674–681.
28. Doyon, Y.; McCammon, J.M.; Miller, J.C.; Faraji, F.; Ngo, C.; Katibah, G.E.; Amora, R.; Hocking, T.D.; Zhang, L.; Rebar, E.J.; et al. Heritable targeted gene disruption in zebrafish using designed zinc-finger nucleases. *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 702–708.
29. Bonas, U.; Stall, R.E.; Staskawicz, B. Genetic and structural characterization of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol. Gen. Genet. MGG* **1989**, *218*, 127–136.
30. Christian, M.; Cermak, T.; Doyle, E.L.; Schmidt, C.; Zhang, F.; Hummel, A.; Bogdanove, A.J.; Voytas, D.F. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics* **2010**, *186*, 757–761.
31. Boch, J.; Scholze, H.; Schornack, S.; Landgraf, A.; Hahn, S.; Kay, S.; Lahaye, T.; Nickstadt, A.; Bonas, U. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science* **2009**, *326*, 1509–1512.
32. Doudna, J.A.; Charpentier, E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* **2014**, *346*, 1258096.
33. Kumlehn, J.; Pietralla, J.; Hensel, G.; Pacher, M.; Puchta, H. The CRISPR/Cas revolution continues: From efficient gene editing for crop breeding to plant synthetic biology. *J. Integr. Plant Biol.* **2018**, *60*, 1127–1154.
34. Shan, Q.; Wang, Y.; Li, J.; Zhang, Y.; Chen, K.; Liang, Z.; Zhang, K.; Liu, J.; Xi, J.J.; Qiu, J.-L.; et al. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nat. Biotechnol.* **2013**, *31*, 686–688.
35. Lawrenson, T.; Shorinola, O.; Stacey, N.; Li, C.; Østergaard, L.; Patron, N.; Uauy, C.; Harwood, W. Induction of targeted, heritable mutations in barley and *Brassica oleracea* using RNA-guided Cas9 nuclease. *Genome Biol.* **2015**, *16*, 258.
36. Liu, X.; Wu, S.; Xu, J.; Sui, C.; Wei, J. Application of CRISPR/Cas9 in plant biology. *Acta Pharm. Sin. B* **2017**, *7*, 292–302.

37. Upadhyay, S.K.; Kumar, J.; Alok, A.; Tuli, R. RNA-guided genome editing for target gene mutations in wheat. *G3 Genes Genome Genet.* **2013**, *3*, 2233–2238.
38. Shan, Q.; Wang, Y.; Li, J.; Gao, C. Genome editing in rice and wheat using the CRISPR/Cas system. *Nat. Protoc.* **2014**, *9*, 2395–2410.
39. Wang, Y.; Cheng, X.; Shan, Q.; Zhang, Y.; Liu, J.; Gao, C.; Qiu, J.-L. Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nat. Biotechnol.* **2014**, *32*, 947–951.
40. Holme, I.B.; Wendt, T.; Gil-Humanes, J.; Deleuran, L.C.; Starker, C.G.; Voytas, D.F.; Brinch-Pedersen, H. Evaluation of the mature grain phytase candidate HvPAPhy_a gene in barley (*Hordeum vulgare* L.) using CRISPR/Cas9 and TALENs. *Plant Mol. Biol.* **2017**, *95*, 111–121.
41. Čermák, T.; Baltés, N.J.; Čegan, R.; Zhang, Y.; Voytas, D.F. High-frequency, precise modification of the tomato genome. *Genome Biol.* **2015**, *16*, 232.
42. Gil-Humanes, J.; Wang, Y.; Liang, Z.; Shan, Q.; Ozuna, C.V.; Sánchez-León, S.; Baltés, N.J.; Starker, C.; Barro, F.; Gao, C.; et al. High-efficiency gene targeting in hexaploid wheat using DNA replicons and CRISPR/Cas9. *Plant J.* **2017**, *89*, 1251–1262.
43. Gao, Y.; Zhao, Y. Self-processing of ribozyme-flanked RNAs into guide RNAs in vitro and in vivo for CRISPR-mediated genome editing. *J. Integr. Plant Biol.* **2014**, *56*, 343–349.
44. Xing, H.-L.; Dong, L.; Wang, Z.-P.; Zhang, H.-Y.; Han, C.-Y.; Liu, B.; Wang, X.-C.; Chen, Q.-J. A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. *BMC Plant Biol.* **2014**, *14*, 327.
45. Kumar, N.; Galli, M.; Ordon, J.; Stuttmann, J.; Kogel, K.-H.; Imani, J. Further analysis of barley MORC1 using a highly efficient RNA-guided Cas9 gene-editing system. *Plant Biotechnol. J.* **2018**, *16*, 1892–1903.
46. Ma, X.; Zhang, Q.; Zhu, Q.; Liu, W.; Chen, Y.; Qiu, R.; Wang, B.; Yang, Z.; Li, H.; Lin, Y.; et al. A Robust CRISPR/Cas9 System for Convenient, High-Efficiency Multiplex Genome Editing in Monocot and Dicot Plants. *Mol. Plant* **2015**, *8*, 1274–1284.
47. Lowder, L.G.; Zhang, D.; Baltés, N.J.; Paul, J.W.; Tang, X.; Zheng, X.; Voytas, D.F.; Hsieh, T.-F.; Zhang, Y.; Qi, Y. A CRISPR/Cas9 Toolbox for Multiplexed Plant Genome Editing and Transcriptional Regulation. *Plant Physiol.* **2015**, *169*, 971–985.
48. Wang, W.; Pan, Q.; He, F.; Akhunova, A.; Chao, S.; Trick, H.; Akhunov, E. Transgenerational CRISPR-Cas9 Activity Facilitates Multiplex Gene Editing in Allopolyploid Wheat. *Cris. J.* **2018**, *1*, 65–74.
49. Tang, X.; Zheng, X.; Qi, Y.; Zhang, D.; Cheng, Y.; Tang, A.; Voytas, D.F.; Zhang, Y. A Single Transcript CRISPR-Cas9 System for Efficient Genome Editing in Plants. *Mol. Plant* **2016**, *9*, 1088–1091.
50. Čermák, T.; Curtin, S.J.; Gil-Humanes, J.; Čegan, R.; Kono, T.J.Y.; Konečná, E.; Belanto, J.J.; Starker, C.G.; Mathre, J.W.; Greenstein, R.L.; et al. A Multipurpose Toolkit to Enable Advanced Genome Engineering in Plants. *Plant Cell* **2017**, *29*, 1196–1217.
51. Ren, X.; Yang, Z.; Xu, J.; Sun, J.; Mao, D.; Hu, Y.; Yang, S.J.; Qiao, H.H.; Wang, X.; Hu, Q.; et al. Enhanced specificity and efficiency of the CRISPR/Cas9 system with optimized sgRNA parameters in *Drosophila*. *Cell Rep.* **2014**, *9*, 1151–1162.
52. Moreno-Mateos, M.A.; Vejnar, C.E.; Beaudoin, J.D.; Fernandez, J.P.; Mis, E.K.; Khokha, M.K.; Giraldez, A.J. CRISPRscan: Designing highly efficient sgRNAs for CRISPR-Cas9 targeting in vivo. *Nat. Methods* **2015**, *12*, 982–988.
53. Cong, L.; Ran, F.A.; Cox, D.; Lin, S.; Barretto, R.; Habib, N.; Hsu, P.D.; Wu, X.; Jiang, W.; Marraffini, L.A.; et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* **2013**, *339*, 819–823.
54. Fu, Y.; Sander, J.D.; Reyon, D.; Cascio, V.M.; Joung, J.K. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nat. Biotechnol.* **2014**, *32*, 279–284.

55. Zhang, J.P.; Li, X.L.; Neises, A.; Chen, W.; Hu, L.P.; Ji, G.Z.; Yu, J.Y.; Xu, J.; Yuan, W.P.; Cheng, T.; et al. Different Effects of sgRNA Length on CRISPR-mediated Gene Knockout Efficiency. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 28566.
56. Osakabe, Y.; Watanabe, T.; Sugano, S.S.; Ueta, R.; Ishihara, R.; Shinozaki, K.; Osakabe, K. Optimization of CRISPR/Cas9 genome editing to modify abiotic stress responses in plants. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 26685.
57. Gerasimova, S.V.; Korotkova, A.M.; Hertig, C.; Hiekel, S.; Hoffie, R.; Budhagatapalli, N.; Otto, I.; Hensel, G.; Shumny, V.K.; Kochetov, A.V.; et al. Targeted genome modification in protoplasts of a highly regenerable Siberian barley cultivar using RNA-guided Cas9 endonuclease. *Vavilovskii Zhurnal Genet. I Seleksii* **2019**, *22*, 1033–1039.
58. Cho, S.W.; Kim, S.; Kim, Y.; Kweon, J.; Kim, H.S.; Bae, S.; Kim, J.S. Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. *Genome Res.* **2014**, *24*, 132–141.
59. Lei, Y.; Lu, L.; Liu, H.Y.; Li, S.; Xing, F.; Chen, L.L. CRISPR-P: A web tool for synthetic single-guide RNA design of CRISPR-system in plants. *Mol. Plant* **2014**, *7*, 1494–1496.
60. Liu, H.; Ding, Y.; Zhou, Y.; Jin, W.; Xie, K.; Chen, L.L. CRISPR-P 2.0: An Improved CRISPR-Cas9 Tool for Genome Editing in Plants. *Mol. Plant* **2017**, *10*, 530–532.
61. Doench, J.G.; Hartenian, E.; Graham, D.B.; Tothova, Z.; Hegde, M.; Smith, I.; Sullender, M.; Ebert, B.L.; Xavier, R.J.; Root, D.E. Rational design of highly active sgRNAs for CRISPR-Cas9-mediated gene inactivation. *Nat. Biotechnol.* **2014**, *32*, 1262–1267.
62. Doench, J.G.; Fusi, N.; Sullender, M.; Hegde, M.; Vaimberg, E.W.; Donovan, K.F.; Smith, I.; Tothova, Z.; Wilen, C.; Orchard, R.; et al. Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. *Nat. Biotechnol.* **2016**, *34*, 184–191.
63. Haeussler, M.; Schonig, K.; Eckert, H.; Eschstruth, A.; Mianne, J.; Renaud, J.B.; Schneider-Maunoury, S.; Shkumatava, A.; Teboul, L.; Kent, J.; et al. Evaluation of off-target and on-target scoring algorithms and integration into the guide RNA selection tool CRISPOR. *Genome Biol.* **2016**, *17*, 148.
64. Concordet, J.P.; Haeussler, M. CRISPOR: Intuitive guide selection for CRISPR/Cas9 genome editing experiments and screens. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, W242–W245.
65. Wong, N.; Liu, W.; Wang, X. WU-CRISPR: Characteristics of functional guide RNAs for the CRISPR/Cas9 system. *Genome Biol.* **2015**, *16*, 218.
66. Liang, G.; Zhang, H.; Lou, D.; Yu, D. Selection of highly efficient sgRNAs for CRISPR/Cas9-based plant genome editing. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 21451.
67. Zuker, M.; Jacobson, A.B. Using reliability information to annotate RNA secondary structures. *RNA* **1998**, *4*, 669–679.
68. Waugh, A.; Gendron, P.; Altman, R.; Brown, J.W.; Case, D.; Gautheret, D.; Harvey, S.C.; Leontis, N.; Westbrook, J.; Westhof, E.; et al. RNAML: A standard syntax for exchanging RNA information. *RNA* **2002**, *8*, 707–717.
69. Zuker, M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 3406–3415.
70. Gruber, A.R.; Lorenz, R.; Bernhart, S.H.; Neubock, R.; Hofacker, I.L. The Vienna RNA websuite. *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, W70–W74.
71. Lorenz, R.; Bernhart, S.H.; Honer Zu Siederdisen, C.; Tafer, H.; Flamm, C.; Stadler, P.F.; Hofacker, I.L. ViennaRNA Package 2.0. *Algorithms Mol. Biol.* **2011**, *6*, 26.
72. Pasternak, T.P.; Rudas, V.A.; Lörz, H.; Kumlehn, J. Embryogenic Callus Formation and Plant Regeneration from Leaf Base Segments of Barley (*Hordeum vulgare* L.). *J. Plant Physiol.* **1999**, *155*, 371–375.
73. Vasil, V.; Castillo, A.M.; Fromm, M.E.; Vasil, I.K. Herbicide Resistant Fertile Transgenic Wheat Plants Obtained by Microprojectile Bombardment of Regenerable Embryogenic Callus. *Bio-Technol.* **1992**, *10*, 667–674.

74. Wan, Y.; Lemaux, P.G. Generation of Large Numbers of Independently Transformed Fertile Barley Plants. *Plant Physiol.* **1994**, *104*, 37–48.
75. Hiei, Y.; Ohta, S.; Komari, T.; Kumashiro, T. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J.* **1994**, *6*, 271–282.
76. Tingay, S.; McElroy, D.; Kalla, R.; Fieg, S.; Wang, M.; Thornton, S.; Brettell, R. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated barley transformation. *Plant J.* **1997**, *11*, 1369–1376.
77. Cheng, M.; Fry, J.E.; Pang, S.; Zhou, H.; Hironaka, C.M.; Duncan, D.R.; Conner, T.W.; Wan, Y. Genetic Transformation of Wheat Mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol.* **1997**, *115*, 971–980.
78. Hensel, G.; Kastner, C.; Oleszczuk, S.; Riechen, J.; Kumlehn, J. *Agrobacterium*-mediated gene transfer to cereal crop plants: Current protocols for barley, wheat, triticale, and maize. *Int. J. Plant Genom.* **2009**, *2009*, 835608.
79. Rasco-Gaunt, S.; Riley, A.; Cannell, M.; Barcelo, P.; Lazzeri, P.A. Procedures allowing the transformation of a range of European elite wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties via particle bombardment. *J. Exp. Bot.* **2001**, *52*, 865–874.
80. Wu, H.; Sparks, C.; Amoah, B.; Jones, H.D. Factors influencing successful *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of wheat. *Plant Cell Rep.* **2003**, *21*, 659–668.
81. Richardson, T.; Thistleton, J.; Higgins, T.J.; Howitt, C.; Ayliffe, M. Efficient *Agrobacterium* transformation of elite wheat germplasm without selection. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **2014**, *119*, 647–659.
82. Ishida, Y.; Tsunashima, M.; Hiei, Y.; Komari, T. Wheat (*Triticum aestivum* L.) transformation using immature embryos. *Methods Mol. Biol.* **2015**, *1223*, 189–198.
83. Hensel, G.; Valkov, V.; Middlefell-Williams, J.; Kumlehn, J. Efficient generation of transgenic barley: The way forward to modulate plant-microbe interactions. *J. Plant Physiol.* **2008**, *165*, 71–82.
84. Yeo, F.K.S.; Hensel, G.; Vozábová, T.; Martin-Sanz, A.; Marcel, T.C.; Kumlehn, J.; Niks, R.E. Golden SusPtrit—A genetically well transformable barley line for studies on the resistance to rust fungi. *Theor. Appl. Genet.* **2014**, *127*, 325–337.
85. Howells, R.M.; Craze, M.; Bowden, S.; Wallington, E.J. Efficient generation of stable, heritable gene edits in wheat using CRISPR/Cas9. *BMC Plant Biol.* **2018**, *18*, 215.
86. Daghma, D.E.S.; Hensel, G.; Rutten, T.; Melzer, M.; Kumlehn, J. Cellular dynamics during early barley pollen embryogenesis revealed by time-lapse imaging. *Front. Plant Sci.* **2014**, *5*, 675.
87. Kumlehn, J.; Serazetdinova, L.; Hensel, G.; Becker, D.; Loerz, H. Genetic transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.) via infection of androgenetic pollen cultures with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Biotechnol. J.* **2006**, *4*, 251–261.
88. Otto, I.; Muller, A.; Kumlehn, J. Barley (*Hordeum vulgare* L.) transformation using embryogenic pollen cultures. *Methods Mol. Biol.* **2015**, *1223*, 85–99.
89. Shim, Y.S.; Pauls, K.P.; Kasha, K.J. Transformation of isolated barley (*Hordeum vulgare* L.) microspores: II. Timing of pretreatment and temperatures relative to results of bombardment. *Genome* **2009**, *52*, 175–190.
90. Gurushidze, M.; Hensel, G.; Hiekel, S.; Schedel, S.; Valkov, V.; Kumlehn, J. True-breeding targeted gene knock-out in barley using designer TALE-nuclease in haploid cells. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e92046.
91. Zhang, S.; Cho, M.J.; Koprek, T.; Yun, R.; Bregitzer, P.; Lemaux, P.G. Genetic transformation of commercial cultivars of oat (*Avena sativa* L.) and barley (*Hordeum vulgare* L.) using in vitro shoot meristematic cultures derived from germinated seedlings. *Plant Cell Rep.* **1999**, *18*, 959–966.

92. Hamada, H.; Linghu, Q.; Nagira, Y.; Miki, R.; Taoka, N.; Imai, R. An in planta biolistic method for stable wheat transformation. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 11443.
93. Hamada, H.; Liu, Y.; Nagira, Y.; Miki, R.; Taoka, N.; Imai, R. Biolistic-delivery-based transient CRISPR/Cas9 expression enables in planta genome editing in wheat. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 14422.
94. Kapusi, E.; Hensel, G.; Coronado, M.J.; Broeders, S.; Marthe, C.; Otto, I.; Kumlehn, J. The elimination of a selectable marker gene in the doubled haploid progeny of co-transformed barley plants. *Plant Mol. Biol.* **2013**, *81*, 149–160.
95. Gurushidze, M.; Trautwein, H.; Hoffmeister, P.; Otto, I.; Müller, A.; Kumlehn, J. Doubled Haploidy as a Tool for Chimaera Dissolution of TALEN-Induced Mutations in Barley. In *Biotechnologies for Plant Mutation Breeding*; Springer: Cham, Switzerland, 2017; Chapter 8; pp. 129–141.
96. Liang, Z.; Chen, K.; Li, T.; Zhang, Y.; Wang, Y.; Zhao, Q.; Liu, J.; Zhang, H.; Liu, C.; Ran, Y.; et al. Efficient DNA-free genome editing of bread wheat using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 14261.
97. Budhagatapalli, N.; Schedel, S.; Gurushidze, M.; Pencs, S.; Hiekel, S.; Rutten, T.; Kusch, S.; Morbitzer, R.; Lahaye, T.; Panstruga, R.; et al. A simple test for the cleavage activity of customized endonucleases in plants. *Plant Methods* **2016**, *12*, 18.
98. Budhagatapalli, N.; Rutten, T.; Gurushidze, M.; Kumlehn, J.; Hensel, G. Targeted Modification of Gene Function Exploiting Homology-Directed Repair of TALEN-Mediated Double-Strand Breaks in Barley. *G3 Genes Genome Genet.* **2015**, *5*, 1857–1863.
99. Zhang, Y.; Liang, Z.; Zong, Y.; Wang, Y.; Liu, J.; Chen, K.; Qiu, J.L.; Gao, C. Efficient and transgene-free genome editing in wheat through transient expression of CRISPR/Cas9 DNA or RNA. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 12617.
100. Bae, S.; Kweon, J.; Kim, H.S.; Kim, J.-S. Microhomology-based choice of Cas9 nuclease target sites. *Nat. Methods* **2014**, *11*, 705–706.
101. Zong, Y.; Wang, Y.; Li, C.; Zhang, R.; Chen, K.; Ran, Y.; Qiu, J.-L.; Wang, D.; Gao, C. Precise base editing in rice, wheat and maize with a Cas9-cytidine deaminase fusion. *Nat. Biotechnol.* **2017**, *35*, 438–440.
102. Komor, A.C.; Kim, Y.B.; Packer, M.S.; Zuris, J.A.; Liu, D.R. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature* **2016**, *533*, 420–424.
103. Gaudelli, N.M.; Komor, A.C.; Rees, H.A.; Packer, M.S.; Badran, A.H.; Bryson, D.I.; Liu, D.R. Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature* **2017**, *551*, 464–471.
104. Zong, Y.; Song, Q.; Li, C.; Jin, S.; Zhang, D.; Wang, Y.; Qiu, J.-L.; Gao, C. Efficient C-to-T base editing in plants using a fusion of nCas9 and human APOBEC3A. *Nat. Biotechnol.* **2018**, *36*, 950–953.
105. Li, C.; Zong, Y.; Wang, Y.; Jin, S.; Zhang, D.; Song, Q.; Zhang, R.; Gao, C. Expanded base editing in rice and wheat using a Cas9-adenosine deaminase fusion. *Genome Biol.* **2018**, *19*, 59.
106. Puchta, H.; Dujon, B.; Hohn, B. Two different but related mechanisms are used in plants for the repair of genomic double-strand breaks by homologous recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 5055–5060.
107. Fauser, F.; Roth, N.; Pacher, M.; Ilg, G.; Sánchez-Fernández, R.; Biesgen, C.; Puchta, H. In planta gene targeting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 7535–7540.
108. Ran, F.A.; Hsu, P.D.; Lin, C.-Y.; Gootenberg, J.S.; Konermann, S.; Trevino, A.E.; Scott, D.A.; Inoue, A.; Matoba, S.; Zhang, Y.; et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell* **2013**, *154*, 1380–1389.
109. Mikami, M.; Toki, S.; Endo, M. Precision Targeted Mutagenesis via Cas9 Paired Nickases in Rice. *Plant Cell Physiol.* **2016**, *57*, 1058–1068.

110. Balthes, N.J.; Gil-Humanes, J.; Cermak, T.; Atkins, P.A.; Voytas, D.F. DNA replicons for plant genome engineering. *Plant Cell* **2014**, *26*, 151–163.
111. Ran, Y.; Patron, N.; Kay, P.; Wong, D.; Buchanan, M.; Cao, Y.Y.; Sawbridge, T.; Davies, J.P.; Mason, J.; Webb, S.R.; et al. Zinc finger nuclease-mediated precision genome editing of an endogenous gene in hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum*) using a DNA repair template. *Plant Biotechnol. J.* **2018**, *16*, 2088–2101.
112. Kapusi, E.; Corcuera-Gomez, M.; Melnik, S.; Stoger, E. Heritable Genomic Fragment Deletions and Small Indels in the Putative ENGase Gene Induced by CRISPR/Cas9 in Barley. *Front. Plant Sci.* **2017**, *8*, 540.
113. Sánchez-León, S.; Gil-Humanes, J.; Ozuna, C.V.; Gimenez, M.J.; Sousa, C.; Voytas, D.F.; Barro, F. Low-gluten, nontransgenic wheat engineered with CRISPR/Cas9. *Plant Biotechnol. J.* **2018**, *16*, 902–910.
114. Xie, K.; Yang, Y. RNA-guided genome editing in plants using a CRISPR-Cas system. *Mol. Plant* **2013**, *6*, 1975–1983.
115. Liang, Z.; Chen, K.; Yan, Y.; Zhang, Y.; Gao, C. Genotyping genome-edited mutations in plants using CRISPR ribonucleoprotein complexes. *Plant Biotechnol. J.* **2018**, *16*, 2053–2062.
116. Brinkman, E.K.; Chen, T.; Amendola, M.; van Steensel, B. Easy quantitative assessment of genome editing by sequence trace decomposition. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, e168.
117. Liu, W.; Xie, X.; Ma, X.; Li, J.; Chen, J.; Liu, Y.G. DSDecode: A Web-Based Tool for Decoding of Sequencing Chromatograms for Genotyping of Targeted Mutations. *Mol. Plant* **2015**, *8*, 1431–1433.
118. Wang, W.; Simmonds, J.; Pan, Q.; Davidson, D.; He, F.; Battal, A.; Akhunova, A.; Trick, H.N.; Uauy, C.; Akhunov, E. 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.* **2018**, *131*, 2463–2475.
119. Kim, D.; Alptekin, B.; Budak, H. CRISPR/Cas9 genome editing in wheat. *Funct. Integr. Genome* **2018**, *18*, 31–41.
120. Hensel, G.; Marthe, C.; Kumlehn, J. Agrobacterium-Mediated Transformation of Wheat Using Immature Embryos. *Methods Mol. Biol.* **2017**, *1679*, 129–139.
121. Wolt, J.D.; Wolf, C. Policy and Governance Perspectives for Regulation of Genome Edited Crops in the United States. *Front. Plant Sci.* **2018**, *9*, 1606.
122. E.A.S.A. Council Genome Editing: Scientific Opportunities, Public Interests and Policy Options in the European Union; EASAC Secretariat Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina German National Academy of Sciences: Halle, Germany, 2017; p. 34.
123. Sprink, T.; Eriksson, D.; Schiemann, J.; Hartung, F. Regulatory hurdles for genome editing: Process-vs. product-based approaches in different regulatory contexts. *Plant Cell Rep.* **2016**, *35*, 1493–1506.
124. Bhowmik, P.; Ellison, E.; Polley, B.; Bollina, V.; Kulkarni, M.; Ghanbarnia, K.; Song, H.; Gao, C.; Voytas, D.F.; Kagale, S. Targeted mutagenesis in wheat microspores using CRISPR/Cas9. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 6502.
125. Kumlehn, J.; Schieder, O.; Lorz, H. In vitro development of wheat (*Triticum aestivum* L.) from zygote to plant via ovule culture. *Plant Cell Rep.* **1997**, *16*, 663–667.
126. Holme, I.B.; Brinch-Pedersen, H.; Lange, M.; Holm, P.B. Transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.) by *Agrobacterium tumefaciens* infection of in vitro cultured ovules. *Plant Cell Rep.* **2006**, *25*, 1325–1335.
127. Holme, I.B.; Brinch-Pedersen, H.; Lange, M.; Holm, P.B. Transformation of different barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars by *Agrobacterium tumefaciens* infection of in vitro cultured ovules. *Plant Cell Rep.* **2008**, *27*, 1833–1840.
128. Hensel, G.; Himmelbach, A.; Chen, W.; Douchkov, D.K.; Kumlehn, J. Transgene expression systems in the Triticeae cereals. *J. Plant Physiol.* **2011**, *168*, 30–44.

129. Freeman, J.; Sparks, C.A.; West, J.; Shewry, P.R.; Jones, H.D. Temporal and spatial control of transgene expression using a heat-inducible promoter in transgenic wheat. *Plant Biotechnol. J.* **2011**, *9*, 788–796.
130. Jöst, M.; Hensel, G.; Kappel, C.; Druka, A.; Sicard, A.; Hohmann, U.; Beier, S.; Himmelbach, A.; Waugh, R.; Kumlehn, J.; et al. The INDETERMINATE DOMAIN Protein BROAD LEAF1 Limits Barley Leaf Width by Restricting Lateral Proliferation. *Curr. Biol.* **2016**, *26*, 903–909.
131. Xie, K.; Minkenberg, B.; Yang, Y. Boosting CRISPR/Cas9 multiplex editing capability with the endogenous tRNA-processing system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, 3570–3575.
132. Esvelt, K.M.; Mali, P.; Braff, J.L.; Moosburner, M.; Yaung, S.J.; Church, G.M. Orthogonal Cas9 proteins for RNA-guided gene regulation and editing. *Nat. Methods* **2013**, *10*, 1116–1121.
133. Ran, F.A.; Cong, L.; Yan, W.X.; Scott, D.A.; Gootenberg, J.S.; Kriz, A.J.; Zetsche, B.; Shalem, O.; Wu, X.; Makarova, K.S.; et al. In vivo genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature* **2015**, *520*, 186–191.
134. Kim, H.; Kim, S.T.; Ryu, J.; Kang, B.C.; Kim, J.S.; Kim, S.G. CRISPR/Cpf1-mediated DNA-free plant genome editing. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 14406.
135. Steinert, J.; Schiml, S.; Fauser, F.; Puchta, H. Highly efficient heritable plant genome engineering using Cas9 orthologues from *Streptococcus thermophilus* and *Staphylococcus aureus*. *Plant J.* **2015**, *84*, 1295–1305.
136. Hu, J.H.; Miller, S.M.; Geurts, M.H.; Tang, W.; Chen, L.; Sun, N.; Zeina, C.M.; Gao, X.; Rees, H.A.; Lin, Z.; et al. Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity. *Nature* **2018**, *556*, 57–63.
137. Nishimasu, H.; Shi, X.; Ishiguro, S.; Gao, L.; Hirano, S.; Okazaki, S.; Noda, T.; Abudayyeh, O.O.; Gootenberg, J.S.; Mori, H.; et al. Engineered CRISPR-Cas9 nuclease with expanded targeting space. *Science* **2018**, *361*, 1259–1262.
138. Zetsche, B.; Gootenberg, J.S.; Abudayyeh, O.O.; Slaymaker, I.M.; Makarova, K.S.; Essletzbichler, P.; Volz, S.E.; Joung, J.; van der Oost, J.; Regev, A.; et al. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell* **2015**, *163*, 759–771.
139. Tang, X.; Lowder, L.G.; Zhang, T.; Malzahn, A.A.; Zheng, X.; Voytas, D.F.; Zhong, Z.; Chen, Y.; Ren, Q.; Li, Q.; Kirkland, E.R.; Zhang, Y.; Qi, Y. A CRISPR-Cpf1 system for efficient genome editing and transcriptional repression in plants. *Nat. Plants* **2017**, *3*, 17018.
140. Fauser, F.; Schiml, S.; Puchta, H. Both CRISPR/Cas-based nucleases and nickases can be used efficiently for genome engineering in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **2014**, *79*, 348–359.
141. Schedel, S.; Pencs, S.; Hensel, G.; Müller, A.; Rutten, T.; Kumlehn, J. RNA-Guided Cas9-Induced Mutagenesis in Tobacco Followed by Efficient Genetic Fixation in Doubled Haploid Plants. *Front. Plant Sci.* **2017**, *7*, 1995.
142. Rodriguez-Leal, D.; Lemmon, Z.H.; Man, J.; Bartlett, M.E.; Lippman, Z.B. Engineering Quantitative Trait Variation for Crop Improvement by Genome Editing. *Cell* **2017**, *171*, 470–480.
143. Chandrasekaran, J.; Brumin, M.; Wolf, D.; Leibman, D.; Klap, C.; Pearlsman, M.; Sherman, A.; Arazi, T.; Gal-On, A. Development of broad virus resistance in non-transgenic cucumber using CRISPR/Cas9 technology. *Mol. Plant Pathol.* **2016**, *17*, 1140–1153.
144. Stein, N.; Perovic, D.; Kumlehn, J.; Pellio, B.; Stracke, S.; Streng, S.; Ordon, F.; Graner, A. The eukaryotic translation initiation factor 4E confers multiallelic recessive Bymovirus resistance in *Hordeum vulgare* (L.). *Plant J.* **2005**, *42*, 912–922.
145. Yang, P.; Lupken, T.; Habekuss, A.; Hensel, G.; Steuernagel, B.; Kilian, B.; Ariyadasa, R.; Himmelbach, A.; Kumlehn, J.; Scholz, U.; et al. PROTEIN DISULFIDE ISOMERASE LIKE 5-1 is a susceptibility factor to plant viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 2104–2109.
146. Maccaferri, M.; Harris, N.S.; Twardziok, S.O.; Pasam, R.K.; Gundlach, H.; Spannagl, M.; Ormanbekova, D.; Lux, T.; Prade, V.M.; Milner, S.G.; et al. Durum wheat genome highlights

- past domestication signatures and future improvement targets. *Nat. Genet.* **2019**, *51*, 885–895.
147. Andersson, M.; Turesson, H.; Nicolia, A.; Falt, A.S.; Samuelsson, M.; Hofvander, P. Efficient targeted multiallelic mutagenesis in tetraploid potato (*Solanum tuberosum*) by transient CRISPR-Cas9 expression in protoplasts. *Plant Cell Rep.* **2017**, *36*, 117–128.
 148. Sun, Y.; Jiao, G.; Liu, Z.; Zhang, X.; Li, J.; Guo, X.; Du, W.; Du, J.; Francis, F.; Zhao, Y.; et al. Generation of High-Amylose Rice through CRISPR/Cas9-Mediated Targeted Mutagenesis of Starch Branching Enzymes. *Front. Plant Sci.* **2017**, *8*, 298.
 149. Simkin, A.J.; Lopez-Calcagno, P.E.; Raines, C.A. Feeding the world: Improving photosynthetic efficiency for sustainable crop production. *J. Exp. Bot.* **2019**, *70*, 1119–1140.
 150. Zhang, Y.; Bai, Y.; Wu, G.; Zou, S.; Chen, Y.; Gao, C.; Tang, D. Simultaneous modification of three homoeologs of TaEDR1 by genome editing enhances powdery mildew resistance in wheat. *Plant J.* **2017**, *91*, 714–724.
 151. Rey, M.-D.; Martín, A.C.; Smedley, M.; Hayta, S.; Harwood, W.; Shaw, P.; Moore, G. Magnesium Increases Homoeologous Crossover Frequency During Meiosis in ZIP4 (Ph1 Gene) Mutant Wheat-Wild Relative Hybrids. *Front. Plant Sci.* **2018**, *9*, 509.
 152. Singh, M.; Kumar, M.; Albertsen, M.C.; Young, J.K.; Cigan, A.M. 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.* **2018**, *97*, 371–383.
 153. Zhang, S.; Zhang, R.; Song, G.; Gao, J.; Li, W.; Han, X.; Chen, M.; Li, Y.; Li, G. Targeted mutagenesis using the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated CRISPR-Cas9 system in common wheat. *BMC Plant Biol.* **2018**, *18*, 302.
 154. Holubová, K.; Hensel, G.; Vojta, P.; Tarkowski, P.; Bergougnoux, V.; Galuszka, P. Modification of Barley Plant Productivity Through Regulation of Cytokinin Content by Reverse-Genetics Approaches. *Front. Plant Sci.* **2018**, *9*, 1676.
 155. Zhong, Y.; Blennow, A.; Kofoed-Enevoldsen, O.; Jiang, D.; Hebelstrup, K.H. Protein Targeting to Starch 1 is essential for starchy endosperm development in barley. *J. Exp. Bot.* **2019**, *70*, 485–496.

© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

3. Targeted Knockout of Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E Confers Bymovirus Resistance in Winter Barley

Robert Eric Hoffie¹, Ingrid Otto¹, Dragan Perovic², Nagaveni Budhagatapalli¹, Antje Habekuß², Frank Ordon², Jochen Kumlehn¹

¹Plant Reproductive Biology, Leibniz-Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK), Gatersleben, Germany

²Institute for Resistance Research and Stress Tolerance, Julius Kuehn Institute (JKI), Federal Research Centre for Cultivated Plants, Quedlinburg, Germany

Original Research article published in *Frontiers of Genome Editing*, 29 November 2021

<https://doi.org/10.3389/fgeed.2021.784233>

Abstract

The *Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E (EIF4E)* is a well-known susceptibility factor for potyvirus infections in many plant species. The barley yellow mosaic virus disease, caused by the bymoviruses *Barley yellow mosaic virus (BaYMV)* and *Barley mild mosaic virus (BaMMV)*, can lead to yield losses of up to 50% in winter barley. In autumn, the roots of young barley plants are infected by the soil-borne plasmodiophoraceous parasite *Polymyxa graminis* L. that serves as viral vector. Upon viral establishment and systemic spreading into the upper parts of the plants, yellow mosaics occur as first symptoms on leaves. In the further course of plant development, the disease entails leaf necrosis and increased susceptibility to frost damage. Thanks to the *rym4* and *rym5* allelic variants of the *HvEIF4E* gene, more than two thirds of current European winter barley cultivars are resistant to BaYMV and BaMMV. However, several strains of BaYMV and BaMMV have already overcome *rym4*- and *rym5*-mediated resistance. Accordingly, new resistance-conferring alleles are needed for barley breeding. Therefore, we performed targeted mutagenesis of the *EIF4E* gene by Cas9 endonuclease in BaMMV/BaYMV-susceptible winter barley cv. "Igrí". Small insertions were generated, resulting in a shift of the translational reading frame, thereby causing the loss-of-function of *EIF4E*. The mutations occurred in the homozygous state already in the primary mutants. Their progeny proved invariably homozygous and fully resistant to mechanical inoculation with BaMMV. *EIF4E* knockout plants showed normal growth habit and produced grains, yet exhibited a yield penalty.

Keywords: Cas9, CRISPR, genome editing, RNA-guided endonucleases, targeted mutagenesis, protoplasts, doubled haploid

3.1. Introduction

The Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E (eIF4E) and its isoform (eIF(iso)4E) are known as susceptibility factors for potyvirus infection in a variety of plant species such as melon, tomato and pepper (Wang and Krishnaswamy, 2012). The eIF4E protein interacts with the 5' 7-methylguanosine (m⁷G) cap of eukaryotic mRNA to recruit the translation complex for protein biosynthesis. Potyviruses are single stranded (+)RNA viruses that mimic the structure of the eukaryotic mRNA's m⁷G cap by their genome-linked viral protein (VPg) cap, thus taking advantage of host metabolism for translation of their RNA (Sanfaçon, 2015). The plasmodiophorid *Polymyxa graminis* serves as a vector of *Barley yellow mosaic virus* (BaYMV) and *Barley mild mosaic virus* (BaMMV), both of which are bymoviruses of the *Potyviridae* family. *P. graminis* transmits these viruses mainly to winter barley seedlings, particularly under cool and moist weather conditions in autumn, which results in high yield losses and renders bymoviruses major pathogens in Europe and Asia. Barley was among the first species in which resistance-mediating alleles of the *EIF4E* gene were described and utilized in breeding (Kanyuka et al., 2005; Stein et al., 2005). The *rym4* and *rym5* alleles of *HvEIF4E* carry mutations that result in amino acid changes in the binding domain of the encoded protein. Consequently, the interaction between the host's eIF4E and the viral RNA cap-like structure formed by the genome-linked viral protein (VPg), is hampered, thereby preventing the translation of viral RNA and thus the replication and spread of the virus in the plant (Li and Shirako, 2015). In total, seven allelic variants of the *EIF4E* gene have been shown to confer resistance to different isolates of the BaMMV/BaYMV complex (reviewed in Jiang et al. (2020)). Based upon this principle, barley cultivars resistant to BaYMV and BaMMV have been bred and widely grown in temperate climate regions. However, the comprehensively used *rym4*- and *rym5*-based resistances have already been overcome by some strains such as BaYMV-2 (overcoming *rym4*) as well as BaMMV-Sil and BaMMV-Teik (overcoming *rym5*) (Habekuss et al., 2008; Jiang et al., 2020). Consequently, there is an urgent need for new resistance-conferring *HvEIF4E* alleles or novel resistance mechanisms, especially in winter barley breeding. Besides the *EIF4E* alleles *rym4* and *rym5*, several other bymovirus resistance loci have been described in barley (reviewed in Jiang et al. (2020)). Most of these are recessive and were found in Asian landraces. However, only for *rym1/rym11*, the responsible gene, i.e., the *Protein Disulfide Isomerase-Like 5-1* (*PDIL5-1*), has been identified (Yang et al., 2014). Nevertheless, winter barley breeding still relies on *rym4* and *rym5*, since the introduction of new resistance sources into current elite lines requires time-consuming backcrosses. Taking advantage of the CRISPR-associated (Cas) endonuclease technology (Koeppel et al., 2019), targeted knock-outs of *EIF4E* were reported to be associated with Potyvirus resistance in other plant species such as cucumber and cassava (Chandrasekaran et al., 2016; Gomez et al., 2019). In barley, however, only non-synonymous single nucleotide polymorphisms (SNPs) have been described that lead to amino acid changes in the mRNA cap-binding domain of eIF4E. Therefore, it is assumed that the loss-of-function of *EIF4E* might be lethal in barley even though *HvEIF(iso)4E* does exist as a conserved paralog (Yang et al., 2016). Here, we addressed four positions in the *EIF4E* gene previously described to carry different SNPs in the *rym4* and *rym5* resistance alleles of the virus-susceptible winter barley cv. 'Igri' using Cas9 and accordingly customized guide RNAs (gRNAs). Via *Agrobacterium*-mediated DNA transfer to embryogenic pollen cultures, target motif-specific mutant plants were generated and their progeny were tested for resistance against BaMMV.

3.2. Materials and Methods

3.2.1. Target Selection

As targets for Cas9-induced mutagenesis, regions within the *HvEIF4E* gene (Gene ID: 100527994) on Chromosome 3 were selected, in which previously non-synonymous single nucleotide polymorphisms (SNPs) have been described for the resistance-conferring *rym4* and *rym5* alleles

which are, respectively, associated with four and three SNPs (see Figure 3-1A). The aim was to induce knockout mutations as well as new alleles by random nucleobase exchanges at the target sites. Within the four target regions, target motifs were selected based on available NGG protospacer-adjacent motifs (PAM). Target motifs including their PAMs are shown in Figure 3-1B. An off-target analysis was performed by comparison of the selected target motifs with the barley reference genome 'Morex' Version 3 and the pan-genome sequence of 'Igri' using the GrainGenes BLAST Service (Priyam et al., 2019). Only for target motif 3, a similar sequence is present on Chromosome 1 but a 2-bp mismatch within the seed region renders this sequence a rather unlikely off-target. For target motifs 1, 2, and 4, no potential off-targets were identified in the 'Morex' genome v3 (see Supplementary Material 10.1.1).

3.2.2. Vector Cloning

The target-specific sequences of the four gRNAs (see Figure 3-1; Supplement Table 10-1) were ordered as forward and reverse DNA oligo-nucleotides, hybridized and individually cloned in the format of double-stranded DNA into the plasmid pSH121 (GeneBank-ID: MW145140.1; Gerasimova et al. (2018)). This generic vector contains the *Oryza sativa U3 (OsU3)* promoter in front of a gRNA scaffold as well as the maize codon-optimized *cas9* gene under control of the *Zea mays Polyubiquitin 1 (ZmUBI1)* promoter. From each target-specific pSH121 derivative named pInt_EIF4E_TM1, pInt_EIF4E_TM2, pInt_EIF4E_TM3, and pInt_EIF4E_TM4, the SfiI fragment including the gRNA and *cas9* expression units was transferred into the binary vector p6i-2x35S-TE9 (Gerasimova et al., 2020) that carries in its transfer-DNA an *hpt* gene under the control of a doubled-enhanced CaMV35S promoter for plant selection, resulting in the respective binary vectors pBin_EIF4E_TM1, pBin_EIF4E_TM2, pBin_EIF4E_TM3, and pBin_EIF4E_TM4.

3.2.3. Pre-Validation of Constructs via Protoplast Transformation

The intermediate pSH121 derivatives were first tested by transient expression in mesophyll protoplasts isolated from leaves of one-week-old, etiolated seedlings of winter barley cv. 'Igri' based on the protocol of Shan et al. (2014). In brief, thirty leaves of barley seedlings were chopped into small fragments using a razor blade, and cell walls were digested with Macerozyme R-10 and cellulase R-10 (DUCHEFA BIOCHEMIE B.V, Haarlem/Netherlands). Protoplasts were purified by sieving, and after PEG-mediated transformation with pInt_EIF4E_TM1 to pInt_EIF4E_TM4, they were incubated for 60 h at 21°C in the dark. All protoplast transformations were conducted in three replications. To check for transformation efficiency, a *GFP* construct was used to transform a control sample of protoplasts. After incubation, the *GFP* expressing portion of protoplasts of this control sample was determined using an epifluorescence microscope (AX200M, Zeiss, Oberkochen/Germany), and DNA was extracted from the other protoplast samples transformed using the intermediate *cas9*/gRNA constructs pInt_EIF4E_TM1, pInt_EIF4E_TM2, pInt_EIF4E_TM3, and pInt_EIF4E_TM4. Around 150 bp of the target regions were amplified using specific primers (see Table 10-1), followed by deep-sequencing of amplicons, which was performed by a commercial service provider on an Illumina MiSeq platform. Mutation efficiencies were calculated individually for each replicate as proportion of sequencing reads with mutation in relation to the total number of reads including those with the wild-type sequence.

3.2.4. Agrobacterium-Mediated Transformation Using Embryogenic Barley Pollen

The binary vectors pBin_EIF4E_TM1, pBin_EIF4E_TM2, and pBin_EIF4E_TM3 were transfected by electroporation into the *Agrobacterium* strain LBA4404 harboring the hypervirulence-conferring plasmid pSB1 (Kumlehn et al., 2006). In brief, pre-mitotic (highly vacuolated) microspores were isolated from winter barley cv. 'Igri'. After microspore cultivation for 1 week in KBP medium (macro and micro nutrients, L-glutamine and maltose) to initiate cell proliferation, resultant

embryogenic pollen was subjected to DNA transfer by co-cultivation with *Agrobacterium* carrying the binary vectors as mentioned above in CK medium (macro and micro nutrients, maltose, acetosyringone, MES, and phosphate buffer). Then, transgenic plantlets were generated from embryogenic structures cultivated on KBP4PT (macro and micro nutrients, L-glutamine, maltose, hygromycin, Timentin, and Phytigel) followed by K4NBT medium (macro and micro nutrients, with increased dosage of CuSO₄, L-glutamine, maltose, hygromycin, Timentin, and Phytigel) under hygromycin selection as previously described in detail by Kumlehn et al. (2006).

3.2.5. Genotyping of Primary Transgenics and Mutants

Leaf samples were taken from primary transgenic plants and DNA was extracted and analyzed for the presence of the *cas9* transgene by PCR using specific primers (see Supplementary Table 10-1). The plants were screened for mutations by PCR amplification of the target regions using specific primers (see Supplementary Table 10-1) followed by Sanger sequencing of the amplicons.

3.2.6. BaMMV Inoculation and Resistance Screening by DAS-ELISA

To screen progeny of primary mutants P1, P3, and P4 for Bymovirus resistance, plants were mechanically inoculated with BaMMV according to a protocol of Habekuss et al. (2008) which had been established as a more reliable alternative to vector-mediated virus infection using the soil-borne plasmodiophorid *Polymyxa graminis*. Depending on the number of grains obtained from primary mutants, 13, 9, and 16 M₂ siblings were grown and screened (see Figure 3-3C). For this purpose, a total of 38 seedlings were cultivated in a growth chamber at 12°C and 16 h photoperiod and inoculated twice with an interval of five to 7 days at the three-leaf stage with leaf sap of BaMMV-ASL-infected barley plants. Six to 8 weeks after the first inoculation, visible symptoms as shown in Figure 3-3B were assessed. Additionally, the plants were screened for virus particles by double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (DAS-ELISA). Plants exhibiting an extinction E_{405} of 0.1 or below were considered resistant to BaMMV. Simultaneously, DNA was extracted from leaf samples of all test plants, PCR was performed for the *cas9* transgene and the target region was amplified and sequenced as described above. As control, non-transformed (non-edited) 'Igri' plants, referred to as 'wild-type', were included to the tests.

3.2.7. Yield Data

After resistance screening, M₂ plants were cultivated in a glasshouse with 18–20°C/ 12–14°C day/night with 16 h light to maturity, harvested and ears were threshed. The total grain number of each individual plant was counted and total grain weight was measured. Thousand grain weight (TGW) was calculated as

$$TGW = \frac{\text{Grain weight}}{\text{Grain number}} * 1000$$

An analysis of variance (ANOVA) and Post-Hoc Test (Tukey HSD) were performed using the statistics software R version 3.6.1 (R Core Team, 2019). Plots were generated with R package ggplot2 (Wickham, 2016).

3.3. Results

After cloning pInt_EIF4E_TM1, pInt_EIF4E_TM2, pInt_EIF4E_TM3, and pInt_EIF4E_TM4 bearing *cas9* and target motif-specified gRNA expression units, a barley protoplast-based test assay was performed to pre-validate the construct performance in terms of mutagenesis efficiency. After transformation and incubation of protoplasts (see Figure 3-2A), their genomic DNA was extracted and PCR amplicons of target regions were deep-sequenced. For each target motif, several hundred reads were obtained. The alignment of the sequencing reads to the 'Morex' reference sequence revealed that the proportions of mutated sequence reads related to the total read numbers

3. Targeted Knockout of *EIF4E*

(including wild-type) were as high as 17.1%, with the best results being achieved in target motif 1 (see Figure 3-1B). The most frequent mutations observed in protoplasts were small deletions of 1–5 base pairs or insertions of one base pair (A or T) at the expected Cas9 cleavage site residing three to four base pairs upstream of the protospacer-adjacent motif (PAM) (Jinek et al., 2012) as shown in Figure 3-2B. Unfortunately, only after sequencing, the PAM of target motif 4 was found to be unsuitable, because it features a single nucleotide polymorphism in 'Igrí' as compared to the barley genomic reference sequences of cv. 'Morex'.

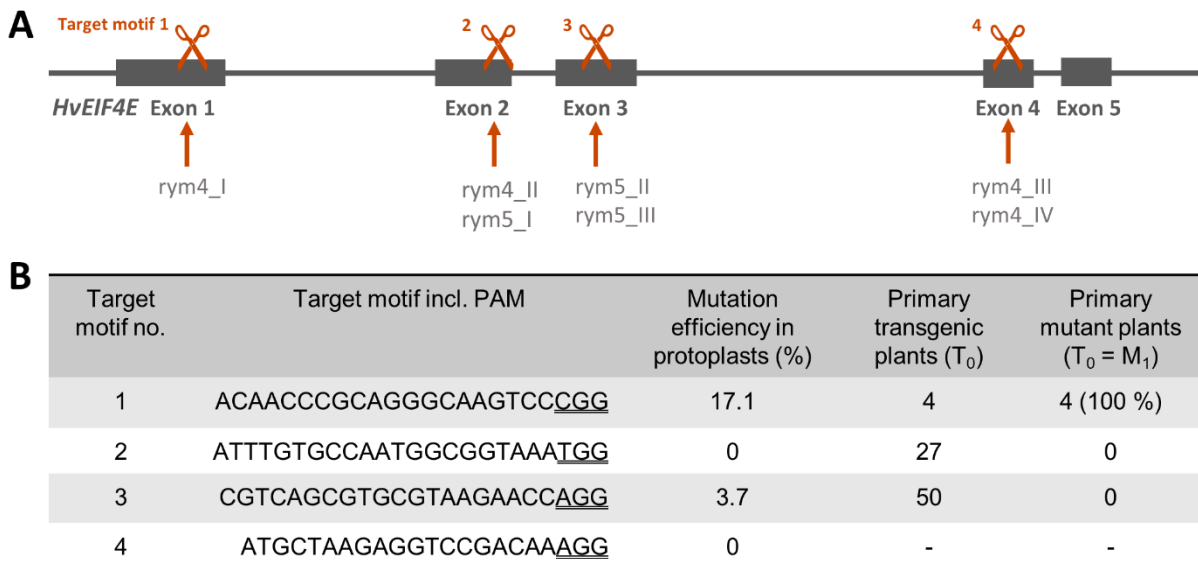


Figure 3-1: **A:** Gene structure of *EIF4E*, positions of previously described single nucleotide polymorphisms in *rym4* and *rym5* resistance alleles and positions of Cas9/gRNA target motifs for site-directed mutagenesis in *Hordeum vulgare*. Targets indicated by scissors symbols, genomic *EIF4E* sequence shown by grey line and exons by grey boxes. **B:** Summary of target sequences, results of protoplast-based pre-validation of mutation efficiency, number of regenerated plants upon *Agrobacterium*-mediated DNA transfer to embryogenic pollen cultures of winter barley cv. 'Igrí', and mutant plants detected amongst transgenic regenerants.

After cloning the binary vectors pBin_EIF4E_TM1, pBin_EIF4E_TM2, and pBin_EIF4E_TM3 with the expression cassettes for *cas9* and the gRNAs against target motifs 1, 2, and 3, *Agrobacterium*-mediated DNA transfer to embryogenic pollen cultures of winter barley cv. 'Igrí' was used to produce transgenic plants. Addressing target motifs 1, 2, and 3, four, twenty-seven and fifty primary transgenic plants were obtained from one, five and one transformation experiments, respectively. All regenerated plants were PCR-positive for the *cas9* gene and were subjected to Sanger sequencing of the addressed target motifs. Whereas independent 1-bp insertions of T or A were found three base pairs upstream of the PAM in each of the four plants carrying pBin_EIF4E_TM1 (see Figure 3-2C), no mutations whatsoever were detected in plants transformed using pBin_EIF4E_TM2 and pBin_EIF4E_TM3. The undisturbed chromatograms obtained for the four primary mutant plants were taken as indication for homozygosity of the induced mutations. Progenies of three independent primary mutants were genotyped by PCR screening for the *cas9* transgene and by Sanger sequencing of the target region. All individuals carried the same mutations known from their respective parent, thereby confirming its homozygous state. In addition, these M_2 plants were mechanically inoculated with BaMMV, whereby all of them proved resistant to the infection (see Figure 3-3C).

The insertion of one base pair at position 169 of the *EIF4E* coding sequence results in a shift of the reading frame during translation of the mRNA, which itself causes a non-sense amino acid sequence downstream of this insertion site including a premature stop codon at position 306 (after approx. one third) of the coding sequence (see Supplementary Material 10.1.1).

3. Targeted Knockout of *EIF4E*

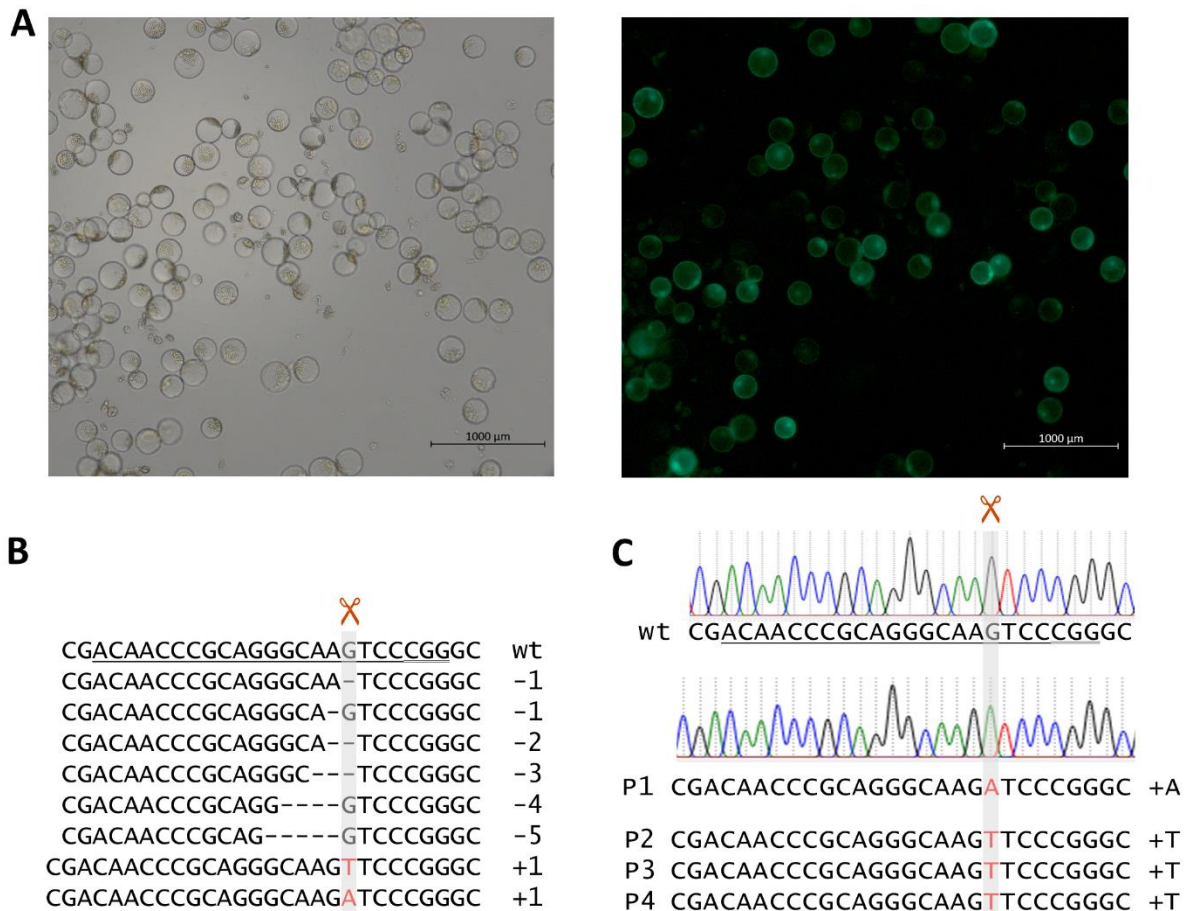


Figure 3-2: **A:** Mesophyll protoplasts of winter barley cv. 'Igr1' after PEG-mediated transformation with a GFP-carrying vector, after 60 h of incubation at 21 °C. These protoplasts serving as positive control for viability and genetic transformation, respectively, were recorded using bright field (left) and epifluorescence (right) microscopy. **B:** Deep-sequencing of amplicons of target region 1 after transformation of barley protoplasts using vectors carrying *cas9* and target motif 1-specific gRNA expression units. **C:** Chromatograms of Sanger sequencing target region 1 of wild-type 'Igr1' as compared with primary mutant plants. The unambiguous DNA sequence indicates homozygosity of the inserted A nucleotide. Grey vertical bars: cleavage positions, horizontal lines: deletions, red letters: insertions, wt: wild-type sequence, target motifs underlined with PAMs being double underlined, +A: 1-bp insertion of adenine nucleobase, +T: 1-bp insertion of thymine nucleobase.

Yield was assessed based on thousand-grain weight and grain number per plant (GNP) of the three analyzed M_2 families. The thousand-grain weight of the mutant families P1 (mean 46 g, ± 3.5), P3 (47 g ± 3.1), and P4 (45.7 g, ± 2.4) was on a par with that of non-mutated, transgenic segregants from a similar experiment (50.7 g, ± 4.9) and of 'Igr1' wild-type (48.9 g, ± 3.2) grown under the same glasshouse conditions (see Figure 3-4A; Supplement Table 10-2). According to a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post-hoc test, no significant differences in the thousand-grain weight were observed ($p \geq 0.05$). However, the total grain yield per plant was decreased owing to a reduction in the number of grains produced per plant. This phenomenon was consistent across all three analyzed mutant lines (P1: 72 grains, ± 29 ; P3: 79 grains, ± 25 ; P4: 72 grains, ± 30) which were compared to wild-type (220 grains, ± 59) and non-mutated segregants (198, ± 37) ($p < 0.001$; see Figure 3-4B; Supplementary Table 10-2).

3. Targeted Knockout of *EIF4E*

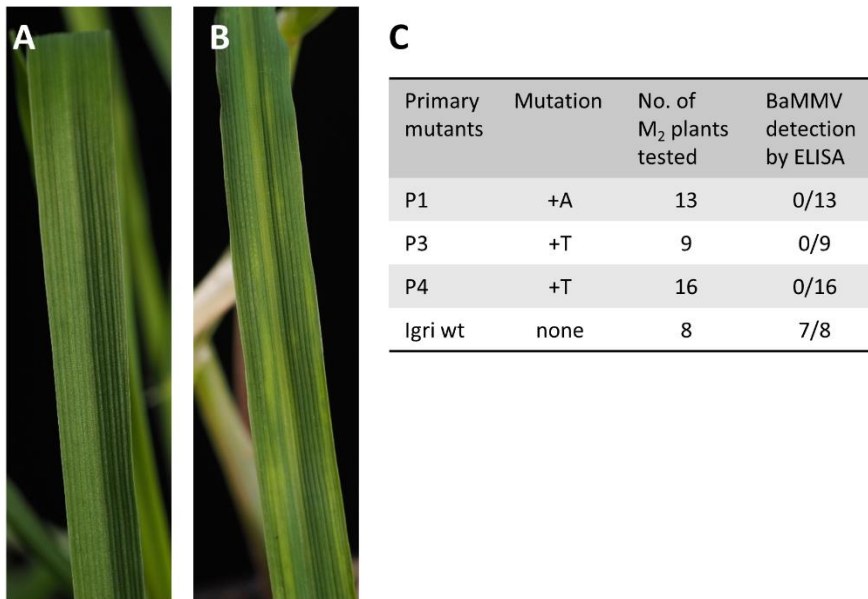


Figure 3-3: **A:** Healthy leaf of winter barley 'Igri' approximately 2 months after sowing. **B:** Symptoms of *Barley Mild Mosaic Virus* (BaMMV) infection seven weeks after mechanical inoculation of wild-type 'Igri'. **C:** Results from mechanical BaMMV inoculation of M₂ plants followed by DAS-ELISA for detection of virus particles and concomitant molecular characterization of mutation status. All M₂ plants carried the same mutation as their parental plant, confirming homozygosity of the latter. All mutants proved resistant against BaMMV infection.

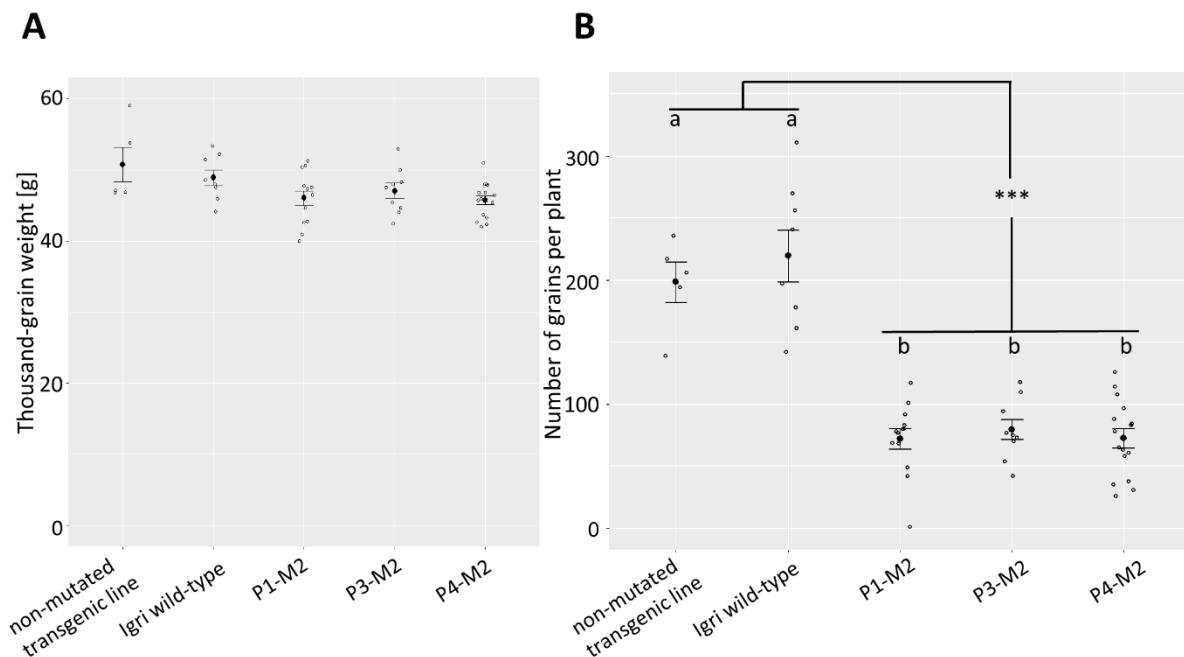


Figure 3-4: **A:** Thousand-grain weight of three M₂ populations (9 to 16 siblings each), compared to non-mutated segregants from a comparable transformation experiment (n=5) and 'Igri' wild-type (n=8), grown under the same conditions. Black dots show the average weights of 1,000 grains in g, error bars indicate standard errors. Statistically significant differences were not detectable (Tukey's test, $p \geq 0.05$). **B:** Total number of grains per plant of three M₂ populations (9 to 16 siblings each), compared to non-mutated segregants from a comparable transformation experiment (n=5) and 'Igri' wild-type (n=8), grown under the same conditions. Black dots show the average numbers of grains per plant, error bars indicate standard errors. Samples without statistically significant differences (Tukey's test, $p > 0.8$) are indicated by same letters, statistically significant differences between the two groups indicated by '***' (Tukey's test, $p < 0.0001$).

3.4. Discussion

The pre-validation of *cas9*/gRNA constructs *via* protoplast assay proved conclusive for targeted mutagenesis at the whole-plant level. Notably, comparatively low mutation rates were expected, because targeting specifically those regions known for resistance-conferring mutations required trade-offs with respect to some efficiency-related criteria for the selection of target motifs (Kumlehn et al., 2018). Target motifs 2 and 3 showed zero to very low mutation rates in protoplasts and so they did in *cas9*/gRNA transgenic plants. Positional effects might have played a role, since both target motifs mutated with low efficiencies are located close to each other on exons 2 and 3. Furthermore, the protospacer-adjacent motif (PAM) of target motif 4 was found to be unsuitable only after sequencing, because it features a single nucleotide polymorphism in 'Igri' as compared to the barley genomic reference sequences that were used for target motif selection (see also Supplementary Material 10.1.1). For target motif 1, the insertions found in transgenic plants were also amongst the most frequent mutations detected in the respective protoplast assay (see Figure 3-2B). The mutations proved instantly homozygous in all four primary transgenic plants, most likely due to the particularity of the applied transformation method which involves gene transfer to haploid cells followed by whole-genome duplication (Kumlehn et al., 2006; see Figure 3-2C and Figure 3-3C). To the best of our knowledge, this represents the first example of generating homozygous mutations via transfer of *cas9*/gRNA-encoding DNA to haploid cells that are capable of giving rise to (doubled haploid) plants. This enables us to evaluate phenotypes of homozygous mutants already in early generations after transformation. As a trade-off, these plants are most likely also homozygous for the *cas9*/gRNA-transgene. However, this disadvantage is considered irrelevant in the scientific exemplification demonstrated in the present study, in which also a rather outdated barley cultivar was used to take advantage of its amenability to genetic transformation. Moreover, there is the option of crossing these mutants with wild-type plants, followed by selfing of F₁ plants, which would readily result in T-DNA-free segregants that still carry the mutated *eif4e* allele in the homozygous state. Also, the mutation at the target motif itself prevents the occurrence of new mutation events by disturbing the gRNA to bind to the target sequence. To exclude any effects of the transgene itself, five non-mutated plants carrying events of the same transgene except from the 20 bp target-specific gRNA sequence were used as control and their grain yield was on a par with that of 'Igri' wild-type plants.

The one-base pair insertion between position 169 and 170 in the *EIF4E* coding sequence (position 400-401 in the genomic sequence) causes a frameshift in the translational reading frame, resulting not only in a nonsense amino acid sequence downstream of the mutation, but also in a premature stop codon at position 265 bp of the coding sequence (see Supplementary Material 10.1.1). Consequently, the resultant protein sequence is non-functional with very high certainty. Owing to the loss-of-function of the eIF4E protein, the plant lacks one of its most important interaction partners for bymoviruses (Wang and Krishnaswamy, 2012). That mechanism has been reported to confer broad resistance to several bymoviruses in a number of dicotyledonous plants as, for instance, cucumber, tomato and *Arabidopsis* (Chandrasekaran et al., 2016; Pyott et al., 2016; Atarashi et al., 2020; Moury et al., 2020). However, in a temperate cereal such as barley, the full knock-out of *EIF4E* was rather expected to be lethal; Yang et al. (2016) screened over 2,900 wild and domesticated barley accessions and identified 65 haplotypes for *HvEIF4E*, of which 19 were associated with resistance to bymoviruses. The allelic diversity included various non-synonymous point mutations, whereas knockout alleles were not present. Hence, it was concluded that a knockout of *HvEIF4E* cannot be complemented by its paralogue *HvEIF(iso)4E* without disadvantage for the plants. Hofinger et al. (2011) described the haplotype diversity of *EIF4E* in barley in comparison to its paralogue *EIF(iso)4E*. While a rather high diversity was described for the first, most likely due to positive selection pressure by co-evolution with bymoviruses, rather low haplotype diversity was found for the latter, suggesting different functions of *EIF4E* and *EIF(iso)4E* in barley. Nevertheless, during our experiments in climate chamber and glasshouse,

HvEIF4E knockout plants grew vigorously and produced grains. However, the total number of grains per plant was significantly affected. Previous publications on targeted *EIF4E* knockouts with resulting resistance to Potyviruses in other plant species unfortunately did not contain yield data to refer to here (Chandrasekaran et al., 2016; Gomez et al., 2019). Since isogenic wild-type lines for barley accessions with *rym4*- or *rym5*-mediated resistance are not yet available, it is not even known whether these widely used resistances are associated with yield reduction. The results of our study need confirmation under field conditions to elucidate whether the *eif4e* knockout represents a viable novel source of resistance to bymoviruses in barley, which most likely, in contrast to *rym4* and *rym5* and the other alleles known at this locus, may be effective to all strains of BaMMV and BaYMV. In the event that the yield penalty seen in the present investigation will be confirmed under field conditions, the option remains for future biotechnological approaches to generate mutant alleles with sufficient functionality for the plant by inducing in-frame mutations, such as via base editing, so that a recruitment of the corresponding gene products by bymoviruses is no longer possible.

The availability of *eif4e* knockout mutants further offers the opportunity to dissect the effects of the individual SNPs jointly present in the *rym4*- and *rym5*-alleles as well as to elucidate the impact of various *EIF4E* alleles on yield, which could be achieved via complementation using synthetic alleles each carrying only one of those SNPs or various combinations thereof. The identification of effective SNPs will facilitate further efforts to generate novel resistance-conferring alleles by precise genome editing approaches.

3.5. Data Availability Statement

The original contributions presented in the study are included in the article/Supplementary Material, further inquiries can be directed to the corresponding author.

3.6. Author Contributions

DP, JK, and FO conceived the project and acquired the funding. JK, RH, DP devised the experimental setup. RH, IO, DP, NB, and AH performed the experiments and analyzed the data. RH wrote the article, JK, FO, and DP edited the article. All authors approved the article.

3.7. Funding

The research was funded in frame of the IdeMoDeResBar project (FKZ 031B0199 (phase 1) and 031B0887 (phase 2)) by the German Federal Ministry of Education and Science (BMBF).

3.8. Conflict of Interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

3.9. Publisher's Note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

3.10. Acknowledgments

The authors thank Carola Bollmann, Ingrid Dubsy, and Katy Niedung for excellent technical assistance.

3.11. Supplementary Material Chapter 3

The supplementary material for this chapter is given under 10.1:

10.1.1 S1: Sequences, Off-Target Analysis, mutated Alleles

10.1.2 Table S1: Oligonucleotide Sequences

10.1.3 Table S2: Plant Data and Statistics

3.12. References Chapter 3

- Atarashi, H., Jayasinghe, W. H., Kwon, J., Kim, H., Taninaka, Y., Igarashi, M., et al. (2020). Artificially Edited Alleles of the Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E1 Gene Differentially Reduce Susceptibility to Cucumber Mosaic Virus and Potato Virus Y in Tomato. *Front. Microbiol.* 11, 564310. doi:10.3389/fmicb.2020.564310
- Chandrasekaran, J., Brumin, M., Wolf, D., Leibman, D., Klap, C., Pearlsman, M., et al. (2016). Development of Broad Virus Resistance in Non-Transgenic Cucumber Using CRISPR/Cas9 Technology. *Mol. Plant Pathol.* 17, 1140–1153. doi:10.1111/mpp.12375
- Gerasimova, S. V., Hertig, C., Korotkova, A. M., Kolosovskaya, E. V., Otto, I., Hiekel, S., et al. (2020). Conversion of Hulled into Naked Barley by Cas Endonuclease-Mediated Knockout of the NUD Gene. *BMC Plant Biol.* 20, 255. doi:10.1186/s12870-020-02454-9
- Gerasimova, S. V., Korotkova, A. M., Hertig, C., Hiekel, S., Hoffie, R., Budhagatapalli, N., et al. (2018). Targeted Genome Modification in Protoplasts of a Highly Regenerable Siberian Barley Cultivar Using RNA-Guided Cas9 Endonuclease. *Vestn. Vojis* 22, 1033–1039. doi:10.18699/VJ18.447
- Gomez, M. A., Lin, Z. D., Moll, T., Chauhan, R. D., Hayden, L., Renninger, K., et al. (2019). Simultaneous CRISPR/Cas9-Mediated Editing of Cassava eIF4E Isoforms nCBP-1 and nCBP-2 Reduces Cassava Brown Streak Disease Symptom Severity and Incidence. *Plant Biotechnol. J.* 17, 421–434. doi:10.1111/pbi.12987
- Habekuss, A., Kühne, T., Krämer, I., Rabenstein, F., Ehrig, F., Ruge-Wehling, B., et al. (2008). Identification of Barley Mild Mosaic Virus Isolates in Germany Breaking Rym5 Resistance. *J. Phytopathol* 156 (1), 36–41. doi:10.1111/j.1439-0434.2007.01324.x
- Hofinger, B. J., Russell, J. R., Bass, C. G., Baldwin, T., dos Reis, M., Hedley, P. E., et al. (2011). An Exceptionally High Nucleotide and Haplotype Diversity and a Signature of Positive Selection for the eIF4E Resistance Gene in Barley Are Revealed by Allele Mining and Phylogenetic Analyses of Natural Populations. *Mol. Ecol.* 20, 3653–3668. doi:10.1111/j.1365-294X.2011.05201.x
- Jiang, C., Kan, J., Ordon, F., Perovic, D., and Yang, P. (2020). Bymovirus-induced Yellow Mosaic Diseases in Barley and Wheat: Viruses, Genetic Resistances and Functional Aspects. *Theor. Appl. Genet.* 133, 1623–1640. doi:10.1007/s00122-020-03555-7
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., and Charpentier, E. (2012). A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science* 337, 816–821. doi:10.1126/science.1225829
- Kanyuka, K., Druka, A., Caldwell, D. G., Tymon, A., McCallum, N., Waugh, R., et al. (2005). Evidence that the Recessive Bymovirus Resistance Locus Rym4 in Barley Corresponds to the Eukaryotic

3. Targeted Knockout of *EIF4E*

- Translation Initiation Factor 4E Gene. *Mol. Plant Pathol.* 6, 449–458. doi:10.1111/j.1364-3703.2005.00294.x
- Koeppel, I., Hertig, C., Hoffie, R., and Kumlehn, J. (2019). Cas Endonuclease Technology-A Quantum Leap in the Advancement of Barley and Wheat Genetic Engineering. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 2647. doi:10.3390/ijms20112647
- Kumlehn, J., Pietralla, J., Hensel, G., Pacher, M., and Puchta, H. (2018). The CRISPR/Cas Revolution Continues: From Efficient Gene Editing for Crop Breeding to Plant Synthetic Biology. *J. Integr. Plant Biol.* 60, 1127–1153. doi:10.1111/jipb.12734
- Kumlehn, J., Serazetdinova, L., Hensel, G., Becker, D., and Loerz, H. (2006). Genetic Transformation of Barley (*Hordeum vulgare* L.) via Infection of Androgenetic Pollen Cultures with *Agrobacterium Tumefaciens*. *Plant Biotechnol. J.* 4, 251–261. doi:10.1111/j.1467-7652.2005.00178.x
- Li, H., and Shirako, Y. (2015). Association of VPg and eIF4E in the Host Tropism at the Cellular Level of Barley Yellow Mosaic Virus and Wheat Yellow Mosaic Virus in the Genus Bymovirus. *Virology* 476, 159–167. doi:10.1016/j.virol.2014.12.010
- Moury, B., Lebaron, C., Szadkowski, M., Ben Khalifa, M., Girardot, G., Bolou Bi, B. A., et al. (2020). Knock-Out Mutation of Eukaryotic Initiation Factor 4E2 (eIF4E2) Confers Resistance to Pepper Veinal Mottle Virus in Tomato. *Virology* 539, 11–17. doi:10.1016/j.virol.2019.09.015
- Priyam, A., Woodcroft, B. J., Rai, V., Moghul, I., Munagala, A., Ter, F., et al. (2019). Sequenceserver: A Modern Graphical User Interface for Custom BLAST Databases. *Mol. Biol. Evol.* 36, 2922–2924. doi:10.1093/molbev/msz185
- Pyott, D. E., Sheehan, E., and Molnar, A. (2016). Engineering of CRISPR/Cas9-mediated Potyvirus Resistance in Transgene-free Arabidopsis Plants. *Mol. Plant Pathol.* 17, 1276–1288. doi:10.1111/mpp.12417
- R Core Team (2019). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.
- Sanfaçon, H. (2015). Plant Translation Factors and Virus Resistance. *Viruses* 7, 3392–3419. doi:10.3390/v7072778
- Shan, Q., Wang, Y., Li, J., and Gao, C. (2014). Genome Editing in Rice and Wheat Using the CRISPR/Cas System. *Nat. Protoc.* 9, 2395–2410. doi:10.1038/nprot.2014.157
- Stein, N., Perovic, D., Kumlehn, J., Pellio, B., Stracke, S., Streng, S., et al. (2005). The Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E Confers Multiallelic Recessive Bymovirus Resistance in *Hordeum vulgare* (L.). *Plant J.* 42, 912–922. doi:10.1111/j.1365-313X.2005.02424.x
- Wang, A., and Krishnaswamy, S. (2012). Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E-Mediated Recessive Resistance to Plant Viruses and its Utility in Crop Improvement. *Mol. Plant Pathol.* 13, 795–803. doi:10.1111/j.1364-3703.2012.00791.x
- Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Cham: Springer.

3. Targeted Knockout of *EIF4E*

Yang, P., Habekuß, A., Hofinger, B. J., Kanyuka, K., Kilian, B., Graner, A., et al. (2016). Sequence Diversification in Recessive Alleles of Two Host Factor Genes Suggests Adaptive Selection for Bymovirus Resistance in Cultivated Barley from East Asia. *Theor. Appl. Genet.* 130, 331–344. doi:10.1007/s00122-016-2814-z

Yang, P., Lüpken, T., Habekuss, A., Hensel, G., Steuernagel, B., Kilian, B., et al. (2014). Protein Disulfide Isomerase Like 5-1 Is a Susceptibility Factor to Plant Viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 111, 2104–2109. doi:10.1073/pnas.1320362111

© 2021 Hoffie, Otto, Perovic, Budhagatapalli, Habekuß, Ordon and Kumlehn. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License \(CC BY\)](#). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

4. Novel Resistance to the Bymovirus BaMMV established by Targeted Mutagenesis of the *PDIL5-1* Susceptibility Gene in Barley

Robert Eric HOFFIE¹, Dragan Perovic², Antje Habeku², Frank Ordon², Jochen Kumlehn¹

¹Plant Reproductive Biology, Leibniz-Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK), Corrensstrasse 3, 06466 Seeland, OT Gatersleben, Germany

²Institute for Resistance Research and Stress Tolerance, Julius Kuehn Institute (JKI), Federal Research Centre for Cultivated Plants, Erwin-Baur-Str. 27, 06484 Quedlinburg, Germany

Original Research Article published in *Plant Biotechnology Journal*, 11 October 2022

<https://doi.org/10.1111/pbi.13948>

Keywords: Cas9, CRISPR, Potyvirus, MMEJ, *Agrobacterium*, doubled haploids, genome editing, prebreeding

Abstract

The Potyviridae are the largest family of plant-pathogenic viruses. Members of this family are the soil-borne bymoviruses *barley yellow mosaic virus* (BaYMV) and *barley mild mosaic virus* (BaMMV) which, upon infection of young winter barley seedlings in autumn, can cause yield losses as high as 50%. Resistance breeding plays a major role in coping with these pathogens. However, some viral strains have overcome the most widely used resistance. Thus, there is a need for novel sources of resistance. In ancient landraces and wild relatives of cultivated barley, alleles of the susceptibility factor *PROTEIN DISULFIDE-ISOMERASE-LIKE 5-1* (*PDIL5-1*) were identified to confer resistance to all known strains of BaYMV and BaMMV. Although the gene is highly conserved throughout all eukaryotes, barley is thus far the only species for which *PDIL5-1*-based virus resistance has been reported. Whereas introgression by crossing to the European winter barley breeding pool is tedious, time-consuming and additionally associated with unwanted linkage drag, the present study exemplifies an approach to targeted mutagenesis of two barley cultivars employing CRISPR-associated endonuclease technology to induce site-directed mutations similar to those described for *PDIL5-1* alleles that render certain landraces resistant. Homozygous primary mutants were produced in winter barley, and transgene-free homozygous M₂ mutants were produced in spring barley. A variety of mutants carrying novel *PDIL5-1* alleles were mechanically inoculated with BaMMV, by which all frameshift mutations and certain in-frame mutations were demonstrated to confer resistance to this virus. Under greenhouse conditions, virus-resistant mutants showed no adverse effects in terms of growth and yield.

4.1. Introduction

Viruses, along with insects and fungi, are among the most important pathogens of crop plants. *Potyviridae* represent the largest group of plant pathogenic viruses. They are enveloped, filamentous single-strand (+) RNA viruses transmitted by vectors, i.e., insects or soil-borne fungi to various mono- and dicotyledonous plants. From this family, soil-borne representatives of the genus *Bymovirus* are particularly important in the cultivation of barley and wheat in Europe and Asia (Kühne, 2009). For winter barley grown in the temperate zone, barley yellow mosaic virus (BaYMV) and barley mild mosaic virus (BaMMV) are of the highest importance. Mainly in autumn, they are transmitted by the plasmodiophorid *Polymyxa graminis* via the roots into young seedlings. The infection initially causes yellow mosaics on the leaves of juvenile plants, reduces winter hardiness and, in spring, impacts plant growth and tillering. As a consequence, as much as 50% yield losses can be caused in infested fields. In Europe, two strains of BaYMV and one strain of BaMMV are common, but additional strains are known (comprehensively reviewed in Jiang et al. (2020)).

The *EUKARYOTIC TRANSLATION INITIATION FACTOR 4E (EIF4E)* and its isoform *EIF(iso)4E* have been described as interaction factors for *Potyviridae* in a number of di- and monocotyledonous plants (Sanfaçon, 2015). They bind to the viral genome-linked protein (VPg) that mimics the m⁷G cap of eukaryotic mRNAs at the 5' end of the viral RNA. Thus, viral RNA is translated into viral proteins by the translational machinery of the host plant. Barley was the first cereal in which virus resistance-mediating *EIF4E* alleles were identified. In European winter barley breeding, the *EIF4E* alleles *rym4* (resistance to BaYMV-1 and BaMMV) and *rym5* (resistance to BaYMV-1, -2, and BaMMV) are used extensively (Stein et al., 2005). For instance, in Germany, the vast majority of current winter barley cultivars is resistant to BaMMV and BaYMV, mostly due to the *rym4* or *rym5* alleles (Bundessortenamt, 2021). Due to single nucleotide polymorphisms that entail alterations in the binding domain of the encoded eIF4E protein, the latter is no longer capable of interacting with the viral genome-linked protein (VPg) cap of the viral RNA. Thus, translation of the viral proteins is prevented. In addition to the early-emerging strain BaYMV-2, which has broken the *rym4* resistance, new pathotypes of BaMMV (BaMMV-Teik, BaMMV-Sil) were identified to break the *rym5*-conferred resistance (Habekuss et al., 2007; Kanyuka et al., 2004). The viruses overcome *EIF4E*-based resistance by changing the structure of their VPg RNA cap (Li et al., 2016), thus regaining the ability to interact with *rym4* or *rym5* variants of the eIF4E protein that initiates translation of the viral RNA. Since only *EIF4E*-mediated resistance is present in current winter barley cultivars, there is an urgent need for new resistance mechanisms in winter barley breeding material. The full knockout of *HvEIF4E* renders barley resistant to bymovirus infection, as described for other plants, but it is associated with a substantial yield penalty (Hoffie et al., 2021). In the landrace HOR1363 (formerly PI1963) and the Russian cultivar 'Russia 57', *rym11*, a locus associated with resistance to all known strains of BaYMV and BaMMV, was described (Nissan-Azzouz et al., 2005; Sedláček and Mařík, 2010). Later, *rym11* was identified as a knockout allele of the *PROTEIN DISULFIDE-ISOMERASE-LIKE 5-1* gene (*PDIL5-1*) (Yang et al., 2014). Protein disulfide isomerases are highly conserved enzymes in eukaryotes and feature thioredoxin (TRX) domains that act as chaperones catalyzing the formation of disulfide bridges between amino acids in the context of protein folding (Houston et al., 2005). *HvPDIL5-1* carries a KDEL localization signal for the endoplasmic reticulum. To date, virus resistance based on *PDIL5-1* orthologs has not been described in any plant species other than barley, although it is likely that this highly conserved gene interacts with *Potyviridae* in other plants as well.

By screening diverse barley germplasm, seven resistant haplotypes were found in East Asian landraces of barley, six of which carry deletions or stop codons leading to loss-of-function of the gene. The seventh haplotype has a single nucleotide polymorphism in exon 3 that results in a substitution of a conserved amino acid within a functional domain of the protein. All of these landraces are resistant to all known strains of BaYMV and BaMMV (Yang et al., 2017), while the

knockout of *PDIL5-1* does not appear to be associated with yield loss (Yang et al., 2014). Thus, *rym11* represents a valuable source of resistance for breeding. However, introgression of resistance-conferring alleles from landraces into current winter barley breeding material will require many years of backcrossing and selection.

RNA-guided Cas endonucleases derived from bacterial CRISPR-Cas immune systems have been established in cereals as effective tools for targeted mutagenesis (Hisano et al., 2021). Using this technology, target sequence-specified guide RNAs (gRNAs) are capable of precisely directing Cas endonucleases to predetermined positions in any candidate gene of choice, where the endonucleases induce DNA double-strand breaks whose error-prone repair can cause random mutations at the mended site. In barley, too, Cas endonuclease technology has been applied in some studies to validate gene functions or to introduce advantageous traits without any further modification of the genetic background (Gerasimova et al., 2020; Hisano et al., 2022; Hoffie et al., 2021; Li et al., 2019; Steckenborn et al., 2022). Since all potential *rym11* donors represent rather exotic germplasm for winter barley breeding, the site-directed generation of *rym11* alleles is considered as being a particularly useful approach towards the development of virus-resistant varieties.

In the present study, a variety of novel resistance-conferring *PDIL5-1* alleles, similar to those identified in some landraces, was generated by Cas9-mediated site-specific mutagenesis in the winter barley cultivar 'Igri' and the spring barley cultivar 'Golden Promise'. In the M₂ generation, resistance was tested by mechanical inoculation with BaMMV-ASL. In this generation, homozygous mutants lacking the Cas9 transgene were identified and shown to be completely resistant to infection. A greenhouse experiment revealed that *pdil5-1* mutants did not differ in yield components compared with their 'Igri' and 'Golden Promise' wild-type counterparts.

4.2. Material and Methods

4.2.1. Target Selection, Off-Target Analysis and Vector Cloning

Target motifs within the *HvPDIL5-1* gene (GenBank: HG793095.1) were individually selected based on their position within the gene sequence, the presence of an NGG protospacer-adjacent motif (PAM) and the 2-dimensional minimum free energy structures of the cognate single-gRNAs (NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU) as modeled by the RNAfold WebServer (Gruber et al., 2008). Target motifs were selected to obtain either early shifts of the translational reading frame or to induce single nucleotide polymorphisms in exon 3. The localization of target motifs and their sequences, including the PAM, are shown in Figure 4-1A, 4-1B and Supplementary Material S1 under 10.2.1. To the cognate gRNA of target motif 2, an adenosine that does not match with the target motif was added to the 5'-end to include a *U3* promoter-compatible transcription start. For the same reason, the specific 5'-parts of the gRNAs for target motifs 3 and 4 comprised only 19 nucleotides instead of the standard 20 nucleotides to feature an A as the first base.

Off-target analysis was performed by a BLAST search of the target motif, including the PAM, against the barley reference genome 'Morex' v3 and the genomes of 'Golden Promise' and 'Igri' with the GrainGenes BLAST Service (Jayakodi et al., 2020; Priyam et al., 2019), by which no potential off-targets were detected (see Supplementary Material 10.2.1).

Single-stranded DNA oligonucleotides (see Supplementary Table 10-3) were used for every gRNA as forward and reverse strands with overhangs for BsaI-based insertion into the generic vector pSH121 (GenBank-ID: MW145140.1, Gerasimova et al. (2018)) containing expression units of a rice *U3* promoter-driven gRNA scaffold and a maize codon-optimized Cas9 from *Streptococcus pyogenes* regulated by the maize *POLYUBIQUITIN 1* promoter.

For *Agrobacterium*-mediated barley transformation, these transgenes were directionally cloned via *Sfi*I digestion and ligation into the binary vector p6i-2x35S-TE9 (DNA cloning Service, Hamburg, Germany) carrying a doubled enhanced CaMV 35S promoter-driven *hpt* as a plant selectable marker gene and left and right border sequences for *Agrobacterium*-mediated gene transfer. The vectors were named pBin_PDIL5-1_TM1, pBin_PDIL5-1_TM2, pBin_PDIL5-1_TM3 and pBin_PDIL5-1_TM4.

4.2.2. *Agrobacterium*-mediated Barley Transformation

Winter barley cv. 'Igri' transformation using the vector pBin_PDIL5-1_TM2 was conducted by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated DNA transfer into embryogenic pollen cultures according to Kumlehn et al. (2006). In brief, highly vacuolated, immature pollen at the microspore stage was isolated from cold-treated spikes and cultivated for one week. For DNA transfer via *Agrobacterium* strain LBA4404/pSB1 carrying pBin_PDIL5-1_TM2, cell proliferation-undergoing pollen and agrobacteria were cocultivated for 48 hours, followed by pollen cultivation in the presence of Timentin to remove *Agrobacterium* and in the presence of hygromycin to facilitate the preferential development of transgenic tissue and regenerating plantlets.

Agrobacterium-mediated DNA transfer to immature embryos of the spring barley cv. 'Golden Promise' using pBin_PDIL5-1_TM1, pBin_PDIL5-1_TM2, pBin_PDIL5-1_TM3 and pBin_PDIL5-1_TM4 was performed as previously described by Hensel et al. (2009); immature embryos were excised from caryopses 12-16 days after pollination and cocultivated with *Agrobacterium* strain AGL1 carrying the respective binary vector for 48-72 hours. Then, the explants were cultivated for callus induction under selective conditions using Timentin and hygromycin followed by plant regeneration.

DNA was extracted from leaf samples using a phenol-chloroform-based protocol as described by Pallotta et al. (2000). The presence of T-DNA in regenerated plantlets was confirmed by PCR for *cas9* (for primer sequences, see Supplementary Table 10-3).

4.2.3. Amplification and Sequencing of Target Regions of Primary Mutants

Mutant plants were identified by PCR amplification of the respective target region (for primer sequences, see Supplementary Table 10-3) followed by Sanger sequencing. Double peaks in the chromatogram starting upstream of the PAM (see Figure 4-1C and 4-1D) were considered as an indication for chimeric and/or heterozygous mutants. Sequence alignments were performed to characterize the mutation patterns of plants with homozygous insertions or deletions. Mutant plants were grown in a greenhouse until the formation of mature grains

4.2.4. Mechanical BaMMV and BaYMV Inoculation and Analysis of M_2 Plants

Progenies of primary mutant plants were mechanically inoculated with the BaMMV 'Aschersleben' isolate (BaMMV-ASL) to screen for bymovirus resistance according to Habekuss et al. (2007). This procedure is a viable alternative to vector-mediated virus infection by *Polymyxa graminis*.

In material with the 'Igri' background, 20-40 grains each of five M_2 families mutated in target motif 2 were sown in a growth chamber at 12 °C and a 16-hour photoperiod, and nine to 20 siblings were obtained. Likewise, material with the 'Golden Promise' background was grown, sowing 20 grains each of five M_2 families mutated in target motifs 1 and 2, as well as four M_2 families mutated in target motif 4. Two weeks after germination, mutant and wild-type seedlings were inoculated twice at five- to seven-day intervals with leaf sap from BaMMV-infected barley plants. Six to eight weeks after the first inoculation, virus infection was determined by evaluation of phenotypic symptoms (yellow mosaics) on newly developed leaves. In addition, a double antibody sandwich-enzyme-linked immunosorbent assay (DAS-ELISA) was performed with fresh

leaves from the inoculated plants. At an extinction of $E_{450} \leq 0.1$, plants were considered resistant to BaMMV-ASL infection. In parallel, DNA was extracted from leaf samples of selected plants to test for the presence of the *cas9* transgene by PCR. Furthermore, target regions were PCR-amplified, followed by Sanger sequencing of PCR products for genotyping of a subset of mutants. The same procedure was used to inoculate four selected M_2 families carrying mutations in target motif 2 ('Igri' and 'Golden Promise' background) and target motif 3 ('Golden Promise' background) with BaYMV.

4.2.5. Yield Data

Selected M_2 plants were grown to maturity after resistance screening in a greenhouse with 18-20 °C/12-14 °C day/night temperatures with a 16-hour photoperiod. The plants were harvested, the ears were threshed, and the total grain number and the total grain weight were recorded for every single plant. The thousand-grain weight (TGW) was calculated as follows:

$$TGW = \frac{\text{Grain weight}}{\text{Grain number}} * 1000$$

Yield data were collected separately for the two barley genotypes used, as well as for the transformation constructs carrying different target motif-specified gRNA expression units. According to their mutation status, the segregating M_2 plants were then divided into groups for comparison (heterozygous/chimeric mutant, homozygous mutant and nonmutant) to each other and to wild-type plants. One-way analysis of variance (ANOVA) followed by a post hoc Tukey's test (Tukey HSD) was performed using R version 3.6.1 software (R Core Team, 2019). To generate the plots, the R package ggplot2 was used (Wickham, 2016). Significance code: *** $p \leq 0.001$; ** $p \leq 0.01$; * $p \leq 0.05$

4.3. Results

4.3.1. Mutations in the *PDIL5-1* Target Motif 2 confer Resistance of Winter Barley cv. 'Igri' to BaMMV

Agrobacterium-mediated transformation of winter barley cv. 'Igri' was performed using the vector pBin_PDIL5-1_TM2. In total, 39 plants were obtained from seven transformation experiments. Thirty-three plants were PCR-positive for the *cas9* transgene. Mutation screening by PCR amplification of the target region followed by Sanger sequencing of the amplicons revealed 11 plants (i.e., 28% of the regenerants) to carry mutations at target motif 2 (see Figure 4-1B for a summary). Two of these mutants (IG4TM2_P1 and IG6TM2_P2) were already homozygous for a 2-bp and a 22-bp deletion, respectively (see, e.g., IG4TM2_P1 in Figure 4-1C). The others were considered heterozygous or chimeric based on the appearance of double or multiple peaks in the sequencing chromatogram, which indicated that more than one allelic variant was present in the respective plant (see, e.g., IG6TM2_P1 in Figure 4-1C).

Five selected M_2 progenies were mechanically inoculated with BaMMV-ASL to validate the resistance of individual plants by phenotyping and virus-specific ELISA. In parallel, M_2 plants were genotyped with regard to the presence of the transgene (PCR for *cas9* gene), and for a subset of plants, Sanger sequencing of the target region was performed. In summary, 79 M_2 plants were inoculated with BaMMV-ASL, of which 44 showed resistance according to the results of the ELISA (for detailed results of individual plants, see Supplementary Material 10.2.3). All nine tested M_2 plants originating from the primary mutant IG4TM2_P1, which was homozygous for a 2-bp deletion at target motif 2, were invariably resistant to BaMMV inoculation, and every individual plant carried the same 2-bp deletion as their parent (see Figure 4-2A). The same features applied

4. Targeted Mutagenesis of *PDIL5-1*

to the 19 M₂ plants derived from the primary mutant IG6TM2_P2 that was homozygous for a 22-bp deletion (see Figure 4-2A). All of these plants were PCR-positive for the *cas9* transgene.

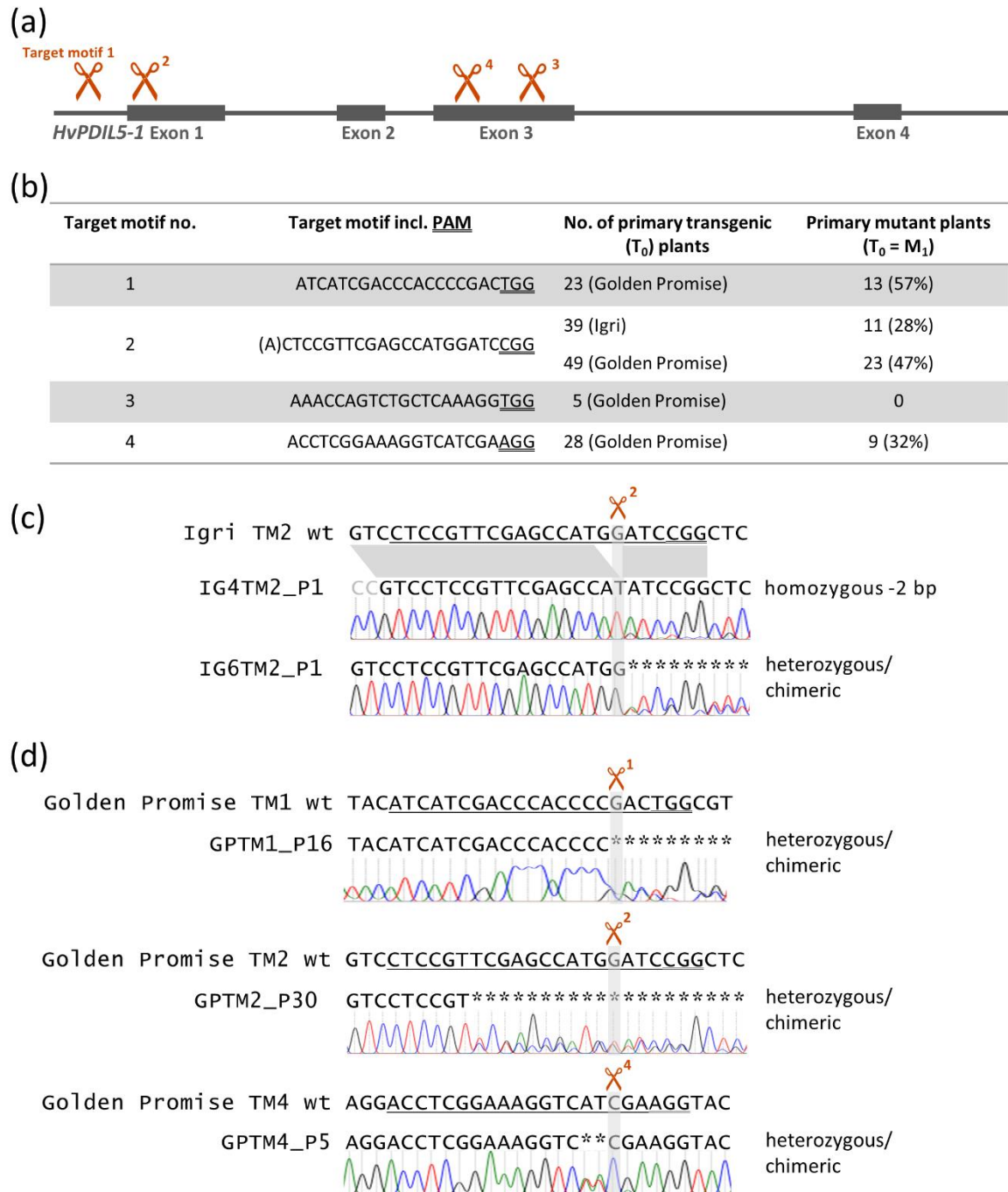


Figure 4-1: (a) Gene structure of *HvPDIL5-1* (gray line, exons indicated by gray boxes) and location of the target motifs (scissors). (b) Overview of Cas9/gRNA target motifs, including the respective protospacer adjacent motifs (PAM), number of primary transgenics with T-DNA carrying *cas9* and the respective gRNA and number of primary mutants screened by Sanger sequencing of target regions. (c) Chromatograms of two primary mutants in the 'Igri' background (target motif 2) aligned to the wild-type sequence of the target region. Homozygous deletion of 2 base pairs in IG4TM2_P1, while double peaks downstream of the cleavage site indicate a heterozygous or chimeric mutation state in IG6TM2_P1. (d) Chromatograms of one primary mutant for each target motif where mutations were successfully induced in the 'Golden Promise' background. Heterozygous InDels are indicated by double peaks downstream of the Cas9 cleavage site. Two double peaks in GPTM4_P5 indicate heterozygous base substitutions.

4. Targeted Mutagenesis of *PDIL5-1*

(a)

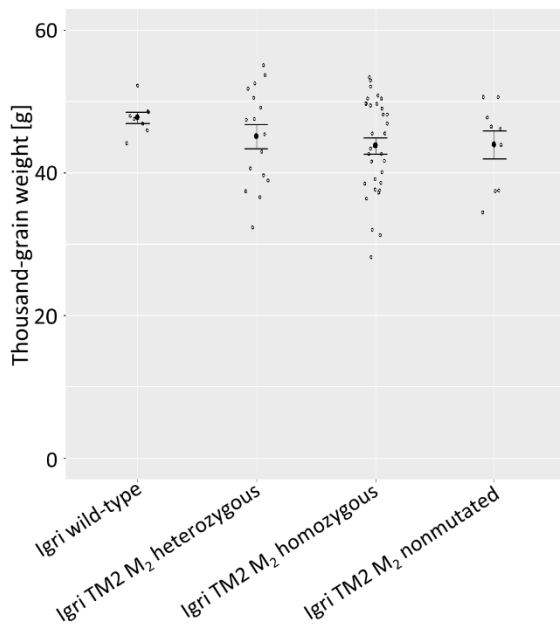
```

GTATCCGCCTTCTCCTCGTCTCCCCGTCTTCGCCGTGGCCGTCCTCCGTTTCGAGCCATGGATCCGGCTCTTCGGCGCC   Igr1 wild-type
GTATCCGCCTTCTCCTCGTCTCCCCGTCTTCGCCGTGGCCGTCCTCCGTTTCGAGCCAT--ATCCGGCTCTTCGGCGCC   IG4TM2_P1_9
GT-----ATCCGGCTCTTCGGCGCC   IG4TM2_P6_1
GTATCCGCCTTCTCCTCGTCTCCCCGTCTTCGCCGTGGCCGTCCTCCGTTTCGA-----GCC   IG6TM2_P2_4
GTATCCGCCTTCTCCTCGTCTCCCCGTCTTCGCCGTGGCCGTCCTCCGTTTCGAGCCATGGTCGTATCCGGCTCTTCGGCGCC   IG7TM2_P1_5
  
```

(b)

Plants		Phenotype	Genotype					
Primary mutant (M ₁)	Progeny (M ₂) tested	BaMMV-free (ELISA)	T-DNA-free plants	Sequenced plants	Non-mutated	Heterozygous mutants	Homozygous mutants	T-DNA-free mutants
Target Motif 2								
IG4TM2_P1	9	9	0	9	0	0	9	0
IG4TM2_P6	20	10	2	16	1	10	5	1
IG6TM2_P1	16	5	0	10	4	6	0	0
IG6TM2_P2	19	19	0	19	0	0	19	0
IG7TM2_P1	15	1	3	5	4	0	1	0
sum	79	44	5	59	9	16	34	1
wild-type								
Igr1	10	1	10	6	6	0	0	-

(c)



(d)

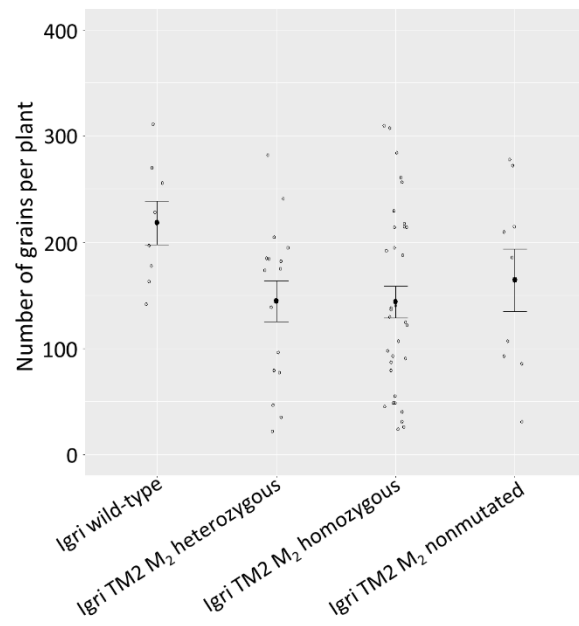


Figure 4-2: (a) Alignment of sequences from homozygous M₂ mutants in the 'Igr1' background (target motif 2) to the wild-type sequence of the target region. Cleavage sites of Cas9 are indicated by scissors, deletions by dashes, and insertions in red. Larger deletions of 58 base pairs (IG4TM2_P6_1) and 22 base pairs (IG6TM2_P2_4) were likely to be mediated by microhomologies (bold and dashed underlined). (b) Summary of phenotyping (mechanical inoculation of plantlets with BaMMV-ASL followed by DAS-ELISA for viral particles) and genotyping of M₂ progeny of primary mutants in the 'Igr1' background. (c) Thousand-grain weight of heterozygous and homozygous M₂ mutants compared with nonmutated segregants and 'Igr1' wild-type plants grown under the same conditions. No significant differences were observed according to the ANOVA and post hoc Tukey's test ($p > 0.05$). (d) Number of grains per plant of heterozygous and homozygous M₂ mutants compared with nonmutated segregants and 'Igr1' wild-type plants grown under the same conditions. No significant differences were observed according to the ANOVA and post hoc Tukey's test ($p > 0.05$).

The progeny of the three heterozygous and/or chimeric primary mutants IG4TM2_P6, IG6TM2_P1 and IG7TM2_P1 segregated with regard to transgenicity, mutation of the target gene and phenotype. The results are summarized in Figure 4-2B, and detailed results per plant are provided in the Supplementary Material 10.2.3. Heterozygous or chimeric M₂ plants as well as nonmutated siblings were mainly susceptible to BaMMV inoculation, whereas biallelic mutants were virus resistant. Of 20 M₂ plants derived from the primary mutant IG4TM2_P6, 10 were ELISA-negative for BaMMV, indicating resistance. Of 16 plants that were Sanger sequenced, five carried a homozygous 58-bp deletion (see Figure 4-2A) and one was biallelic (10-bp insertion and a 58-bp deletion). Based on the separation of PCR products of different sizes by agarose gel electrophoresis and separate elution, it was possible to individually sequence both alleles. This plant was the only T-DNA free (i.e., *cas9* PCR-negative) mutant with the background of cv. 'Igri'. Among the progeny of IG7TM2_P1, only one M₂ plant was found to be resistant to BaMMV, which was homozygous for a 4-bp deletion in the target motif (see Figure 4-2A).

Mechanical inoculation of leaves with BaYMV was not successful, i.e. BaYMV particles were neither detected in *PDIL5-1* mutants nor in their wild-type counterparts (see Supplementary Material 10.2.3).

As indicators for plant performance, the thousand-grain weight and number of grains per plant were assessed, and no significant differences were detected by multiple comparison between all groups (heterozygous mutants, homozygous mutants, nonmutated siblings, 'Igri' wild-type, $p > 0.05$, see Figure 4-2C, 4-2D and Supplementary Material 10.2.3).

4.3.2. *InDels as well as Single Nucleotide Polymorphisms in different Target Motifs confer Resistance of Spring Barley 'Golden Promise' to BaMMV*

Due to the higher efficiency in generating transgenic plants in spring barley cv. 'Golden Promise' via *Agrobacterium*-mediated DNA transfer to immature embryos, all four target motifs were addressed in this accession using the transformation vectors pBin_PDIL5-1_TM1, pBin_PDIL5-1_TM2, pBin_PDIL5-1_TM3 and pBin_PDIL5-1_TM4. In four independent transformation experiments, 23, 49, 5 and 28 plants were regenerated. All but three of these plants were PCR-positive for the *cas9* transgene. Target regions were sequenced as previously explained. For the individual target motifs, 13, 23, 0 and 9 primary mutants were obtained, which corresponded to 57%, 47% and 32% of the regenerated plants, respectively. All of these mutants were heterozygous/chimeric, as indicated by the double/multiple peaks in the sequencing chromatogram (see Figure 4-1B and 4-1D).

For the target motifs 1, 2 and 4, respectively, five, five and four primary mutants were selected, and their progeny were phenotyped for resistance to BaMMV-ASL and genotyped for transgenicity and target-specific mutation patterns. All of these families showed independent segregation of mutations and the transgene. Heterozygous/chimeric and nonmutated siblings were mainly susceptible to BaMMV-ASL infection, while homozygous frame-shift mutations (InDels) as well as in-frame base substitutions caused resistance to BaMMV. A summary of the results is provided in Figure 4-3B, and detailed data are listed in Supplementary Material 10.2.3. Here, some examples are described in detail. In the progeny of five primary mutants of target motif 1 (5'-UTR), GPTM1_P1, _P7, _P12, _P16 and _P23, two plants were PCR-negative for the *cas9* transgene, carried homozygous deletions of 18 bp (GPTM1_P1_16) and 1 bp (GPTM1_P16_12), respectively, and were resistant to virus infection. Except for plant GPTM1_P1_4, all susceptible individuals that were sequenced carried either heterozygous/chimeric mutations and/or the nonmutated wild-type allele, while all but one resistant plant showed heterozygous or homozygous InDels between 1 and 21 bp in size.

4. Targeted Mutagenesis of *PDIL5-1*

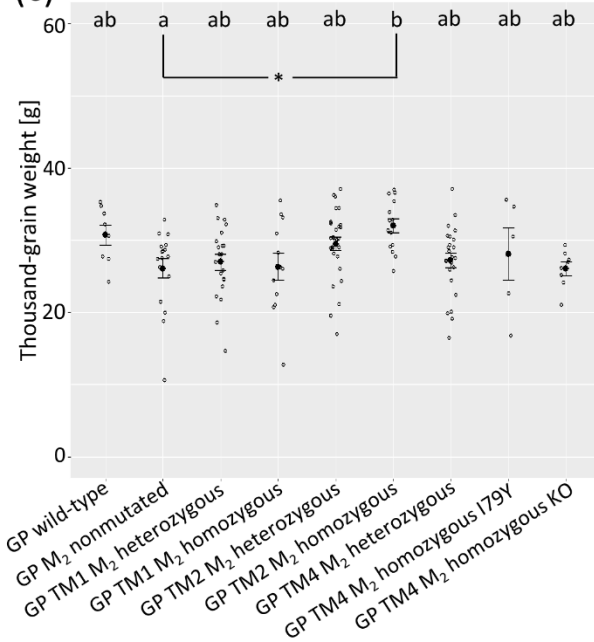
(a)

✂ ¹	TACATCATCGACCCACCCGACTGGCGTATCCGC TACATCATC-----CGC TACATCATCGACCCACCC-GACTGGCGTATCCGC TACATCATCGACCCACGCTAGTACTGCGCCGTATCCGC	GP wild-type GPTM1_P1_4 GPTM1_P16_12 GPTM1_P16_20	✂ ⁴	AGGACCTCGGAAAGGTCATCGAAGGTAC AGGACCTCGGAAAGGTC-CGAAGGTAC AGGACCTCGGAAAGGTCATCGAAGGTAC	GP wild-type GPTM4_P14_14 GPTM4_P21_10
✂ ²					
GTATCCGCCTTCTCCTCGTCTCCCGTCTTCGCCGTGGCCGTCTCCGTTGAGCCATGGATCCGGCTTTCGGCGCC GP wild-type GTATCCGCCTTCTCCTCGTCTCCCGTCTTCGCCGTGGCCGTCTCCGTTG-----GCGCC GPTM2_P22_4 GTATCCGCCTTCTCCCGCTCCCGTCTTCGCCGTGGCCGTCTCCGTTGAGCCATGG-TCCGGCTTTCGGCGCC GPTM2_P30_10-a1 GT-----ATCCGGCTTTCGGCGCC GPTM2_P30_10-a2					

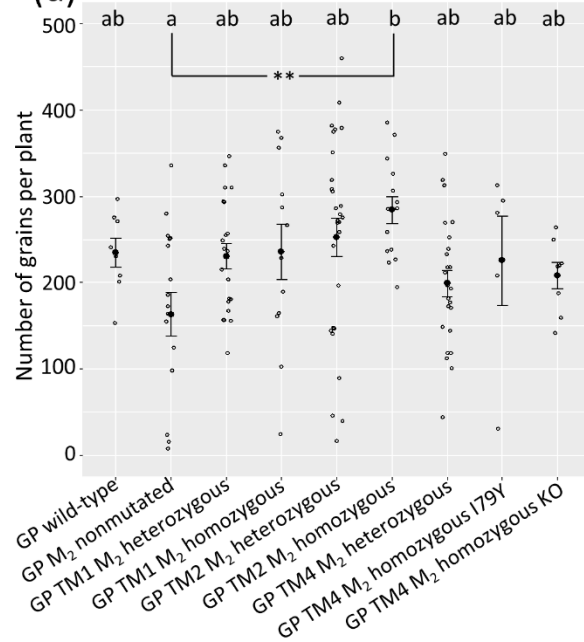
(b)

Plants		Phenotype BaMMV-free (ELISA)	Genotype					
Primary mutant (M ₁)	Progeny (M ₂)		T-DNA-free plants	Sequenced plants	Non-mutated	Heterozygous mutants	Homozygous mutants	T-DNA-free mutants
Target Motif 1								
GPTM1_P1	20	4	4	6	1	2	3	1
GPTM1_P7	19	0	3	3	0	3	0	1
GPTM1_P12	20	15	5	13	1	9	3	2
GPTM1_P16	17	15	2	9	0	5	4	2
GPTM1_P23	18	6	6	8	2	4	2	0
Target Motif 2								
GPTM2_P9	20	18	2	19	4	12	3	1
GPTM2_P11	20	6	4	8	0	3	5	3
GPTM2_P22	18	16	2	15	0	9	6	1
GPTM2_P30	18	7	3	5	1	4	0	0
GPTM2_P50	19	5	3	7	7	0	0	0
Target Motif 4								
GPTM4_P5	20	17	7	12	0	6	6	6
GPTM4_P11	19	17	4	9	1	8	0	1
GPTM4_P14	16	13	1	9	0	5	4	1
GPTM4_P21	12	9	1	8	0	5	3	1
sum	256	148	47	131	17	75	39	20
Wild-type								
Golden Promise	11	3	11	5	5	0	0	-

(c)



(d)



4. Targeted Mutagenesis of *PDIL5-1*

Figure 4-3: (a) Alignment of sequences from homozygous M₂ mutants (InDels) in the 'Golden Promise' (GP) background (target motifs 1, 2 and 4) to the wild-type sequence of the respective target region. The cleavage site of Cas9 is indicated by scissors, deletions by dashes, and insertions in red. Larger deletions of 21 base pairs (GPTM1_P1_4) up to 58 base pairs (GPTM2_P30_10 allele 2) were likely to be mediated by microhomologies (bold and dashed underlined). **(b)** Summary of phenotyping (mechanical inoculation of plantlets with BaMMV-ASL followed by DAS-ELISA for viral particles) and genotyping of M₂ progeny of primary mutants in the 'Golden Promise' background. **(c)** Thousand-grain weight of heterozygous and homozygous M₂ mutants for each target motif compared with nonmutated segregants and 'Golden Promise' wild-type plants grown under the same conditions. Significant differences were only observed between nonmutated segregants and homozygous mutants at target motif 2, according to the ANOVA and post hoc Tukey's test ($p < 0.05$), but not between the other variants ($p > 0.05$). **(d)** Number of grains per plant of heterozygous and homozygous M₂ mutants for each target motif compared with nonmutated segregants and 'Golden Promise' wild-type plants grown under the same conditions. Significant differences were only observed between nonmutated segregants and homozygous mutants at target motif 2, according to the ANOVA and post hoc Tukey's test ($p < 0.01$), but not between the other variants ($p > 0.05$).

For target motif 2 (ATG), 95 M₂ plants derived from the primary mutants GPTM2_P9, _P11, _P22, _P30 and _P50 were analyzed. Two plants, GPTM2_P11_6 and GPTM2_P22_4, were PCR-negative for *cas9*, resistant to viral infection and had a homozygous 1-bp insertion or 21-bp deletion, respectively. Among the progeny of the primary mutant GPTM2_P11, two plants were identified that carried a homozygous 3-bp insertion. The insertion of 3 bp after base pair position four of the *PDIL5-1* coding sequence led to the conversion of the second amino acid (aspartate to alanine) and the addition of one amino acid (tyrosine), whereas the rest of the protein sequence remained unaltered (see Supplementary Material 10.2.1). These plants were susceptible to BaMMV infection, while their siblings with other heterozygous/chimeric mutations or homozygous 1-bp insertions were resistant to the infection. Among the progeny of the primary mutant GPTM2_P30, two plants with biallelic mutations were identified, with one allele carrying a 1-bp deletion and the other allele carrying the same 58-bp deletion that was already found at the same target site in the 'Igri' background. Both plants were resistant to BaMMV infection. Among the seven sequenced progenies of the primary mutant GPTM2_P50, none carried any mutation, although five of them were found to be ELISA-negative for BaMMV particles, which was most likely due to incomplete mechanical inoculation.

For target motif 4 (exon 3), four M₂ families derived from primary mutants GPTM4_P5, _P11, _P14 and _P21 with 67 plants in total were analyzed. Among twelve M₂ progeny of the primary mutant GPTM4_P5, six individuals exhibited a heterozygous/chimeric mutation state. One plant carried a 2-bp homozygous deletion at the target motif, while another five siblings were homozygous for a substitution of two base pairs, by which the triplet ATC at positions 235-237 of the *PDIL5-1* coding sequence was converted into TAC (see Figure 4-4A and Supplementary Material 10.2.1). This polymorphism led to an amino acid change from a nonpolar, hydrophobic isoleucine to a polar, aromatic tyrosine within the thioredoxin-like domain at position 79 of the PDIL5-1 protein and is referred to as the I79Y mutant in the following (see Figure 4-4B). The three-dimensional structures of the wild-type HvPDIL5-1 protein and the I79Y variant were modeled using SWISS-MODEL on the ExPasy platform (Waterhouse et al., 2018). The protein structure (see Figure 4-4C) did not seem to be impaired by this specific amino acid exchange, but nonetheless, all I79Y mutants showed resistance to BaMMV infection.

The thousand-grain weight and number of grains per plant were again measured and analyzed group-wise per target motif and mutation state (see Figure 4-3C and 4-3D). In the 'Golden Promise' background, ANOVA revealed significant differences in the thousand-grain weight and grain number per plant ($p < 0.05$). Multiple comparison via the post hoc Tukey's test revealed statistically significant differences between nonmutated segregants and homozygous mutants of

4. Targeted Mutagenesis of *PDIL5-1*

target motif 2, with the mutants having a higher thousand-grain weight ($p>0.05$) and more grains ($p>0.01$). In contrast, no statistically significant differences were found in comparisons between any other groups.

In summary, targeted mutations were induced in three of four target motifs. InDels carrying a loss of the translational reading frame as well as in-frame mutants with base substitutions were identified as rendering winter barley cv. 'Igri' and spring barley cv. 'Golden Promise' resistant to bymovirus infection. T-DNA-free, homozygous mutants with the resistant phenotype were obtained in the M_2 generation.

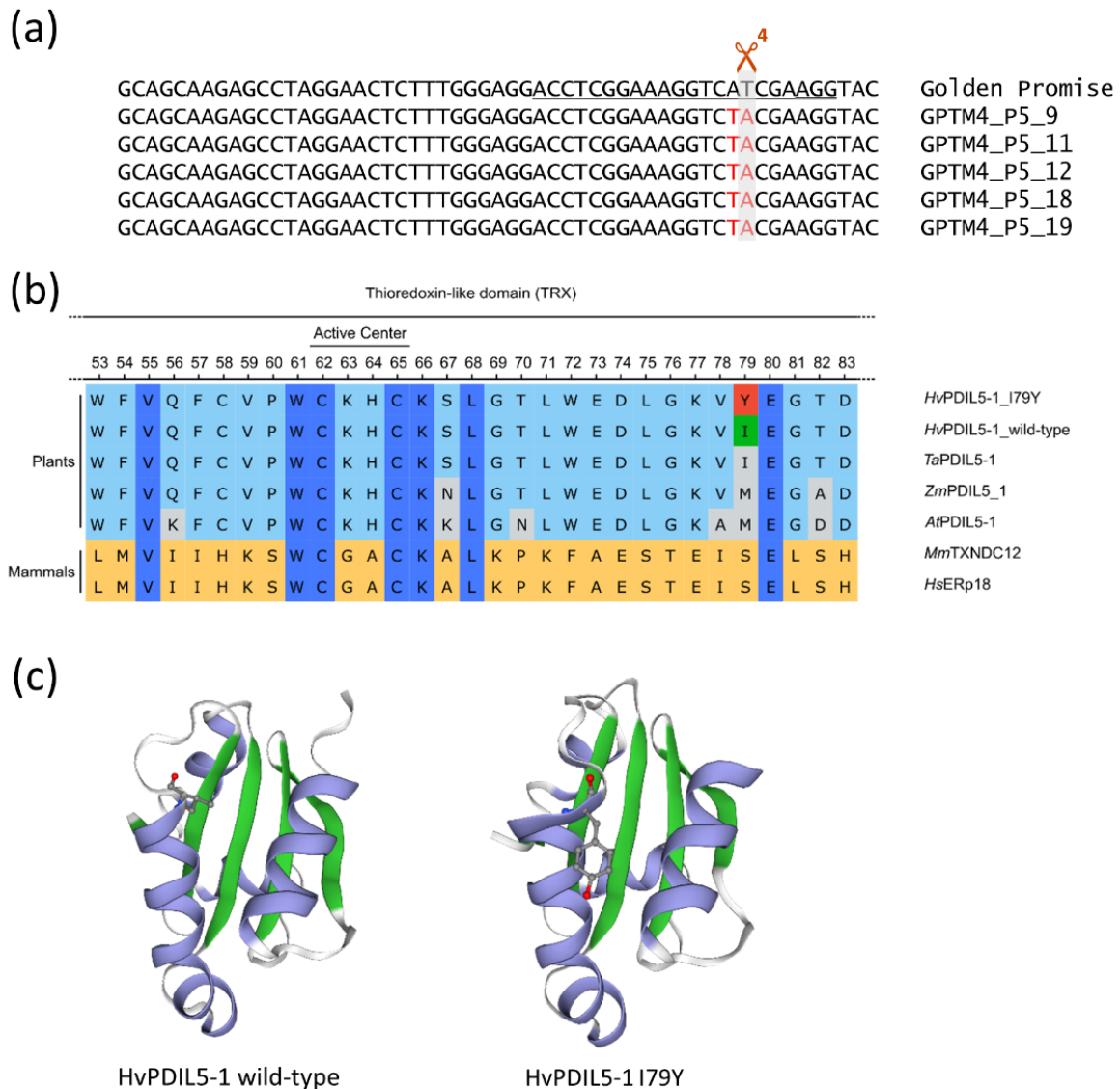


Figure 4-4: (a) Alignment of sequences from five homozygous M_2 progeny plants of the primary mutant GPTM4_P5 (target motif 4), all carrying the same 2-base-pair substitution causing an amino acid change from isoleucine to tyrosine at position 79 in the resultant protein sequence. The Cas9 cleavage site is indicated by scissors and the substitution in red. (b) Alignment of the thioredoxin-like domain (TRX) protein sequence of *HvPDIL5-1* with paralogs from selected plant and mammalian species. Conserved amino acids across all species are shown in dark blue, conserved sequence across plant species in light blue, the isoleucine at position 79 in green, and the tyrosine at position 79 of the mutant plants in red. Amino acid positions given for *HvPDIL5-1*. *Hv*: *Hordeum vulgare*, *Ta*: *Triticum aestivum*, *Zm*: *Zea mays*, *At*: *Arabidopsis thaliana*, *Mm*: *Mus musculus*, *Hs*: *Homo sapiens*. (c) Three-dimensional models based on the SWISS-MODEL of the protein structures of *HvPDIL5-1* wild-type protein and the I79Y variant. Structures of isoleucine (wild-type) and tyrosine (I79Y) at position 79 in the protein sequence are highlighted.

4.4. Discussion

4.4.1. *Cas9 Endonuclease efficiently induces Mutations in PDIL5-1*

Upon Cas9-induced mutagenesis of the *PDIL5-1* gene of barley, homozygous virus-resistant plants were generated in the M₂ generation. The proportion of mutants among primary transgenic plants was 0-57%, which is on par with previously published results in targeted mutagenesis with Cas9 in barley (see Koeppel et al. (2019), Table 2-1). The comparatively high proportion of homozygous mutants in M₁ using the cultivar 'Igri' indicated that Cas9 and gRNA could induce mutations prior to spontaneous genome duplication, which is a frequent occurrence during (haploid) microspore-derived plant regeneration (see also Hoffie et al. (2021)/ Chapter 3.3). However, for the same reason, T-DNA-free individuals occurred rather rarely among Cas endonuclease-induced mutants with an 'Igri' background.

In 'Golden Promise', all primary mutants carried heterozygous or chimeric mutations. Due to independent segregation of integrated T-DNAs and induced mutations, transgene-free (*cas9* PCR-negative), homozygous mutants occur in the M₂ generation as expected.

4.4.2. *Microhomologies present in the Target Region contribute to the Diversity of Mutation Patterns*

At three of four targeted positions within the *HvPDIL5-1* sequence, mutations were obtained. Small deletions of 1 or 2 base pairs were mostly observed, corresponding to the typical pattern resulting from the nonhomologous end joining (NHEJ) DNA repair pathway. In contrast, larger deletions of up to 58 base pairs were more likely to be triggered by microhomologies within the target region (see Figure 4-2A and Figure 4-3A). The principle of microhomology-mediated end joining (MMEJ) is dependent upon sequence repeats of at least 2 bp present on either side of the DNA double-strand break. This condition provides the option that the two 5'-ends of the DNA single strands anneal with one another owing to their complementarity along those repeats (Seol et al., 2018). The MMEJ process entails the deletion of the nucleotides residing between the repeats (if there are any) along with one of the repeats. MMEJ is one of the predominant DNA repair pathways in targeted mutagenesis and has been frequently observed for Cas9-mediated mutagenesis in plants (reviewed in van Vu et al. (2021)). Here, it is demonstrated that MMEJ also works very efficiently in barley and thus may be used for the selection of target motifs, by which the predictability of resultant mutations can be increased.

4.4.3. *Site-specific induced Mutations conferring Resistance to BaMMV Infection are similar to Haplotypes present among Barley Genetic Resources*

The progenies of primary mutants were genotyped with regard to mutation patterns and the presence of T-DNA and were phenotyped for BaMMV resistance. For target motifs 1, 2 and 4, mutants resistant to BaMMV inoculation were identified.

At target motif 1, which resides in the 5'-UTR, predominantly small deletions resulted in resistant mutants, while in the progeny of GPTM1_P1, a larger in-frame deletion of 21 bp retained susceptibility in 'Golden Promise'. In the same progeny, a plant with an 18-bp deletion in the 5'-UTR was found to be ELISA-negative for BaMMV particles. Since the latter was just a single case, it was difficult to judge whether the result was due to incomplete inoculation or because of a particular disturbance of *PDIL5-1* translation. Reduction of target gene expression by mutations in UTRs has been described, for instance by Assou et al. (2021), where the reduction of a seed storage protein was observed in plants carrying mutations in the 5'- and 3'-UTRs, while frameshift mutations in the coding region led to a complete absence of the encoded protein. The UTRs of genes have many complex functions in mRNA transport, splicing and translation, which are mostly ensured by the appropriate binding sites for several proteins and complexes. In the case of the 5'-UTR, especially the binding of the eukaryotic translation initiation factors and the small subunit

4. Targeted Mutagenesis of *PDIL5-1*

of the ribosome, initiating the translation of the mRNA into the protein sequence is of particular importance (Leppek et al., 2018; Roos and Boer, 2021). Detection of the start codon AUG is crucial in this process, for which mutations in the 5'-UTR may be deleterious.

Deletions and insertions at target motifs 2 (at the translation start) and 4 (within exon 3) led to frame shifts of the translational reading frame, causing a nonsense protein sequence and stop codons that prevented the formation of functional *PDIL5-1* protein. The mutations that lead to the loss of ATG are similar to the haplotype XXVIII (*rym11-a*, Yang et al. (2017)), featuring a large deletion of 1,375 bp, including ATG and the first exon, and thereby preventing the translation of a functional transcript (see Table 4-1). Small InDels in exon 3 resulting in shifts of the reading frame are similar to haplotype II, which was described as a 17-bp deletion in exon 3 and was found to be the most abundant BaMMV-resistant haplotype. Barley landraces with the aforementioned haplotypes of the *PDIL5-1* gene showed complete resistance to all known strains of BaYMV and BaMMV (Yang et al., 2017), suggesting a corresponding effect for the Cas9-induced alleles that were generated in the present study. Resistance of these novel mutants to the isolate BaMMV-ASL was already demonstrated under climate chamber conditions within the scope of our study. A similar experiment involving mechanical inoculation of mutant plants with BaYMV did not succeed, i.e. not even in the susceptible wild-type control plants were virus particles detected. While mechanical inoculation with BaMMV has been reported in 2007 and used to study new BaMMV pathotypes and resistant barley genotypes since then, mechanical inoculation of barley with a *GFP*-carrying BaYMV strain was published only recently (Tanokami et al., 2021). However, the infection rates reported were rather low, being 21% to 60% in a susceptible genotype. Of note, also resistant genotypes proved infected by this method with up to 27% efficiency. Taken together, there is no published example yet of an assay based on leaf inoculation providing conclusive data on the resistance of barley to BaYMV. Consequently, growth on *Polymyxa graminis*-infected soil remains the only viable opportunity left to validate the resistance of the *pdil5-1* knockout mutants to BaYMV.

Table 4-1: Comparison of resistant barley haplotypes of *HvPDIL5-1* according to Yang et al. (2017) and induced mutations leading to resistance in the present investigation.

Genomic Location	Barley Germplasm		Induced Mutations	
	Haplotype	Sequence Variation	Target	Type of Mutation
5'-UTR	-	-	1	Frame-shift InDels around pos. -64 bp genomic
5'-UTR/Exon 1	XVIII	1,375-bp deletion pos. -567 to 789 bp genomic	2	58-bp deletion pos. -54 to 4 bp genomic 22-bp deletion pos. -3 to 19 bp genomic
Exon 1	-	-	2	Frame-shift InDels around pos. 4 bp cds
Exon 3	II	17-bp deletion 315-331 bp cds	4	Frame-shift InDels around pos. 236 bp cds
Exon 3	XVII	Base substitution A239G cds, resulting in amino acid substitution E80G	4	Base substitutions A235T + T236A cds, resulting in amino acid substitution I79Y

No effect on susceptibility was found in the case of an in-frame mutation at target motif 2 involving a 3-bp (CGT) insertion after position 4 of the coding sequence, which is associated with the addition of a further amino acid after the initial methionine and substitution of the second amino acid. The small modification at the N-terminus of the protein is unlikely to alter its structure or function.

At target motif 4 in exon 3, in addition to small insertions and deletions, a substitution of two base pairs was induced in the heterozygous state in the primary mutant GPTM4_P5 (see Figure 4-1D). Among its progeny, five homozygous mutants were identified for that substitution (see Figure 4-4A) that led to a change of the amino acid isoleucine to tyrosine at position 79 in the *PDIL5-1* protein (see Figure 4-4B). At position 80, an amino acid exchange of glutamic acid to glycine has been described for the resistant haplotype hap-XVIII in a highly conserved position of the thioredoxin domain of *PDIL5-1* (Yang et al., 2014; Yang et al., 2017). Comparisons with homologous proteins from wheat (*TaPDIL5-1*), maize (*ZmPDIL5-1*), Arabidopsis (*AtPDIL5-1*), mouse (*MmTXNDC12*), and human (*HsERp18*, see Fig. 4B) suggest that the amino acid at position 79 is more variable than the one at position 80. The substitution of isoleucine, e.g., methionine or serine, is often well tolerated, whereas tyrosine, the only aromatic amino acid in the comparison of amino acid sequences shown in Figure 4-4B, is more likely to alter protein function (Barnes and Gray, 2005). Taken together, the tyrosine-for-isoleucine substitution at position 79 has a comparable effect to the nonsynonymous mutation in hap-XVIII that may reduce the functionality of the protein. It is worth mentioning in this context that hap-XVIII is the only resistance-mediating haplotype identified in wild barley (*Hordeum spontaneum*), whereas all others originate from domesticated barley accessions (Yang et al., 2017), suggesting a certain advantage of residual *PDIL5-1* function over complete knockout under more challenging environmental conditions.

4.4.4. Loss of *HvPDIL5-1* Function has no apparent adverse Effects on Plants

In the present investigation, no negative effect on yield-relevant traits was observed under climate chamber and greenhouse conditions, either in the *PDIL5-1_I79Y* mutants or in the *pdil5-1* knockout lines (see Figure 4-2C, 4-2D, 4-3C and 4-3D). All the studied mutants showed normal development and exhibited no significant decrease in thousand-grain weight or grain number per plant. Surprisingly, there was a significant difference between nonmutated segregants in the 'Golden Promise' background and homozygous mutants for target motif 2, with the mutants having a higher yield than the nonmutated plants. However, this effect was not consistent with the 'Igri' background, where the comparison of mutants for the very same target motif vs. wild-type did not reveal such a difference. Together with the numerous described loss-of-function alleles in landraces, it can be assumed that the full knockout of *PDIL5-1* had no substantial negative effects on the plants. However, further studies, especially in the field and/or under a variety of stress conditions, are necessary to confirm this observation. For this purpose, the perfectly isogenic lines produced in the present study constitute excellent material, whereas linkage drag poses a standard problem in material generated via back-crossing. At present, how the knockout of a highly conserved protein such as *PDIL5-1* incurs no penalty remains an unanswered question. The most likely scenario is that at least one other protein disulfide isomerase (PDI) of barley is capable of compensating for the function of *PDIL5-1*. Specific data are lacking for barley, whereas 22 PDIs have been identified in maize and nine in wheat (d'Aloisio et al., 2010; Houston et al., 2005). No interaction of PDIs and plant viruses has yet been described in any other plant species, rendering the utilization of *PDIL5-1* alleles particularly interesting for the breeding of barley and perhaps other cereal crop plants. Intriguingly, in humans, PDIs have been demonstrated to facilitate the uptake of HIV into host cells by decomposing disulfide bridges in the envelope

protein of this virus (Barbouche et al., 2003). In addition, PDIs have been described as potential targets for influenza and other RNA viruses (Kim and Chang, 2018; Mahmood et al., 2021). Since the mechanism of *PDIL5-1*-based resistance in barley remains elusive, conclusions about the potential stability of resistance are vague. To break *EIF4E*-mediated resistance, the viruses adapted the protein structure of their genome-linked viral protein (VPg) cap so that it was recognized again by the modified eIF4E protein, thereby initiating translation of the viral RNA (Li et al., 2016). However, the loss-of-function of *PDIL5-1* makes such comparatively simple viral adaptation unlikely. Pyramiding different resistance-mediating alleles from different genes allows for the combination of diverse resistance mechanisms, thus slowing down the ability of pathogens to overcome resistance. Against BaYMV and BaMMV, marker-assisted selection coupled with doubled haploid production after crossing was used to stack the three resistance loci *rym4/rym5*, *rym9* and *rym11* (Werner et al., 2005). Despite being a valid approach for classical breeding, such crosses come with off-trades, such as linkage drag and exponential growth of the population size associated with every additional locus to be introgressed. As a more viable and rapid alternative, state-of-the-art genome engineering approaches offer the possibility of generating resistance alleles of a variety of genes in one and the same elite background.

In summary, bymovirus resistance-conferring alleles of *PDIL5-1* were identified in the barley gene pool, as represented by ancient landraces and wild relatives of cultivated barley. The present study provides a proof-of-concept for how those alleles can be generated in barley cultivars by site-directed mutagenesis, circumventing tedious crossings and series of backcrossings, as well as any linkage-drag, and making the available genetic diversity more accessible to enhance future breeding efforts.

4.5. Conflict of Interests

The authors declare no conflicts of interest.

4.6. Author Contributions

D.P., J.K., F.O. conceived the project and acquired the funding. J.K., R.E.H., D.P. developed the experimental setup. R.E.H., D.P., and A.H. performed the experiments and analyzed the data. R.E.H. drafted the manuscript, and all authors edited and approved the manuscript.

4.7. Funding

The research was funded in the frame of the IdeMoDeResBar project (FKZ 031B0199 (phase 1) and 031B0887 (phase 2)) by the German Federal Ministry of Education and Science (BMBF).

4.8. Acknowledgments

The authors thank Carola Bollmann, Ingrid Otto, Sabine Sommerfeld, Sibylle Freist (IPK), Ingrid Dubsky, Dörte Grau and Katy Niedung (JKI) for excellent technical assistance.

4.9. Supplementary Material Chapter 4

The supplementary material for this chapter is given under 10.2:

10.2.1 S1: Sequences, Off-Target Analysis, mutated Alleles

10.2.2 Table S1: Oligonucleotide Sequences

10.2.3 Table S2: Plant Data and Statistics

4.10. References Chapter 4

- Assou, J., Zhang, D., Roth, K. D. R., Steinke, S., Hust, M., Reinard, T., Winkelmann, T. and Boch, J. (2021) Removing the major allergen Bra j I from brown mustard (*Brassica juncea*) by CRISPR/Cas9. *The Plant journal for cell and molecular biology*.
- Barbouche, R., Miquelis, R., Jones, I. M. and Fenouillet, E. (2003) Protein-disulfide isomerase-mediated reduction of two disulfide bonds of HIV envelope glycoprotein 120 occurs post-CXCR4 binding and is required for fusion. *The Journal of biological chemistry* 278, 3131–3136.
- Barnes, M.R. and Gray, I.C. (2005). *Bioinformatics for geneticists, Repr. Hierarchical Exotoxicology Mini Series*. Chichester: John Wiley.
- Bundessortenamt (2021). *Descriptive variety list [German: Beschreibende Sortenliste]: Getreide, Mais, Öl- und Faserpflanzen, Leguminosen, Rüben, Zwischenfrüchte*. Hannover.
- d'Aloisio, E., Anna R Paolacci, Arun P Dhanapal and Oronzo A Tanzarella, Enrico Porceddu and Mario Ciaffi (2010) The Protein Disulfide Isomerase gene family in bread wheat (*T. aestivum* L.).
- Gerasimova, S. V., Hertig, C., Korotkova, A. M., Kolosovskaya, E. V., Otto, I., Hiekel, S., Kochetov, A. V., Khlestkina, E. K. and Kumlehn, J. (2020) Conversion of hulled into naked barley by Cas endonuclease-mediated knockout of the NUD gene. *BMC plant biology* 20, 255.
- Gerasimova, S. V., Korotkova, A. M., Hertig, C., Hiekel, S., Hoffie, R., Budhagatapalli, N., Otto, I., Hensel, G., Shumny, V. K., Kochetov, A. V., Kumlehn, J. and Khlestkina, E. K. (2018) Targeted genome modification in protoplasts of a highly regenerable Siberian barley cultivar using RNA-guided Cas9 endonuclease. *Vestn. VOGiS* 22, 1033–1039.
- Gruber, A. R., Lorenz, R., Bernhart, S. H., Neuböck, R. and Hofacker, I. L. (2008) The Vienna RNA websuite. *Nucleic acids research* 36, W70-4.
- Habekuss, A., Kühne, T., Krämer, I., Rabenstein, F., Ehrig, F., Ruge-Wehling, B., Huth, W. and Ordon, F. (2007) Identification of Barley mild mosaic virus Isolates in Germany Breaking rym5 Resistance. *J Phytopathol* 156, 36-41.
- Hensel, G., Kastner, C., Oleszczuk, S., Riechen, J. and Kumlehn, J. (2009) Agrobacterium-mediated gene transfer to cereal crop plants: current protocols for barley, wheat, triticale, and maize. *International journal of plant genomics* 2009, 835608.
- Hisano, H., Abe, F., Hoffie, R. E. and Kumlehn, J. (2021) Targeted genome modifications in cereal crops. *Breeding science* 71, 405–416.
- Hisano, H., Hoffie, R. E., Abe, F., Munemori, H., Matsuura, T., Endo, M., Mikami, M., Nakamura, S., Kumlehn, J. and Sato, K. (2022) Regulation of germination by targeted mutagenesis of grain dormancy genes in barley. *Plant biotechnology journal* 20, 37–46.
- Hoffie, R. E., Otto, I., Perovic, D., Budhagatapalli, N., Habekuß, A., Ordon, F. and Kumlehn, J. (2021) Targeted Knockout of Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E Confers Bymovirus Resistance in Winter Barley. *Front. Genome Ed.* 3.

- Houston, N. L., Fan, C., Xiang, J. Q.-Y., Schulze, J.-M., Jung, R. and Boston, R. S. (2005) Phylogenetic analyses identify 10 classes of the protein disulfide isomerase family in plants, including single-domain protein disulfide isomerase-related proteins. *Plant physiology* 137, 762–778.
- Jayakodi, M., Padmarasu, S., Haberer, G., Bonthala, V. S., Gundlach, H., Monat, C., Lux, T., Kamal, N., Lang, D., Himmelbach, A., Ens, J., Zhang, X.-Q., Angessa, T. T., Zhou, G., Tan, C., Hill, C., Wang, P., Schreiber, M., Boston, L. B., Plott, C., Jenkins, J., Guo, Y., Fiebig, A., Budak, H., Xu, D., Zhang, J., Wang, C., Grimwood, J., Schmutz, J., Guo, G., Zhang, G., Mochida, K., Hirayama, T., Sato, K., Chalmers, K. J., Langridge, P., Waugh, R., Pozniak, C. J., Scholz, U., Mayer, K. F. X., Spannagl, M., Li, C., Mascher, M. and Stein, N. (2020) The barley pan-genome reveals the hidden legacy of mutation breeding. *Nature* 588, 284–289.
- Jiang, C., Kan, J., Ordon, F., Perovic, D. and Yang, P. (2020) Bymovirus-induced yellow mosaic diseases in barley and wheat: viruses, genetic resistances and functional aspects. *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik*.
- Kanyuka, K., McGrann, G., Alhudaib, K., Hariri, D. and Adams, M. J. (2004) Biological and sequence analysis of a novel European isolate of Barley mild mosaic virus that overcomes the barley *rym5* resistance gene. *Archives of virology* 149, 1469–1480.
- Kim, Y. and Chang, K.-O. (2018) Protein disulfide isomerases as potential therapeutic targets for influenza A and B viruses. *Virus research* 247, 26–33.
- Koeppel, I., Hertig, C., Hoffie, R. and Kumlehn, J. (2019) Cas Endonuclease Technology-A Quantum Leap in the Advancement of Barley and Wheat Genetic Engineering. *International journal of molecular sciences* 20.
- Kühne, T. (2009) Soil-borne viruses affecting cereals: known for long but still a threat. *Virus research* 141, 174–183.
- Kumlehn, J., Serazetdinova, L., Hensel, G., Becker, D. and Loerz, H. (2006) Genetic transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.) via infection of androgenetic pollen cultures with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant biotechnology journal* 4, 251–261.
- Leppek, K., Das, R. and Barna, M. (2018) Functional 5' UTR mRNA structures in eukaryotic translation regulation and how to find them. *Nature reviews. Molecular cell biology* 19, 158–174.
- Li, H., Kondo, H., Kühne, T. and Shirako, Y. (2016) Barley Yellow Mosaic Virus VPg Is the Determinant Protein for Breaking eIF4E-Mediated Recessive Resistance in Barley Plants. *Frontiers in plant science* 7, 1449.
- Li, M., Hensel, G., Mascher, M., Melzer, M., Budhagatapalli, N., Rutten, T., Himmelbach, A., Beier, S., Korzun, V., Kumlehn, J., Börner, T. and Stein, N. (2019) Leaf Variegation and Impaired Chloroplast Development Caused by a Truncated CCT Domain Gene in albobistrians Barley. *The Plant cell* 31, 1430–1445.
- Mahmood, F., Xu, R., Awan, M. U. N., Song, Y., Han, Q., Xia, X. and Zhang, J. (2021) PDIA3: Structure, functions and its potential role in viral infections. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 143, 112110.

- Nissan-Azzouz, F., Graner, A., Friedt, W. and Ordon, F. (2005) Fine-mapping of the BaMMV, BaYMV-1 and BaYMV-2 resistance of barley (*Hordeum vulgare*) accession PI1963. TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik 110, 212–218.
- Pallotta, M. A., Graham, R. D., Langridge, P., Sparrow, D. H. B. and Barker, S. J. (2000) RFLP mapping of manganese efficiency in barley. TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik 101, 1100–1108.
- Priyam, A., Woodcroft, B. J., Rai, V., Moghul, I., Munagala, A., Ter, F., Chowdhary, H., Pieniak, I., Maynard, L. J., Gibbins, M. A., Moon, H., Davis-Richardson, A., Uludag, M., Watson-Haigh, N. S., Challis, R., Nakamura, H., Favreau, E., Gómez, E. A., Pluskal, T., Leonard, G., Rumpf, W. and Wurm, Y. (2019) Sequenceserver: A Modern Graphical User Interface for Custom BLAST Databases. Molecular Biology and Evolution 36, 2922–2924.
- R Core Team (2019). R: A Language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.
- Roos, D. and Boer, M. de (2021) Mutations in cis that affect mRNA synthesis, processing and translation. Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease 1867, 166166.
- Sanfaçon, H. (2015) Plant Translation Factors and Virus Resistance. Viruses 7, 3392–3419.
- Sedláček, T. and Mařík, P. (2010) Haplotype analysis of the SSRs surrounding rym 11 locus in a set of winter barley. Journal of Agrobiology 27, 67–72.
- Seol, J.-H., Shim, E. Y. and Lee, S. E. (2018) Microhomology-mediated end joining: Good, bad and ugly. Mutation research 809, 81–87.
- Steckenborn, S., Cuacos, M., Ayoub, M. A., Feng, C., Schubert, V., Hoffie, I., Hensel, G., Kumlehn, J. and Heckmann, S. (2022) The meiotic topoisomerase VI B subunit (MTOPVIB) is essential for meiotic DNA double-strand break formation in barley (*Hordeum vulgare* L.). Plant reproduction.
- Stein, N., Perovic, D., Kumlehn, J., Pellio, B., Stracke, S., Streng, S., Ordon, F. and Graner, A. (2005) The eukaryotic translation initiation factor 4E confers multiallelic recessive Bymovirus resistance in *Hordeum vulgare* (L.). The Plant journal for cell and molecular biology 42, 912–922.
- Tanokami, M., Wang, W. Q., Yamamoto, M., Hagiwara, T., Yumoto, M., Tomiyama, A., Mine, S., Tamura, Y., Kobayashi, S., Nakazawa, Y., Kato, T., Natsuaki, T. and Nishigawa, H. (2021) Utility of a GFP-expressing Barley yellow mosaic virus for analyzing disease resistance genes. Breeding science 71, 484–490.
- van Vu, T., Thi Hai Doan, D., Kim, J., Sung, Y. W., Thi Tran, M., Song, Y. J., Das, S. and Kim, J.-Y. (2021) CRISPR/Cas-based precision genome editing via microhomology-mediated end joining. Plant biotechnology journal 19, 230–239.
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F. T., Beer, T. A. P. de, Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R. and Schwede, T. (2018) SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. Nucleic acids research 46, W296–W303.

Werner, K., Friedt, W. and Ordon, F. (2005) Strategies for Pyramiding Resistance Genes Against the Barley Yellow Mosaic Virus Complex (BaMMV, BaYMV, BaYMV-2). *Mol Breeding* 16, 45–55.

Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant graphics for data analysis*, Second edition. Use R! Cham: Springer international publishing.

Yang, P., Habekuß, A., Hofinger, B. J., Kanyuka, K., Kilian, B., Graner, A., Ordon, F. and Stein, N. (2017) Sequence diversification in recessive alleles of two host factor genes suggests adaptive selection for bymovirus resistance in cultivated barley from East Asia. *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik* 130, 331–344.

Yang, P., Lüpken, T., Habekuss, A., Hensel, G., Steuernagel, B., Kilian, B., Ariyadasa, R., Himmelbach, A., Kumlehn, J., Scholz, U., Ordon, F. and Stein, N. (2014) PROTEIN DISULFIDE ISOMERASE LIKE 5-1 is a susceptibility factor to plant viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, 2104–2109.

© 2022 The Authors. *Plant Biotechnology Journal* published by Society for Experimental Biology and The Association of Applied Biologists and John Wiley & Sons Ltd.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND 4.0) License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

5. Base Editing of Bymovirus Susceptibility factor *EIF4E* in Winter Barley

Robert Eric HOFFIE, Iris Hoffie, Ingrid Otto, Carola Bollmann, Jochen Kumlehn

Plant Reproductive Biology, Leibniz-Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK), Corrensstrasse 3, 06466 Seeland, OT Gatersleben, Germany

Draft of an Original Research Article, July 2022

Keywords: Base Substitution, Cas9, CRISPR, Potyvirus, precise genome editing, single nucleotide polymorphism

Abstract

The barley mosaic virus disease is one of the most important diseases in barley cultivation in Europe and Asia. Transmitted by the soil-borne plasmodiophorid *Polymyxa graminis*, there are no direct control options against the causal bymoviruses *Barley Yellow Mosaic Virus* (BaYMV) and *Barley Mild Mosaic Virus* (BaMMV). Resistance breeding is thus the only viable approach and has been very successful in the past, with the resistance-conferring alleles *rym4* and *rym5* of the *EUKARYOTIC TRANSLATION INITIATION FACTOR 4E* being used extensively in European barley breeding. However, the first virus strains have meanwhile overcome this resistance and there is an urgent need for new sources of resistance. Genome editing with Cas endonucleases is a timely and promising approach for this. However, the insertions and deletions that frequently arise during site-directed mutagenesis usually lead to the knockout of the target genes. Since, in the case of *HvEIF4E*, this is accompanied by a significant yield reduction, more precise genetic modifications are necessary for breeding. The present study represents the first application of base editing in barley, using the *EIF4E* gene as an example. Base exchanges were made at two positions in this gene using nCas9-cytidine deaminase fusion, resulting in a total of 10 new alleles of *HvEIF4E*. Progeny of the present primary mutants represent promising material for inoculations with BaMMV to test the resistance-conferring properties of the new alleles.

5.1. Introduction

The *EUKARYOTIC TRANSLATION INITIATION FACTOR 4E (EIF4E)* is a well-known susceptibility factor for infection with bymoviruses in a broad variety of plant species. The eIF4E binds in the host cell to the m⁷G-cap of eukaryotic mRNA to initiate the formation of the translation initiation complex, forming the translation loop and let the smaller subunit of the ribosome bind to the mRNA as the starting point of translating the mRNA's information into the amino acid sequence. Bymoviruses belong to the family of *Potyviridae* which are single stranded (ss)+RNA viruses that infect plants through transmission by vectors such as aphids or fungi. Arrived in the host plant's cell, the virus unpacks its RNA genome and mimics the m⁷G cap structure with its viral genome-linked protein (VPg) at the 5' end of its RNA. By that, the viral RNA is recognised and bound by eIF4E as the plant's own mRNA and translation of the viral proteins is initiated. The virus proliferates and spreads throughout the plant.

Barley was one of the first plant species at all and the first monocotyledonous plant where *EIF4E* was described as a bymovirus susceptibility factor and resistance-conferring alleles were described (Kanyuka et al., 2005; Stein et al., 2005). For several plant species, the targeted knockout of *EIF4E* or its isoform *EIF(iso)4E* was reported to generate bymovirus resistant plants (reviewed in Schmitt-Keichinger (2019)). In barley, a screen of several hundred barley lines from genebanks revealed that all naturally occurring resistance alleles carried non-synonymous single nucleotide polymorphisms (SNPs) in their coding regions, leading to an altered amino acid sequence in the binding domain of eIF4E, which disturbs the interaction with the viral VpG RNA cap (Yang et al., 2016). Two of those alleles, namely *rym4* and *rym5*, are widely used in European winter barley breeding and most of the resistant cultivars rely on that resistance mechanism. Due to high selection pressure, first strains of *Barley Mild Mosaic Virus (BaMMV)* and *Barley Yellow Mosaic Virus (BaYMV)*, the economically most important bymoviruses in barley, have overcome the *rym4/rym5* mediated resistance and new sources for resistant cultivars are needed in barley breeding.

By targeted mutagenesis of *HvEIF4E*, Knockout lines were generated in barley and proven resistant to mechanical inoculation with BaMMV. However, these lines were impaired in yield parameters, suggesting that the functions of *EIF4E* for the plant cannot be replaced by its isoform (Hoffie et al., 2021, Chapter 3). These findings suggest that a functional *EIF4E* gene is crucial for proper development and yield of winter barley. However, in regards to resistance-breaking virus strains, new alleles of *EIF4E* are needed. Targeted mutagenesis using Cas endonuclease-induced DNA double strand breaks mainly induces insertions or deletions that lead to reading frame shifts resulting in the loss-of-function of the target gene. To induce new, functional alleles of *HvEIF4E* with single nucleotide polymorphisms (SNPs) instead, more precise mutagenesis approaches appear promising.

Base Editing is an emerging tool based upon CRISPR-associated endonucleases that allow for those more precise gene alterations. In particular, a Cas9-variant with one inactivated nuclease domain (D10A nickase Cas9) is fused to either a cytidine deaminase that induces C-to-T conversions or to an adenine deaminase which causes A-to-G changes.

The combination of a cytidine deaminase with the Cas9 endonuclease was first described by Komor et al. (2016). These authors tested different combinations of cytidine deaminases (human AID, human APOBEC3G, rat APOBEC1 and sea lamprey CDA1) and dCas9 (with deactivated endonuclease domains) as well as nCas9 (a nickase variant of Cas9 with deactivated RuvC nuclease domain by D10A mutation) in human cell lines. Shortly afterwards, Nishida et al. (2016) presented an alternative system used in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). They fused an nCas9 with an activation-induced cytidine deaminase (AID) orthologue, cytidine deaminase 1 (CDA1) from sea lamprey (*Petromyzon marinus*). Cytidine deaminases are involved in the immune system of vertebrates on the one hand in rendering viral DNA harmless by mutation, but on the other hand they also act in hypermutation in B cells in the adaptation and maturation of antibodies

(Knisbacher et al., 2016). CDA1-nCas9 fusions are directed to the genomic target motif by gRNA complementarity, while the helicase activity of nCas9 makes the target site accessible for editing. Notably, CDA1 can only modify single stranded DNA. The cytidines within an area of about 5 bp at the 5' end of the target motif (the editing window) can be subjected to editing.

The processed cytidines are first converted into uridines by deamination, resulting in U:G mismatches between the edited and the complementary strands. The removal of the induced uracil by the uracil DNA glycosylase and the associated base excision repair is prevented by an uracil DNA glycosylase inhibitor (UGI) from *Bacillus subtilis*, that is fused to the CDA1-nCas9 fusion as well. Triggered by the single-strand break of the non-edited strand by nCas9, the mismatch repair is activated, which replaces the guanine with adenine on the complementary strand. During the following DNA replication, uridines are misinterpreted by the DNA polymerase as thymines and T-A base pairs are incorporated into the DNA double strand accordingly. Thus, C-to-T (or G-to-A on the complementary strand) substitutions can ultimately be induced (Nambiar et al., 2022). These Cas9-derivatives, sometimes referred to as cytidine base editors (CBEs), have been successfully used in various di- and monocotyledonous plants, including *Arabidopsis*, canola, tomato, rice and wheat (Chen et al., 2017; Hu et al., 2020; Kashojiya et al., 2022; Li et al., 2017; Zong et al., 2017), comprehensively reviewed in Molla et al. (2021).

Shortly after the emergence of cytidine base editors, adenine base editors (ABEs), i.e. fusions of nCas9 and an adenine deaminase, were also reported. These are capable of inducing A-to-G substitutions, which was first demonstrated using human cells (Gaudelli et al., 2017). Unlike cytidine deaminases, there are no naturally occurring DNA-modifying adenine deaminases. Therefore, Gaudelli et al. (2017) developed the DNA adenine deaminase ecTadA* by targeted evolution from the *E. coli* RNA adenine deaminase (ecTadA), which is active in vivo on tRNAs. Fused to an nCas9, ecTadA-ecTadA* dimers deaminate adenosines to inosines in an editing window of about 4-6 nucleotides around positions 4 to 7 of the target motif. Through complementary base pairing with cytidine, inosine is read and implemented by DNA polymerases as guanine during DNA replication (Nambiar et al., 2022). In plants, adenine deaminases have been used so far in rice, wheat and tobacco (*N. benthamiana*) (Hua et al., 2018; Li et al., 2018; Wang et al., 2021).

Here, we present a base editing approach employing CDA as well as ADA base editors to induce targeted SNPs in the *HvEIF4E* gene thereby generating new resistance-conferring alleles. In contrast to the previously reported knockout alleles, a yield penalty is avoided by retained protein functionality for the host. In total, three and two resistance-associated positions were targeted with CDA and ADA, respectively. Mutations were induced successfully at two different CDA target motifs and the inheritance of base edits to M₂ plants was shown, which provides promising material for virus resistance screenings.

5.2. Material and Methods

5.2.1. Target Selection

To induce amino acid substitutions in the eIF4E binding domain, target motifs within the *HvEIF4E* gene (Gene ID: 100527994) on chromosome 3H were selected manually in four regions where base substitutions had previously been identified in the resistance alleles *rym4*, *rym5* and *rym_{HOR3298}* (Shi et al., 2019). Within these regions, in total five motifs were targeted either with cytidine deaminase (CDA) or adenine deaminase (ADA), see Figure 5-1 and Supplementary Material 10.3.1.

5.2.2. Vector Cloning

Vectors were cloned using the CasCADE vector system (Hoffie et al., in preparation). Available gRNA-modules with the *U3* promoter from *Oryza sativa* were chosen. Target specific sequences of

the gRNA were ordered as DNA oligonucleotides (see Supplementary Material 10.3.2) with specific overhangs for BsaI-based cloning into the gRNA-module vectors. Golden Gate assembly of gRNAs and Cas modules with nCas9-CDA and nCas9-ADA fusions, driven by the *Zea mays Polyubiquitin 1 (ZmUbi1)* promoter, were performed according to the CasCADE protocol (see 10.3.4) to generate the following vectors: pInt EIF4E_CDA1, pInt EIF4E_ADA2, pInt EIF4E_CDA3, pInt EIF4E_CDA4 and pInt EIF4E_ADA5. The gRNA and nCas9-CDA/ -ADA expression units were cloned via SfiI into the binary vector p6i-2x35S-TE9 (Gerasimova et al., 2020) that harbours an *hpt* gene under control of a doubled-enhanced *CaMV35S* promoter in its transfer-DNA for plant selection, resulting in the respective binary vector pBin EIF4E_CDA1, pBin EIF4E_ADA2, pBin EIF4E_CDA3, pBin EIF4E_CDA4 and pBin EIF4E_ADA5.

5.2.3. Pre-Validation of Constructs via Protoplast Transformation

The intermediate vectors were first tested by transient expression in mesophyll protoplasts isolated from leaves of one-week-old, etiolated seedlings of winter barley cv. 'Igri' based on the protocol of Shan et al. (2014). In brief, thirty leaves of barley seedlings were chopped into small fragments using a razor blade, and cell walls were digested with Macerozyme R-10 and cellulase R-10 (DUCHEFA BIOCHEMIE B.V, Haarlem/Netherlands). Protoplasts were purified by sieving, and after PEG-mediated transformation with pInt EIF4E_CDA1 to pInt EIF4E_ADA5, they were incubated for 60 h at 21 °C in the dark. All protoplast transformations were conducted in three replications. To check for transformation efficiency, a *GFP* expression construct was used to transform a control sample of protoplasts. After incubation, the GFP-expressing portion of protoplasts of this control sample was determined using an epifluorescence microscope (AX200M, Zeiss, Oberkochen/Germany), and DNA was extracted from the other protoplast samples transformed using the intermediate *cas9/gRNA* constructs pInt EIF4E_CDA1, pInt EIF4E_ADA2, pInt EIF4E_CDA3, pInt EIF4E_CDA4 and pInt EIF4E_ADA5. Around 150 bp of the target regions were amplified using specific primers (see Supplementary Material 10.3.1), followed by deep-sequencing of amplicons, which was performed by a commercial service provider on an Illumina MiSeq platform. Mutation efficiencies were calculated individually for each replicate as proportion of sequencing reads with mutation in relation to the total number of reads including those with the wild-type sequence.

5.2.4. Agrobacterium-mediated Transformation using Barley Microspore-derived Plant Regeneration

The binary vectors pBin EIF4E_CDA1, pBin EIF4E_ADA2, pBin EIF4E_CDA3, pBin EIF4E_CDA4 and pBin EIF4E_ADA5 were transfected by electroporation into the *Agrobacterium* strain LBA4404 harbouring the hypervirulence-conferring plasmid pSB1 for DNA transfer to barley microspore-derived microcalli (Kumlehn et al., 2006). In brief, pre-mitotic (highly vacuolated) microspores were isolated from winter barley cv. 'Igri'. After microspore cultivation for 1 week in KBP medium (macro and micro nutrients, L-glutamine and maltose) to initiate cell proliferation, resultant multicellular pollen was subjected to DNA transfer by co-cultivation with *Agrobacterium* carrying the binary vectors as mentioned above in CK medium (macro and micro nutrients, maltose, acetosyringone, MES, and phosphate buffer). Upon further cultivation under selective conditions, transgenic plantlets were generated from calli or embryogenic structures transferred onto KBP4PT (macro and micro nutrients, L-glutamine, maltose, hygromycin, Timentin, and Phytigel) followed by K4NBT medium (macro and micro nutrients, with increased dosage of CuSO₄, L-glutamine, maltose, hygromycin, Timentin, and Phytigel) as previously described in detail by Kumlehn et al. (2006).

5.2.5. Genotyping of Primary Transgenic and Mutant Plants

Leaf samples were taken from primary transgenic plants and DNA was extracted and analysed for the presence of the *cas9* transgene by PCR using specific primers (see Supplementary Material 10.3.2). The plants were screened for mutations by PCR amplification of the target regions using specific primers (see Supplementary Material 10.3.2) followed by amplicon deep-sequencing by a commercial provider using the Illumina MiSeq platform. Mutant plants were grown to maturity after self-pollination and grains were harvested. To analyse the M₂ generation, progeny comprising 12 or 24 individuals were sown from selected primary mutants. DNA was extracted from leaf samples at early seedling stage and the inheritance of the transgene was screened by PCR using *cas9*- and *hpt*-specific primers (see Supplementary Material 10.3.2), and the target regions were PCR-amplified and screened by Sanger sequencing for induced base substitutions.

5.3. Results

After the intermediate vectors pInt{EIF4E_CDA1, pInt{EIF4E_ADA2, pInt{EIF4E_CDA3, pInt{EIF4E_CDA4 and pInt{EIF4E_ADA5 were generated with the CasCADE system, they were tested in protoplasts to pre-validate their functionality and mutation efficiency. After transformation and incubation, the DNA was extracted from the protoplasts and the target regions were amplified. Using deep sequencing, the mutation efficiency was calculated based on the mutated sequencing reads in relation to the total number of sequencing reads. A general overview is given in Figure 5-1B. Mutation efficiencies reached up to 11%, with no mutations detected in both ADA-addressed targets. For the CDA1 and CDA4 targets, Figure 5-2A and 5-2B shows the sequence variants obtained from protoplasts. Within both target motifs, several Cs were located in the editing window, which were converted to Ts in different combinations. This resulted in a number of new alleles in the protoplast assay that would also lead to different amino acid changes after translation. All five binary vectors pBin{EIF4E_CDA1, pBin{EIF4E_ADA2, pBin{EIF4E_CDA3, pBin{EIF4E_CDA4 and pBin{EIF4E_ADA5 were used for stable transformation by *Agrobacterium*-mediated DNA transfer in microspore cultures of the cultivar 'Igri'.

Several transformation experiments were carried out in each case, regenerating a total of 23 to 42 plants for each construct (see Figure 5-1B). DNA was extracted from leaf samples and the target region was again sequenced by Next Generation Sequencing. Except for the target motif CDA3, plants were identified for all target motifs that had a higher proportion of sequencing reads with alterations than the wild-type control (see summary Figure 5-1B). However, the regenerated plants were mostly chimeric, which could be inferred from the large number of different alleles, as exemplified for different target motifs in Figure 5-3. In the target motif CDA1, there are three Cs directly behind each other in the editing window. In plant BPR42/1P3, a total of 61% of the sequencing reads had a base substitution in the target region (for comparison: 'Igri' wild type 1% only). Of these, one mutation accounted for almost 50%, suggesting that it was a heterozygous allele. Here, a C was replaced with a T, which changed the affected coding triplet from CGG (arginine) to TGG (tryptophan). Other alleles occurred with much lower frequency, suggesting that these were chimeric mutations of the second copy of the gene. In total, three different base edits were identified in the plant in addition to the wild-type allele, two of which lead to changes in the resulting amino acid. The change from serine (TCC) to phenylalanine (TTC), as described for the allele *rym4* at this position, is also among the edited sequence variants.

5. Base Editing of *EIF4E*

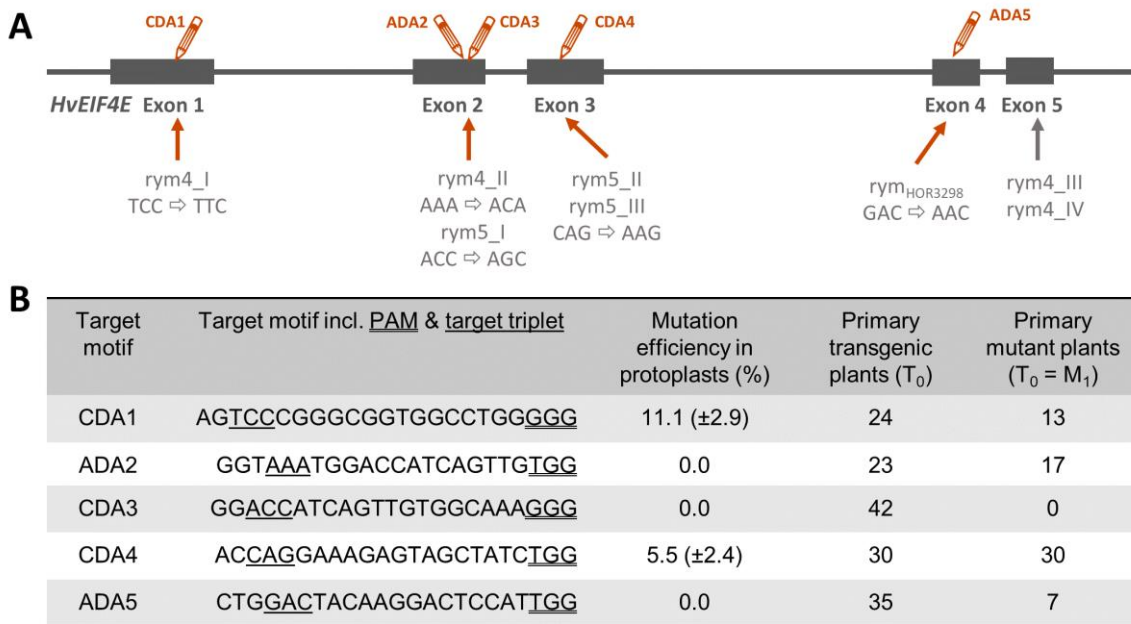


Figure 5-1: Target motifs and mutation efficiency

A: Gene structure of *Hordeum vulgare* *EIF4E* with locations of the chosen target motifs for base editing in regions with nucleotide polymorphisms previously described for the resistance-conferring alleles *rym4*, *rym5* and *rym^{HOR3298}*. Pencils represent base editing targets, CDA: Cytidine deaminase-nCas9 fusion, ADA: Adenine deaminase-nCas9 fusion, grey line represents gene introns, grey boxes represent exons. **B:** Summary of target motif sequences including the respective protospacer adjacent motif (PAM, double-underlined) and the coding triplet addressed by base editing (single-underlined). Mutation efficiency in protoplast assay and primary mutants based on amplicon deep-sequencing. Primary transgenic plants from *Agrobacterium*-mediated DNA transfer to microspore-derived microcalli of winter barley cv. 'Igrí'.

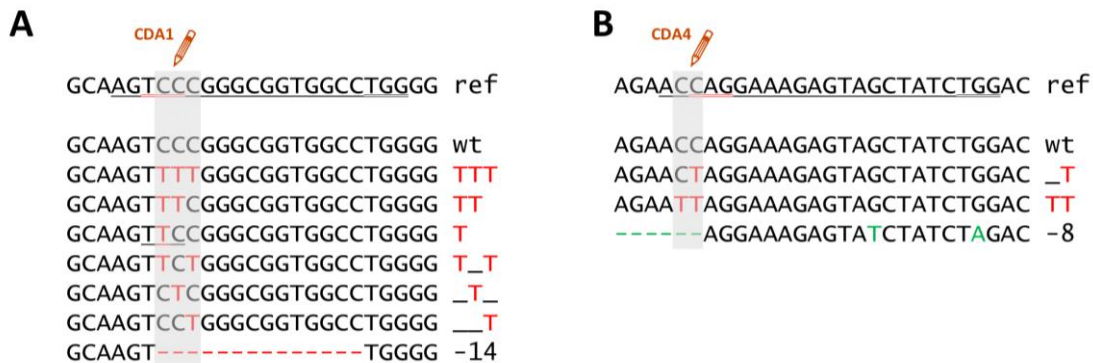


Figure 5-2: Mutation patterns in barley mesophyll protoplasts

Results of amplicon deep-sequencing after PEG-mediated transformation of protoplasts with intermediate vectors carrying CDA-nCas9 fusion and respective gRNA for target motifs CDA1 (**A**) and CDA4 (**B**). Cytidine bases in editing windows are marked by grey box, base edits indicated by red letters, deletions by red dashes, ref: reference sequence with the target motif underlined, the PAM double-underlined and the targeted coding triplet double-underlined in red, wt: wild-type sequence.

A Target Motif CDA1

>BPR42/1 P3 - 61 %
CAAGTCCCGGGCGGTGGCCTGGGGGA ref

CAAGTCCTGGGCGGTGGCCTGGGGGA __T 49
 CAAGTCCCGGGCGGTGGCCTGGGGGA wt 46
 CAAGTCTTGGGCGGTGGCCTGGGGGA _TT 10
 CAAGTTCCGGGCGGTGGCCTGGGGGA T__ 13

>BPR47/1 P3 - 7 %
CAAGTCCCGGGCGGTGGCCTGGGGGA ref

CAAGTCCCGGGCGGTGGCCTGGGGGA wt 324
 CAAGTTTCGGCGGTGGCCTGGGGGA TT_ 7
 CAAGTCTCGGGTGGTGGCCTGGGGGA _T_, T 6
 CAAGTTCCGGGCGGTGGCCTGGGGGA T__ 6
 CAAGTCTCGGCGGTGGCCTGGGGGA _T_ 3

>Igr1 wild-type - 1 %
CAAGTCCCGGGCGGTGGCCTGGGGGA ref

CAAGTCCCGGGCGGTGGCCTGGGGGA wt 7748
 CAAGTCCCTGGGCGGTGGCCTGGGGGA T 30
 CAAGTCCCGGGCGGTGGCCTGGGGGA T 19
 CAAGTCCCGGGCGGTGGCCTGTGGGA T 18
 CAAGTCCTGGGCGGTGGCCTGGGGGA T 10

rym4_I
 TCC ⇒ TTC
 Ser ⇒ Phe

B Target Motif ADA2

>BPR43/2 P9 - 15,6 %
GCGGTAAAATGGACCATCAGTTGTGGC ref

GCGGTAAAATGGACCATCAGTTGTGGC wt 488
 GTCGTAAATGGACCATCAGTTGTGGC TC 161
 GCGGTAAAATGGACCATCGGTTGTGGC G 32
 GCGGTAAGATGGACCATCAGTTGTGGC _G_ 4
 GCGGCAAATGGACCATCAGTTGTGGC C 3

>Igr1 wild-type - 1 %
GCGGTAAAATGGACCATCAGTTGTGGC ref

GCGGTAAAATGGACCATCAGTTGTGGC wt 685
 GTCGTAAATGGACCATCAGTTGTGGC TC 321
 GCGGTAAAATGGACCATCGGTTGTGGC A 101

>BPR43/2 P1 - 0 %
GCGGTAAAATGGACCATCAGTTGTGGC ref

GCGGTAAAATGGACCATCAGTTGTGGC wt 108
 GTCGTAAATGGACCATCAGTTGTGGC TC 24

rym4_II
 AAA ⇒ ACA
 Lys ⇒ Thr

C Target Motif CDA4

>BPR42/3 P1 - 62 %
AGAACCAGGAAAGAGTAGCTATCTGGA ref

AGAACCAGGAAAGAGTAGCTATCTGGA wt 361
 AGAACGAGGAAAGAGTAGCTATCTGGA G 453
 AGAACTAGGAAAGAGTAGCTATCTGGA T 90
 AGAATGAGGAAAGAGTAGCTATCTGGA TG 26
 AGAATTAGGAAAGAGTAGCTATCTGGA TT 12
 -----AGGAAAGAGTAGCTATCTAGA -8 T A 12
 AGAAGAGGAAAGAGTAGCTATCTGGA GG
 GAACGAGGAAAGAGTAGCTATCTGGA G 4

>Igr1 wild-type - 9 %
AGAACCAGGAAAGAGTAGCTATCTGGA ref

AGAACCAGGAAAGAGTAGCTATCTGGA wt 1714
 AGAACTAGGAAAGAGTAGCTATCTGGA T 162
 AGAATTAGGAAAGAGTAGCTATCTGGA TT 58
 -----AGGAAAGAGTAGCTATCTAGA -8 T A 29
 AGAACGAGGAAAGAGTAGCTATCTGGA G 25
 AGGACCAGGAAAGAGTAGCTATCTGGA G 13
 AGAATGAGGAAAGAGTAGCTATCTGGA TG 10

rym5_III
 CAG ⇒ AAG
 Gln ⇒ Lys

Figure 5-3: Mutation patterns in primary mutant barley plants

Results of amplicon deep-sequencing after *Agrobacterium*-mediated DNA transfer to microspore-derived microcalli of winter barley cv. 'Igr1' with binary vectors carrying a CDA-nCas9 or ADA-nCas9 fusion and respective gRNA for target motifs CDA1 (A), ADA2 (B) and CDA4 (C). Cytidine or adenine bases in editing windows are marked by grey box, base edits indicated by red letters, deletions by red dashes, ref: reference sequence with the target motif underlined, the PAM double-underlined and the targeted coding triplet double-underlined in red, wt: wild-type sequence, numbers indicate the number of reads of the respective sequence contig.

In the target region ADA2, a CG-to-TC-substitution occurred with relatively high frequency, which, however, was also detected with the same frequency in the wild-type control and was therefore not included in the calculation of the mutation efficiency. The proportion of A-to-G-substitutions in the target region was rather low (max. 15%), but in contrast to the protoplast test, at least any changes were found here at all (see Figure 5-3B). In plant BPR43/2P9, one allele changed in the target triplet could be found with very low frequency, which was edited from AAA (serine) to AGA (glycine). The substitution described for *rym4* at this position is ACA, which changes the encoded lysine (wild type) to threonine (*rym4*). At the CDA4 target motif, it was particularly striking that both in the wild-type control and in the regenerated plants, a large number of different alleles appeared in the sequencing, which, however, could not be explained by the expected C-to-T-substitutions (see Figure 5-3C). For example, one of them was an 8-bp deletion. It is possible that these are by-products of the PCR from a similar gene. C-to-T-changes, on the other hand, occurred with similar frequency in both the primary mutant and the wild type. The most frequent mutation in plant BPR42/3 P1 was a C-to-G-substitution in the editing window.

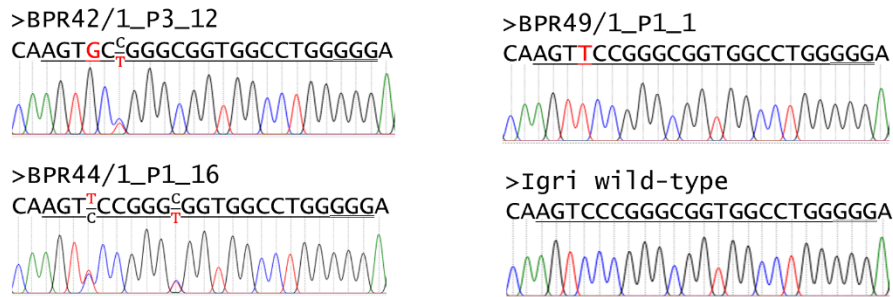
From the primary mutants, those with comparatively high proportions of mutant sequencing reads were selected after maturity and progenies of 12 or 24 plants were grown, i.e. four progenies per target region CDA1, ADA2 and ADA4, and five progenies for target region CDA4 with a total of 84 plants for target region CDA1 and a total of 96 plants each per target region ADA2, CDA4 and ADA4, respectively. After DNA extraction, the target regions were PCR-amplified and analysed for the inheritance of the induced base edits by Sanger sequencing. In parallel, T-DNA-specific PCR was used to follow the segregation of the transgene. The results of all plants are shown in Supplementary Material 10.3.3. No mutations were detected in the progeny at any of the ADA target motifs. In contrast, both heterozygous and homozygous mutants were identified for the CDA1 and CDA4 target motifs. The proportion of mutants ranged from 0 to 100%, depending on the families. In the CDA1 target motif, there are three Cs within the editing window, distributed between the two triplets TCC (serine, pos. 57) and CGG (arginine, pos. 58). In the four families studied, the mutation TCC to TTC occurred most frequently, resulting in an amino acid substitution from serine to phenylalanine, i.e. exactly the change that is also characteristic for *rym4* at this position (see Figure 5-4). Base edits at the second triplet from CGG to TGG replaces arginine with trypsin. In two plants, C-to-T edits outside the expected editing window were also found, resulting in amino acid changes at protein positions 59 and 61. Several plants with a C-to-G-edit (TCC to TGC; Ser to Cys) also occurred in the progenies of BPR42/1_P3 and BPR44/1_P1 (see Figure 5-4A). In total, different combinations of the edited bases and resulting amino acid substitutions generated seven different alleles at the CDA1 target region, shown in Figure 5-4B with their encoded amino acid sequence, respectively. In the majority of the progeny, the respective mutation was already homozygous.

In the CDA4 target motif, there are two Cs within the editing window that belong to two triplets: AAC (asparagine, pos. 160) and CAG (glutamine, pos. 161). Plants with base edits were identified in four of the five progenies examined. Different combinations of C-to-T- and C-to-G-substitutions occurred (see Figure 5-5). Since both triplets were affected, there was also a corresponding variability in amino acid changes. For the first codon, the change AAC to AAT occurred most frequently, whereby it is a "wobble" base, so that this triplet codes unchanged for asparagine. Less frequently, the substitution AAC to AAG occurred, which codes for lysine (Lys). At the second triplet, the substitution CAG to GAG, which codes for glutamate (Glu), and CAG to TAG, which leads to the formation of a stop codon, occurred with similar frequency. The four variants mentioned occurred in different combinations in the analysed progenies, so that here variability results in a total of four new alleles, as shown in Figure 5-5. However, the substitution of glutamine by lysine, which is characteristic for the *rym5* allele at this position, was not among the variants found.

In total, this base editing approach was able to generate in the susceptible winter barley 'Igri' a polymorphism described for the resistance-mediating allele *rym4* as well as 10 further, new

alleles that lead to amino acid changes at relevant positions in the eIF4E protein and thus have the potential for the formation of new resistances. The identified mutants are brought to grain maturity and are then available for resistance tests with BaMMV.

A Target Motif CDA1 – Gene Sequence Variation



B Target Motif CDA1 – Protein Sequence Variation

... 56 57 58 59 60 61 62 63 ...	protein position number
... AAG TCC CGG GCG GTG GCC TGG <u>GGG</u> ...	coding triplets at target motif
... Lys Ser Arg Ala Val Ala Trp Gly ...	wild-type protein sequence
... AAG TTC CGG GCG GTG GCC TGG <u>GGG</u> ...	Base Editing Allele rym4_I
... Lys Phe Arg Ala Val Ala Trp Gly ...	amino acids encoded
... AAG TGC CGG GCG GTG GCC TGG <u>GGG</u> ...	Base Editing Allele 1
... Lys Cys Arg Ala Val Ala Trp Gly ...	amino acids encoded
... AAG TCC TGG GCG GTG GCC TGG <u>GGG</u> ...	Base Editing Allele 2
... Lys Ser Trp Ala Val Ala Trp Gly ...	amino acids encoded
... AAG TGC TGG GCG GTG GCC TGG <u>GGG</u> ...	Base Editing Allele 3
... Lys Cys Trp Ala Val Ala Trp Gly ...	amino acids encoded
... AAG TTC TGG GCG GTG GCC TGG <u>GGG</u> ...	Base Editing Allele 4
... Lys Phe Trp Ala Val Ala Trp Gly ...	amino acids encoded
... AAG TTC CGG GTG GTG GCC TGG <u>GGG</u> ...	Base Editing Allele 5
... Lys Phe Arg Val Val Ala Trp Gly ...	amino acids encoded
... AAG TTC CGG GCG GTG GTC TGG <u>GGG</u> ...	Base Editing Allele 6
... Lys Phe Arg Ala Val Val Trp Gly ...	amino acids encoded

Figure 5-4: Inherited base edits of target motif CDA2 and correspondingly modified amino acid sequences in M₂ plants

Sequences generated by base editing from selected, representative M₂ barley plants compared to wild-type for target motif CDA1 (A) and overview of all new amino acid sequences resulting from base edits (B). Chromatograms from Sanger amplicon sequencing of target region CDA1, double peaks indicate heterozygous base edits (both bases shown as fraction). Sequence of target motif underlined, PAM double-underlined, red letters indicate mutations, amino acid sequence section encoded by the respective target motif with base substitutions and respectively modified amino acids given in red and bold.

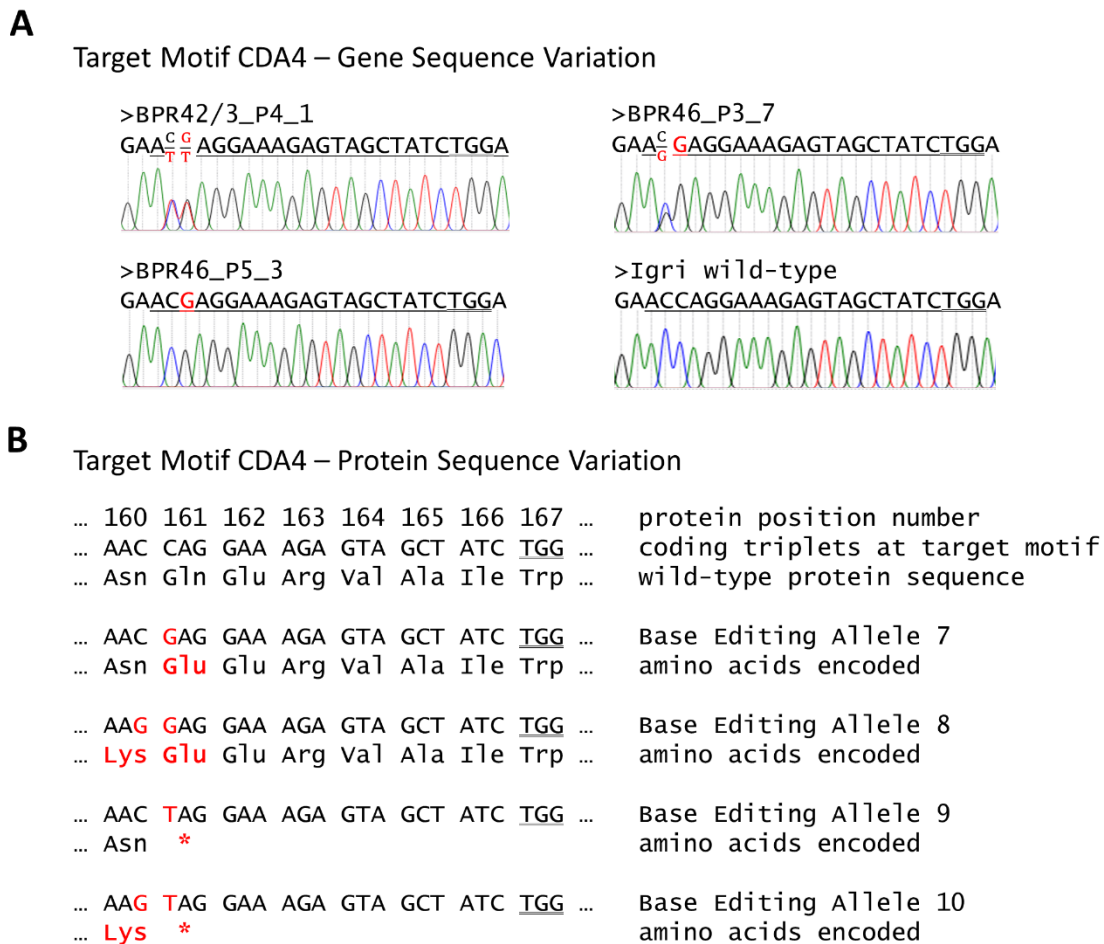


Figure 5-5: Inherited base edits of target motif CDA4 and correspondingly modified amino acid sequences in M₂ plants

Sequences generated by base editing from selected, representative M₂ barley plants compared to wild-type for target motif CDA4 (A) and overview of all new amino acid sequences resulting from base edits (B). Chromatograms from Sanger amplicon sequencing of target region CDA4, double peaks indicate heterozygous base edits (both bases shown as fraction). Sequence of target motif underlined, PAM double-underlined, red letters indicate mutations, amino acid sequence section encoded by the respective target motif with base substitutions and respectively modified amino acids given in red and bold.

5.4. Discussion

Base editing constructs were created for five *rym4*, *rym5* or *rym_{HOR3298}* polymorphic positions in the *HvEIF4E* gene. Base editing was successfully performed in two of these target motifs, thus generating a number of new alleles. Two of the target motifs where no detectable mutations could be induced either in protoplasts or in stably transformed plants, i.e. ADA2 and CDA3, are located close to each other in the second exon. In previous work, no mutations could be induced here even with a classical approach of targeted mutagenesis, so that it is possibly a position effect in the genomic context that makes this target region difficult to access for Cas9 (Hoffie et al., 2021). In addition, the approach of mutating very specific positions in the target gene contributes to the lack of flexibility to select targets with particularly good in silico predicted values for high mutation efficiency.

While relatively high mutation rates were achieved at the target motifs CDA1 and CDA4 and were also inherited in the M₂ generation, no base edits were found in the M₂ at the second adenine deaminase target motif ADA5. The sequence variants found in the sequencing of the M₁ were most

likely amplification and/or sequencing errors, as they also occurred at similar frequencies in the wild-type controls. Thus, there is no evidence of the functionality of the ADA module used in the context of the approach followed here using barley. The module used in the CasCADE system is based on the ABE7.10 fusion protein from the ecTadA wild-type and the derivative ecTadA* developed by directed evolution by Gaudelli et al. (2017). In mammalian cells, editing efficiencies of up to 70% were achieved with this ABE variant. In *Arabidopsis* and oilseed rape protoplasts, Kang et al. (2018) were still able to achieve up to 4% and up to 9% A-to-G-substitutions, respectively, in this configuration; in stably transformed plants, up to 85% of T₁ progeny showed mutation rates of ≥50%. At the ADA target motifs in this study, no A-to-G-substitutions occurred in protoplasts and only in a few stable plants in a very low proportion. In M₂, none with corresponding base edits were found among a total of 192 plants. For rice, Hua et al. (2020) showed that a simplified construct of nCas9 and the ecTadA* variant led to almost twice as high editing rates in plants than the ABE7.10 construct (70.6% vs. 37.5%). This therefore represents a promising approach to establishing A-to-G base editing in barley as well.

The protoplast assay proved to be a reliable approach for base editing as well to predict the functionality and efficiency of gene editing constructs, although base editing, unlike double-strand break fixation, requires other DNA replication-based repair mechanisms and mesophyll cells do not divide. It is possible that the DNA polymerase takes over this last step of DNA repair after induced base editing during the PCR amplification of target regions for sequencing. In any case, the results from protoplasts correlated clearly with those in stably transformed plants. In each case, base editing was most efficient at the target motif CDA1, the efficiency at CDA4 was somewhat lower, and no changes could be detected at ADA2, CDA3 and ADA4 that could be convincingly distinguished from sequencing errors.

At cytidine deaminase targets, there were numerous C-to-G-changes in addition to the expected C-to-T-substitutions. At target motif CDA4, these accounted for about one third of the observed base edits in M₂ and led to additional new alleles. A similar proportion was also described by Nishida et al. (2016) in their first experiments with *PmCDA1* base editors.

In summary, this study shows the potential of base editing, especially with nCas9-cytidine deaminase fusion, for generating new allelic variability in specifically addressed target motifs as well as for the exact replication of known alleles from other genotypes. However, the latter, precise editing of a very specific base change remains challenging even with this approach. In particular, the ability to precisely and effectively target the position to be changed is limited by the need for a suitably located PAM and efficiency-determining features of the gRNA, as well as by the fact that CDA and ADA have so far been largely restricted to C-to-T- and A-to-G-changes. Improved possibilities in the precise addressing of specific genome positions are offered by fusions from CDA or ADA with Cas derivatives that have greater flexibility in terms of PAMs, such as nCas-NG, which can use all NG motifs as PAMs instead of NGG. Base editing primarily offers the possibility of generating new allelic diversity beyond knockouts at predetermined positions in the target genes. In the present study, the *HvEIF4E* gene was chosen as a target that is very relevant from a breeding point of view, and a total of 10 new alleles were used to generate material that is available for testing for BaMMV resistance. If some of the alleles prove to confer resistance, new gene variants of this well-known susceptibility gene could be made available for breeding.

5.5. Author Contributions

JK conceived the project and acquired the funding. RH devised the experimental setup. RH, IH, IO, and CB performed the experiments. RH analysed the data and wrote the article, JK edited the article. All authors approved the article.

5.6. Funding

The research was funded in frame of the IdeMoDeResBar project 031B0887 (phase 2)) by the German Federal Ministry of Education and Science (BMBF).

5.7. Conflict of Interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

5.8. Acknowledgments

The authors thank Claudia Baumann and Markus Erhardt for excellent technical assistance.

5.9. Supplementary Material Chapter 5

The supplementary material for this chapter is given under 10.3:

10.3.1 S1: HvEIF4E coding Sequence and Target Motifs

10.3.2 Table S1: Oligonucleotide Sequences

10.3.3 Table S2: M₂ Plant Data

10.3.4 Standard Protocol for Base Editing with the CasCADE modular Vector System

5.10. References Chapter 5

Chen, Y., Wang, Z., Ni, H., Xu, Y., Chen, Q. and Jiang, L. (2017) CRISPR/Cas9-mediated base-editing system efficiently generates gain-of-function mutations in Arabidopsis. *Science China. Life sciences* 60, 520–523.

Gaudelli, N. M., Komor, A. C., Rees, H. A., Packer, M. S., Badran, A. H., Bryson, D. I. and Liu, D. R. (2017) Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature* 551, 464–471.

Gerasimova, S. V., Hertig, C., Korotkova, A. M., Kolosovskaya, E. V., Otto, I., Hiekel, S., Kochetov, A. V., Khlestkina, E. K. and Kumlehn, J. (2020) Conversion of hulled into naked barley by Cas endonuclease-mediated knockout of the NUD gene. *BMC plant biology* 20, 255.

Hoffie, I., Daghma, D., Mirzakhmedov, M., Chamas, S., Egorova, A., Fontana, I. M., Hoffie, R. E., Ehrhardt, M., Marthe, C., Büchner, H., Hiekel, S. and Kumlehn, J. (in preparation) CasCADE: A modular and versatile vector system for Cas endonuclease-mediated genome modifications validated in mono- and dicotyledonous plants.

Hoffie, R. E., Otto, I., Perovic, D., Budhagatapalli, N., Habekuß, A., Ordon, F. and Kumlehn, J. (2021) Targeted Knockout of Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E Confers Bymovirus Resistance in Winter Barley. *Frontiers in genome editing* 3, 784233.

Hu, L., Amoo, O., Liu, Q., Cai, S., Zhu, M., Shen, X., Yu, K., Zhai, Y., Yang, Y., Xu, L., Fan, C. and Zhou, Y. (2020) Precision Genome Engineering Through Cytidine Base Editing in Rapeseed (*Brassica napus* L.). *Frontiers in genome editing* 2, 605768.

Hua, K., Tao, X., Liang, W., Zhang, Z., Gou, R. and Zhu, J.-K. (2020) Simplified adenine base editors improve adenine base editing efficiency in rice. *Plant biotechnology journal* 18, 770–778.

Hua, K., Tao, X., Yuan, F., Wang, D. and Zhu, J.-K. (2018) Precise A•T to G•C Base Editing in the Rice Genome. *Molecular plant* 11, 627–630.

- Kang, B.-C., Yun, J.-Y., Kim, S.-T., Shin, Y., Ryu, J., Choi, M., Woo, J. W. and Kim, J.-S. (2018) Precision genome engineering through adenine base editing in plants. *Nature plants* 4, 427–431.
- Kanyuka, K., Druka, A., Caldwell, D. G., Tymon, A., McCallum, N., Waugh, R. and Adams, M. J. (2005) Evidence that the recessive bymovirus resistance locus *rym4* in barley corresponds to the eukaryotic translation initiation factor 4E gene. *Molecular plant pathology* 6, 449–458.
- Kashojiya, S., Lu, Y., Takayama, M., Komatsu, H., Minh, L. H. T., Nishida, K., Shirasawa, K., Miura, K., Nonaka, S., Masuda, J.-I., Kondo, A., Ezura, H. and Ariizumi, T. (2022) Modification of tomato breeding traits and plant hormone signaling by target-AID, the genome-editing system inducing efficient nucleotide substitution. *Horticulture research*.
- Knisbacher, B. A., Gerber, D. and Levanon, E. Y. (2016) DNA Editing by APOBECs: A Genomic Preserver and Transformer. *Trends in genetics TIG* 32, 16–28.
- Komor, A. C., Kim, Y. B., Packer, M. S., Zuris, J. A. and Liu, D. R. (2016) Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature* 533, 420–424.
- Kumlehn, J., Serazetdinova, L., Hensel, G., Becker, D. and Loerz, H. (2006) Genetic transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.) via infection of androgenetic pollen cultures with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant biotechnology journal* 4, 251–261.
- Li, C., Zong, Y., Wang, Y., Jin, S., Zhang, D., Song, Q., Zhang, R. and Gao, C. (2018) Expanded base editing in rice and wheat using a Cas9-adenosine deaminase fusion. *Genome biology* 19, 59.
- Li, J., Sun, Y., Du, J., Zhao, Y. and Xia, L. (2017) Generation of Targeted Point Mutations in Rice by a Modified CRISPR/Cas9 System. *Molecular plant* 10, 526–529.
- Molla, K. A., Sretenovic, S., Bansal, K. C. and Qi, Y. (2021) Precise plant genome editing using base editors and prime editors. *Nature plants* 7, 1166–1187.
- Nambiar, T. S., Baudrier, L., Billon, P. and Ciccia, A. (2022) CRISPR-based genome editing through the lens of DNA repair. *Molecular cell* 82, 348–388.
- Nishida, K., Arazoe, T., Yachie, N., Banno, S., Kakimoto, M., Tabata, M., Mochizuki, M., Miyabe, A., Araki, M., Hara, K. Y., Shimatani, Z. and Kondo, A. (2016) Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems. *Science (New York, N.Y.)* 353.
- Schmitt-Keichinger, C. (2019) Manipulating Cellular Factors to Combat Viruses: A Case Study From the Plant Eukaryotic Translation Initiation Factors eIF4. *Frontiers in microbiology* 10, 17.
- Shan, Q., Wang, Y., Li, J. and Gao, C. (2014) Genome editing in rice and wheat using the CRISPR/Cas system. *Nature protocols* 9, 2395–2410.
- Shi, L., Jiang, C., He, Q., Habekuß, A., Ordon, F., Luan, H., Shen, H., Liu, J., Feng, Z., Zhang, J. and Yang, P. (2019) Bulk segregant RNA-sequencing (BSR-seq) identified a novel rare allele of eIF4E effective against multiple isolates of BaYMV/BaMMV. *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik* 132, 1777–1788.

- Stein, N., Perovic, D., Kumlehn, J., Pelliö, B., Stracke, S., Streng, S., Ordon, F. and Graner, A. (2005) The eukaryotic translation initiation factor 4E confers multiallelic recessive Bymovirus resistance in *Hordeum vulgare* (L.). *The Plant journal for cell and molecular biology* 42, 912–922.
- Wang, Z., Liu, X., Xie, X., Deng, L., Zheng, H., Pan, H., Li, D., Li, L. and Zhong, C. (2021) ABE8e with Polycistronic tRNA-gRNA Expression Cassette Significantly Improves Adenine Base Editing Efficiency in *Nicotiana benthamiana*. *International journal of molecular sciences* 22.
- Yang, P., Habekuß, A., Hofinger, B. J., Kanyuka, K., Kilian, B., Graner, A., Ordon, F. and Stein, N. (2016) Sequence diversification in recessive alleles of two host factor genes suggests adaptive selection for bymovirus resistance in cultivated barley from East Asia. *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik* 130, 331–344.
- Zong, Y., Wang, Y., Li, C., Zhang, R., Chen, K., Ran, Y., Qiu, J.-L., Wang, D. and Gao, C. (2017) Precise base editing in rice, wheat and maize with a Cas9-cytidine deaminase fusion. *Nature biotechnology* 35, 438–440.

6. Allgemeine Diskussion

Genetische Veränderungen sind die Grundlage von Evolution und Züchtung. Zunächst durch mehr oder weniger unbewusste Auswahl von Pflanzen mit vorteilhaften Eigenschaften, dann durch zunehmend gezieltere Selektion haben Menschen die heutigen Kulturpflanzen geformt, deren Veränderungen gegenüber ihren wilden Vorfahren maßgeblich auf Mutationen beruhen. Durch verschiedene Methoden wurde die Mutationsrate bewusst erhöht, um die genetische Vielfalt zu vergrößern und mit immer besseren Selektionsmethoden wurden Pflanzen mit vorteilhaften Eigenschaften aus dieser Vielfalt ausgewählt.

Mit den heute verfügbaren Methoden der Genomeditierung können Mutationen gezielt an präzise ausgewählten Positionen im Genom von Pflanzen induziert werden. Die Nutzung solcher Ansätze in Gerste ist Gegenstand dieser Arbeit. In Kapitel 2 wird der Stand der Technik der Genomeditierung mit Cas-Endonukleasen und ihre Anwendung in Forschung und Züchtung in Gerste und Weizen ausführlich dargestellt. Die Kapitel 3 und 4 beschreiben den Einsatz dieser Technik zur gezielten Mutagenese der zwei bekannten Anfälligkeitse Gene der Gerste *EIF4E* und *PDIL5-1* für die Gelbmosaikvirose. Das Gen *EIF4E* wurde erfolgreich mutiert, wodurch Gerstenlinien mit *Knockout*-Allelen erzeugt werden konnten. Die homozygot mutierten Nachkommen waren resistent gegen die Infektion mit BaMMV. Jedoch zeigte sich eine signifikante Ertragsreduktion im Vergleich zu nicht mutierten Pflanzen. In *HvPDIL5-1* konnten mittels Cas9 an mehreren Zielmotiven innerhalb des Gens unterschiedliche Allele erzeugt werden, die ähnlich solchen waren, die zuvor in der Gerstenvielfalt der Gaterslebener Genbank identifiziert worden waren. Homozygote *PDIL5-1*-Mutanten waren ebenfalls resistent gegen die Infektion mit BaMMV, wiesen aber im Vergleich zu Kontrollpflanzen nicht signifikant abweichende Ertragswerte auf. In Kapitel 5 wird mit der Baseneditierung ein anderer Ansatz beschrieben, der nicht auf der Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen basiert, sondern gezielt zu Basensubstitutionen in der Zielregion und damit zu Aminosäureaustauschen im codierten Protein eIF4E führt. Zehn neue *HvEIF4E*-Allele konnten so generiert werden, die vorgesehen sind, in weiteren Versuchen auf ihre resistenzvermittelnden Eigenschaften und ihre Auswirkung auf das Ertragspotential getestet zu werden.

Die einzelnen fachlichen Aspekte der beschriebenen Arbeiten wurden in den jeweiligen Kapiteln bereits diskutiert. Hier sollen sie noch einmal im Zusammenhang betrachtet, gemeinsame Aspekte diskutiert und anhand dessen die Potentiale der Genomeditierung für die Pflanzenzüchtung eingeordnet werden.

6.1. Fehlerhafte Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen führt zu verschiedenen Mutationen

Wie in den Kapiteln 2, 3 und 4 beschrieben, führt die Reparatur von Cas9-induzierten Doppelstrangbrüchen vor allem zu kleinen Deletionen oder Insertionen in der Zielregion des angesteuerten Gens. Solche Doppelstrangbrüche werden mehrheitlich durch den Mechanismus der Nicht-homologen Endverknüpfung (*Non-homologous End-Joining*, NHEJ) repariert. Dabei werden die beiden Enden des Bruchs schnell von Proteinen gebunden, vor Abbau geschützt und von der Ligase IV wieder zusammengefügt. Die Reparatur ist zumeist korrekt, aber mit gewisser Wahrscheinlichkeit und durch wiederholtes Schneiden des Zielmotivs durch die Endonuklease können kleine Insertionen und Deletionen von einer bis mehreren Dutzend Basen, seltener auch Substitutionen einzelner Basen, auftreten (Stinson & Loparo, 2021; Nambiar et al., 2022). Diese Mutationen sind zwar in ihrer Position, nicht aber in Hinblick auf die resultierende Sequenz vorhersagbar. Diese Art der gezielten Mutagenese ist vergleichbar mit jenen DNA-Veränderungen, die auch bei strahleninduzierter Mutagenese beobachtet werden, wobei die strahleninduzierten Mutationen, insbesondere Deletionen und Inversionen, dabei auch deutlich größer ausfallen

können, da es simultan zu multiplen Doppelstrangbrüchen kommen kann (Gill et al., 2015; Jayakodi et al., 2020). Durch den Einsatz von zwei gRNAs wurden größere *Rearrangements* auf Chromosomenebene aber auch bereits durch den Einsatz von Cas-Endonukleasen erreicht (Schmidt et al., 2020). Im Gegensatz zur zufälligen strahleninduzierten Mutagenese lassen sich so die umarrangierten Chromosomenbereiche jedoch bestimmen.

Insertionen und Deletionen führen in der Regel zu einem Funktionsverlust des Gens auf Translationsebene, da sich das Leseraster der RNA verschiebt und es stromabwärts zu einer gänzlich veränderten Proteinsequenz und häufig auch zu vorzeitigen Stopp-Codons kommt, wie dies auch für *HvEIF4E* (siehe 3.3) und *HvPDIL5-1* (siehe 4.3.1) beobachtet wurde.

Wie in Kapitel 4 beschrieben, kann daneben ein alternativer Pfad, die Mikrohomologie-basierte Endverknüpfung (*Microhomology-mediated End-Joining*, MMEJ), die Muster von Mutationen beeinflussen. Dabei vermitteln beidseitig des Doppelstrangbruches gelegene Sequenzwiederholungen (meist 2-25 bp) die Reparatur. Nach dem Bruch der DNA kommt es zum 5'->3'-Abbau von Einzelsträngen auf beiden Seiten. Die nun einzelsträngigen DNA-Enden fügen sich durch komplementäre Basenpaarung zwischen den wiederholten Sequenzabschnitten zusammen. Etwaige Lücken werden durch die DNA-Polymerase θ gefüllt und die überstehenden Enden der Einzelstränge abgebaut. Dadurch kommt es zur Deletion einer der Sequenzwiederholungen sowie dem Bereich zwischen beiden Wiederholungen (Nambiar et al., 2022). Bei der gezielten Mutagenese von *HvPDIL5-1* konnte dies mehrfach an verschiedenen Zielregionen beobachtet werden (siehe 4.4.2). Dieser Reparaturmechanismus ließe sich auch gezielt dazu nutzen, die Vorhersagbarkeit der induzierten Mutationen zu verbessern, indem die von der Cas-Endonuklease zu adressierende Schnittstelle genau zwischen solche Sequenzwiederholungen platziert wird. So könnte der MMEJ-Reparaturmechanismus aktiviert und beispielsweise gezielt bestimmte Sequenzbereiche innerhalb des Leserasters und damit Teile von Proteinen präzise entfernt werden. Werden mehrere benachbarte Zielmotive gleichzeitig angesteuert und dort Doppelstrangbrüche induziert, kann es auch zu Deletionen des gesamten (größeren) Sequenzbereichs dazwischen kommen.

Die Substitution von einzelnen Basen ist dagegen eher selten, wurde aber zumindest im *HvPDIL5-1*-Gen am Zielmotiv 4 neben den genannten Insertionen und Deletionen ebenfalls beobachtet (siehe 4.4.1). Solche Veränderungen sind von besonderem Interesse, um Gene nicht abzuschalten, sondern um funktionale Veränderungen zu induzieren. Dem sind jedoch mit dem bisher weit verbreiteten Stand der Technik (siehe auch Kapitel 2), der Induktion von Doppelstrangbrüchen, Grenzen gesetzt. Deshalb wird intensiv an alternativen Ansätzen geforscht, um die Präzision zu erhöhen und so auch das Ergebnis der induzierten Mutagenese besser zu beeinflussen. Eine Zeit lang wurde dabei der Ansatz verfolgt, über Homologe Rekombination (in Publikationen häufig auch mit dem Oberbegriff Homologie-basierte Reparatur (*Homology-directed Repair*, HDR) bezeichnet), gezielt Genbereiche auszutauschen. Dafür wurde meist zusammen mit dem Cas9-gRNA-Komplex eine Reparaturvorlage in die Zelle eingeschleust, welche an den Enden homologe Sequenzbereiche zu der Zielsequenz aufwies. Über diese Homologien sollte die Vorlage nach der Induktion des DNA-Doppelstrangbruchs in das vorhandene Gen kopiert und so gezielt einzelne Basen ersetzt oder codierende Sequenzen hinzugefügt werden. Die wenigen erfolgreichen Studien bearbeiteten dabei oft Gene, die zu einer Herbizidresistenz führten (z.B. *Acetolactatsynthase*, *ALS*), was bereits während der Zellkultur selektiert werden konnte. Selbst dabei wurden nur Effizienzen im unteren einstelligen Prozentbereich erreicht (Čermák et al., 2015; Svitashv et al., 2015; Endo et al., 2016; Chen et al., 2022). Der Hauptgrund dafür liegt in den unterschiedlichen DNA-Reparatursystemen, die in verschiedenen Zelltypen und Zellzyklusstadien unterschiedlich aktiv sind. Die auf homologer Rekombination beruhende Reparatur kommt dabei unter anderem beim *Crossing Over* während der Meiose zum Einsatz und ist in somatischen Pflanzenzellen deutlich weniger aktiv als NHEJ oder MMEJ (Puchta & Fauser, 2014).

Da für viele wissenschaftlich und agronomisch relevante Fragestellungen eine hohe Präzision der Editierung erforderlich ist, gleichzeitig aber in den meisten angewandten Fällen nicht bereits in der Zellkultur auf die Veränderung selektiert werden kann, braucht es effizientere Methoden, um genetische Veränderungen präzise zu induzieren.

6.2. Der nächste Schritt: Präzise Editierungen

Um genetische Veränderungen präziser als nur durch fehlerhafte Reparatur von Doppelstrangbrüchen zu erzeugen, werden derzeit in Pflanzen hauptsächlich zwei Ansätze verfolgt: Die Baseneditierung und das *Prime Editing*. Die Baseneditierung wird in Kapitel 5 anhand gezielter Basenaustausche in *HvEIF4E* beschrieben. Mit der Fusion einer nCas9 mit einer Cytidin-Deaminase ist es in der dort dokumentierten Studie gelungen, zehn verschiedene, neue Allele von *HvEIF4E* zu generieren. Der Vorteil dieses Ansatzes liegt darin, dass keine DNA-Doppelstrangbrüche induziert werden und somit der Anteil von Insertionen und Deletionen, die meist zum Funktionsverlust führen, stark reduziert wird. Stattdessen werden durch die deaminierende Aktivität der mit nCas9 fusionierten Enzyme einzelne Basen in der Zielregion substituiert. Ähnlich wie bei der chemisch induzierten Mutagenese mit Ethylmethansulfonat (EMS) oder auch durch die natürliche UV-B-Strahlung des Sonnenlichts werden damit Punktmutationen verursacht, die zu individuell veränderten Aminosäurebesetzungen oder auch zu Stopp-Codons führen, sodass nur geringfügig veränderte bzw. verkürzte Proteine translatiert werden (Gill et al., 2015; Nambiar et al., 2022). Beides wurde auch im Rahmen dieser Arbeit beobachtet und unter 5.3 beschrieben. Mit der Baseneditierung können somit zielgerichtet Basensubstitutionen innerhalb des Leserasters induziert werden. Die resultierende Sequenz ist aber nur bedingt vorhersagbar, da mehrere Basen in der Zielregion in verschiedenen Kombinationen editiert werden können. Daraus ergibt sich der Vorteil, dass damit eine allelische Diversität für das Zielgen geschaffen werden kann (siehe 5.3). Für die Editierung der Zielsequenz in eine ganz bestimmte Sequenz ist dieser Ansatz damit jedoch nur bedingt geeignet. Zwar ist dies möglich und im Falle der *rym4_1*-Mutation auch gelungen (siehe 5.3), allerdings muss dafür die zu editierende Base genau in einem möglichen Zielmotiv liegen und es muss sich um einen C-zu-T- oder A-zu-G-Austausch handeln. Um eine beliebige Base in eine beliebige andere Base umzuwandeln, ist die Baseneditierung in dieser Form (noch) nicht geeignet.

Auch die Baseneditierung wurde bisher vor allem anhand des *ALS*-Gens in verschiedenen Pflanzenarten demonstriert und es wurden so Herbizidtoleranzen in Weizen, Kartoffel, Wassermelone und Tomate erzeugt (Shimatani et al., 2017; Tian et al., 2018; Veillet et al., 2019b). Darüber hinaus wurden aber ebenso agronomisch relevante Eigenschaften verbessert wie eine Virusresistenz durch Editierung des *EIF4E*-Gens in *Arabidopsis* oder die Stärkezusammensetzung der Kartoffel (Bastet et al., 2019; Veillet et al., 2019a). Einen umfassenden Überblick dazu gibt Tabelle 1 in Zhu & Zhu (2022). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Baseneditierung erstmals erfolgreich in Gerste eingesetzt. Inwiefern die erzeugten *HvEIF4E*-Allele Virusresistenz vermitteln, bleibt in nachfolgenden Infektionsversuchen mit BaMMV zu analysieren.

Noch mehr Präzision ermöglicht das *Prime Editing*, erstmals beschrieben von Anzalone et al. (2019). Es ist technisch jedoch deutlich anspruchsvoller als die bisher erwähnten Techniken. Dabei werden an die nCas9 eine Reverse Transkriptase fusioniert und die gRNA am 3'-Ende um eine RNA-Reparaturvorlage erweitert (*prime editing* gRNA, pegRNA), die homologe Bereiche zur Zielregion sowie die zu erzielende Wunschsequenz enthält. Nach der Induktion des DNA-Einzelstrangbruchs binden die homologen Bereiche der Reparaturvorlage an die Zielsequenz und die reverse Transkriptase schreibt diese in DNA um. Somit lassen sich Substitutionen, aber auch Insertionen oder Deletionen erzeugen (Nambiar et al., 2022). Limitierungen ergeben sich hierbei allerdings aus der Erreichbarkeit der spezifischen Position im Zielgen und dem komplexen Design der Reparaturvorlage.

Prime Editing wurde in Pflanzen bisher in Mais, Weizen, Reis und Tomate eingesetzt, allerdings mit deutlich geringeren Effizienzen als in humanen Zelllinien (Jiang et al., 2020b; Lin et al., 2020; Lu et al., 2021). Es besteht also noch weiterer Forschungsbedarf, um die Kombination von Präzision bei hoher Effizienz der Genomeditierung von Pflanzen zu verbessern.

6.3. Genomeditierung für die Pflanzenzüchtung: Potentiale und Herausforderungen

Um genetische Variation zu generieren und nutzen zu können, hat die Pflanzenzüchtung einen vielfältigen Werkzeugkasten zur Verfügung. Über Kreuzungen werden verschiedene Genvarianten und damit Eigenschaften kombiniert, über weite Kreuzungen und Gentransfer auch über Artgrenzen hinaus (siehe 1.1.2 und 1.1.4). Durch Mutagenese wird die genetische Vielfalt erhöht, um so neue Varianten für die Züchtung nutzen zu können (siehe 1.1.3). All diese bisherigen Ansätze basieren dabei auf der vorhandenen genetischen Diversität durch spontane Mutationen oder auf induzierter, aber zufälliger Mutagenese. Insbesondere die Zufälligkeit der dabei entstehenden genetischen Veränderungen bringt einige Herausforderungen mit sich. So müssen in der Regel mehrere tausend Individuen untersucht werden, um die gewünschte Eigenschaft in einer Mutantensammlung zu identifizieren. Außerdem entstehen neben der gewünschten Mutation viele weitere Hintergrundmutationen, die durch Rückkreuzungen reduziert werden müssen (siehe dazu auch 1.1.5).

6.3.1. Neue Methoden – neue Möglichkeiten

Mit der Genomeditierung bestehen nun Möglichkeiten, genetische Veränderungen, insbesondere kleine Deletionen und Insertionen, gezielt im gewünschten Zielgen zu induzieren. Damit lassen sich Gene vor allem abschalten.

Eine Reihe züchterisch relevanter Eigenschaften gehen auf den Funktionsverlust bestimmter Gene zurück. Beispiele aus der Vergangenheit reichen bis zur Domestikation, bei der beispielsweise Ährenstabilität oder Mehrzeiligkeit der Gerste durch *Knockouts* verschiedener Gene zustande kamen. Auch die klassische Mutagenese hat etwa mit der *mlo*-Mehltauresistenz oder der Kurzstrohigkeit durch *Knockouts* zur Verbesserung der Getreidezüchtung beigetragen (siehe 1.1). Für die Genomeditierung gibt es bereits zahlreiche Studien, wie agronomisch relevante Eigenschaften durch *Knockouts* verbessert werden können. Einen Überblick über bisherige Anwendungen bei Gerste und Weizen gibt Table 2-1 unter 2.3 sowie für Reis, Mais und Weizen der *Review* von Hisano et al. (2021). Eine systematische Untersuchung der bisherigen Anwendungen von Genomeditierung in Pflanzen von Modrzejewski et al. (2019) zeigte auf, dass die verschiedenen Editierungstechniken bisher in 68 unterschiedlichen Pflanzenarten angewendet wurden. Die Top-10-Pflanzen dabei sind (absteigend) Reis, *Arabidopsis*, Tabak, Tomate, Mais, Weizen, Sojabohne, Alge, Moos und Kartoffel. Gerste folgt erst auf Platz 12. Neben Projekten im Rahmen der Grundlagenforschung umfasste dies insgesamt 99 verschiedene praxisorientierte Anwendungen in 28 unterschiedlichen Kulturpflanzen. Die meisten davon bezogen sich auf einen gesteigerten „landwirtschaftlichen Wert“, also z.B. verbessertes Wurzelwachstum, erhöhtes Ertragspotential, oder Vorteile für die Züchtungsmethodik selbst, wie Haploideninduktion oder männliche Sterilität. Weitere häufige Anwendungsfelder sind verbesserte Produktqualität, wie Öl- oder Stärkezusammensetzung sowie die Reduktion schädlicher Inhaltsstoffe. Ebenso ist die Resistenzzüchtung gegen Pilze, Viren und Bakterien ein großer Anwendungsbereich (Modrzejewski et al., 2019). Auch Ahmad et al. (2021) beschreiben die Möglichkeiten und bisherigen Erfolge bei der Verbesserung von Nutzpflanzen mittels Cas9-basierter Genomeditierung. Sie nennen ebenfalls Beispiele wie Krankheitsresistenzen, Widerstandsfähigkeit gegen abiotische Stressfaktoren (Kälte, Trockenheit, Überflutung) oder erhöhtes Ertragspotential (Korngröße, Photosyntheseleistung). Die Mehrheit der bisherigen

Anwendungen wurden mit TALENs oder Cas-Endonukleasen bearbeitet und es handelt sich vor allem um *Gen-Knockouts* aufgrund von Leserastermutationen durch Insertionen oder Deletionen. Die bisher etablierten Techniken eignen sich gut für das Abschalten von Genen, jedoch gibt es eine Reihe von Eigenschaften, die nur durch die gezielte Modifikation vorhandener Gene verändert werden können. Das in dieser Arbeit vorgestellte *HvEIF4E* für Virusresistenz kann beispielsweise wegen des Ertragsverlusts in Gerste nicht in Form eines *Knockouts* in der Züchtung genutzt werden. Hier braucht es präzisere Ansätze, wie unter 6.2 bereits diskutiert wurde.

6.3.2. Herausforderungen in der Praxis

Genomeditierung hat demnach das Potential, zur gezielten Veränderung von Kulturpflanzen und damit zur Verbesserung der Pflanzenzüchtung beizutragen. Diesem Potential stehen jedoch auch noch Herausforderungen in der praktischen Anwendung gegenüber. Auslesezucht und auch Kreuzung und anschließende Selektion erfordern, ebenso wie die klassische Mutagenese, in der Regel keine Kenntnisse der verantwortlichen Gene. Diese Formen der Züchtung basieren nur auf dem Phänotyp, anhand dessen Pflanzen mit vorteilhaften Eigenschaften ausgewählt werden.

Für die Marker-basierte Selektion (MAS) sind zwar bereits genauere genetische Informationen nötig, es genügen hierfür aber Assoziationen zwischen einfach nachweisbaren genetischen Mustern und dem Phänotyp, ohne dass die Sequenz oder die Funktion des verantwortlichen Gens selbst bekannt sein müssen. Hingegen wird für die Genomeditierung mindestens die Gensequenz, Hinweise auf die Funktion des Gens und bestenfalls weitere Informationen darüber benötigt, welche Veränderungen erforderlich sind, um den gewünschten Phänotyp zu erhalten. Es ist also vergleichsweise viel Vorwissen notwendig. In der Vergangenheit konnte es mehrere Jahrzehnte dauern, eine für einen besonderen Phänotyp verantwortliche Genvariante zu identifizieren. Im Falle der Gerstengelbmosaik-Resistenz war der Resistenzlocus *rym4* bereits seit den 1980er Jahren bekannt und wurde in der Züchtung genutzt. Ab den 1990er Jahren waren molekulare Marker für die Unterstützung der Züchtung verfügbar und die Mehrheit der Gerstensorten in Europa trug Ende der 1990er Jahre bereits dieses Resistenzallel. Bis der Eukaryotische Translationsinitiationsfaktor 4E (*EIF4E*) als das verantwortliche Gen identifiziert werden konnte, dauerte es jedoch bis 2005, also über 20 Jahre. Dass die Züchtung hier schneller war, lag vor allem daran, dass ein *rym4*-tragender Genotyp bereits wegen anderer Eigenschaften zuvor in der Gerstenzüchtung genutzt wurde (siehe 1.1.5 und 1.2.4) und das Allel deshalb im Zuchtmaterial relativ leicht verfügbar war. Bei exotischeren genetischen Ressourcen wie wilden Verwandten oder Material aus anderen geographischen Herkünften kann die erforderliche Rückkreuzung viele Jahre in Anspruch nehmen, sodass gerade in solchen Fällen die Identifizierung des vorhandenen Gens und die anschließende Verfügbarmachung eines vorteilhaften Allels mittels Geneditierung schneller sein kann, als klassische Züchtung. Dies ist beispielsweise bei *rym11/ HvPDIL5-1* der Fall.

Die moderne Genetik bietet immer bessere Voraussetzungen dafür, phänotypische Eigenschaften schneller mit ihren verantwortlichen Genen zu assoziieren. So sind beispielsweise die Genome vieler wichtiger Kulturpflanzen inzwischen sequenziert. Durch Pangenom-Projekte und leistungsfähige Bioinformatik kann die verfügbare genetische Diversität bis auf Einzelnukeotidebene erschlossen werden. Durch genomweite Assoziationsstudien (GWAS) oder moderne Genkartierungsansätze lassen sich in Kombination mit Hochdurchsatzphänotypisierung Genvarianten innerhalb weniger Jahre individuell identifizieren (Alqudah et al., 2020; Singh et al., 2022). Vorteilhafte Allele können mit diesem Wissen, insbesondere durch präzise Editierungen, direkt für die Züchtung nutzbar gemacht werden, wie es etwa für *HvPDIL5-1* in dieser Arbeit beschrieben wird (siehe Kapitel 4). So kann die Beschleunigung auf Seite der Genidentifizierung mithilfe der Genomeditierung direkt in die praktische Pflanzenzüchtung übertragen werden weil sich damit langwierige Kreuzungen und Rückkreuzungen zumindest teilweise ersetzen lassen.

Besonders hilfreich sind solche Ansätze für die Resistenzzüchtung. Denn in Co-Evolution mit den Pflanzen passen sich Pathogene immer wieder an bestehende Resistenzmechanismen an und überwinden diese (Han, 2019; Delaux & Schornack, 2021). Ob und wie schnell dies passiert, hängt von dem jeweiligen Pathosystem, der Interaktion zwischen Pflanze und Pathogen, der Generationszeit und Diversität des Pathogens ab und lässt sich daher kaum prognostizieren. Aber der Prozess kann durch das „Pyramidisieren“ von Resistenzgenen und damit bestenfalls der Kombination unterschiedlicher Resistenzmechanismen zusätzlich verlangsamt werden (Palloix et al., 2009; Fuchs, 2017). Jedoch steigt der züchterische Aufwand von Kreuzungsansätzen mit jedem zusätzlichen Resistenzgen exponentiell an. Hier können Methoden der Genomeditierung helfen, verschiedene resistenzvermittelnde Allele in einer Pflanze zu kombinieren und so dauerhafte Resistenzen aufzubauen. Wie unter 3.1 beschrieben, konnten BaYMV- und BaMMV-Stämme durch Veränderungen in ihrem *Viral Genome-linked Protein* (VPg) die *rym4*- und *rym5*-Resistenzen überwinden (Li & Shirako, 2015; Li et al., 2016). Die auf dem Funktionsverlust von *HvPDIL5-1* basierenden Resistenzen wurden in der praktischen Züchtung bisher kaum genutzt, weshalb keine Aussagen über deren Dauerhaftigkeit getroffen werden können. Aber durch Kombination von *Hvpdil5-1*-Allelen mit baseneditierten *HvEIF4E*-Allelen (wie unter 5.3 beschrieben), ließe sich wahrscheinlich eine langfristige Resistenz gegen alle BaYMV- und BaMMV-Stämme erreichen. Durch komplexe Kreuzungen und anschließende markerbasierte Selektion in Kombination mit Doppelhaploiden-Produktion wurde ein *Stacking* von *rym4/rym5* mit *rym9* und *rym11* bereits erreicht (Werner et al., 2005), jedoch wurde dieser Ansatz in der praktischen Züchtung bisher nicht eingesetzt. Grund dafür könnte der „*Linkage Drag*“ sein, durch den mit dem Einkreuzen von Resistenzallelen eng gekoppelte Gene mit nachteiligen Eigenschaften mitvererbt werden (Hernandez et al., 2020). Auch dieses Problem ließe sich durch die punktuelle Editierung der einzelnen, relevanten Gene umgehen.

Um dieses und weitere Potentiale voll auszuschöpfen, müssen bestenfalls Elitesorten oder zumindest Zuchtlinien editiert werden. Die dafür erforderlichen Zellkulturtechniken sind bisher jedoch sehr genotypenabhängig. Das bedeutet, dass sich etwa bei Gerste nur wenige Sorten, allen voran „Golden Promise“ und „Igri“, effizient transformieren lassen. Der transgene Zwischenschritt, bei dem ein Cas9- und gRNA-Gen in eine Pflanzenzelle übertragen werden und daraus eine Pflanze regeneriert wird (siehe 2.2.3 sowie 3.2.4, 4.2.2 und 5.2.4), ist bisher noch das Standardverfahren bei der Genomeditierung (einjähriger) Kulturpflanzen. Nach erfolgreicher Editierung im Zielmotiv lässt sich das Transgen durch Selbstung unabhängig von der induzierten Mutation wieder heraussegregieren. Aber auch alternative Methoden, die keinen transgenen Zwischenschritt benötigen, wie beispielsweise Ribonukleoproteine (RNPs, siehe ebenfalls 2.2.3), basieren auf *In-vitro*-Kulturen und damit auf der Regenerationsfähigkeit des Ausgangsmaterials und des Genotyps. Dies stellt aktuell noch einen Flaschenhals für die praktische Genomeditierung in der Züchtung dar. Eine Möglichkeit, weitgehend auf Zellkultur zu verzichten, ist die Kombination von Genomeditierung mit der Doppelhaploiden-Produktion durch artübergreifende Kreuzungen. So gibt es beispielsweise ein seit langem bekanntes System, bei dem die Bestäubung von Weizen mit Mais-Pollen dazu führt, dass doppelhaploide Weizenpflanzen entstehen, da das Maisgenom nach der Befruchtung eliminiert wird. Budhagatapalli et al. (2020) transformierten eine Maislinie mit Cas9 und spezifischen gRNAs für Zielgene in Weizen. Sie zeigten, dass doppelhaploide Weizenpflanzen mit Mutationen in den gewünschten Genen durch Bestäubung mit der Maislinie erzeugt werden können, ohne dass die Cas9- und gRNA-codierenden Transgene in das Weizengenom integriert werden. Durch Bestäubung mit gut transformierbaren Genotypen ließen sich gezielte Mutationen in theoretisch allen Genotypen der Zielpflanzenart durchzuführen, für die ein solches System besteht. So sind beispielsweise auch Bestäubungen von Mais mit DH-Inducerlinien von Mais bekannt, ebenso wie die Bestäubung von Kulturgerste (*H. vulgare*) mit Knollengerste (*H. bulbosum*) oder die Kreuzungen mit CenH3-Mutanten bei *Arabidopsis* (Ravi & Chan, 2010; Jacquier et al., 2021; Satpathy et al., 2021).

Kreuzung und Selektion werden auf absehbare Zeit die Grundlage von Pflanzenzüchtung bleiben. Doch mit dem Fortschritt in Genetik und Bioinformatik werden immer mehr konkrete Gensequenzen verfügbar und mit Eigenschaften assoziierbar. Auf dieser Basis können vorteilhafte Allele mittels Genomeditierung schneller als durch konventionelle Kreuzung für die Züchtung nutzbar gemacht werden. Die dafür notwendigen Voraussetzungen wie die Präzision der Editierung selbst und die Möglichkeiten einer breiten Anwendung sind Gegenstand der aktuellen Forschung und Weiterentwicklung dieser Methoden. Damit werden die Potentiale dieser Technologie für die Züchtung im Sinne einer nachhaltigeren Landwirtschaft immer besser umsetzbar.

7. Erfahrungen aus der Wissenschaftskommunikation

Gentechnische Arbeiten an Pflanzen, wie sie im Rahmen dieser Dissertation vorgestellt wurden, stoßen in der öffentlichen Wahrnehmung immer wieder auf Skepsis, Kritik bis hin zu offener Ablehnung. Da sich die Potentiale dieser wissenschaftlichen und technologischen Ansätze für die Pflanzenzüchtung und damit für die Landwirtschaft nur mit gesellschaftlicher Akzeptanz nutzen lassen, habe ich mich diesem Themenkomplex parallel zu meiner Forschungsarbeit auch ganz praktisch im Bereich der Wissenschaftskommunikation (Wisskomm) gewidmet. Dieses Kapitel hat nicht den Anspruch, eine kommunikationswissenschaftliche Abhandlung zu sein. Vielmehr möchte ich meine ganz subjektiven Erfahrungen und daraus resultierende Empfehlungen für die Wissenschaftskommunikation von Grüner Gentechnik im Speziellen und kontrovers diskutierten Forschungsthemen im Allgemeinen wiedergeben. Diese Erfahrungen basieren hauptsächlich auf den Aktivitäten meines Twitter-Accounts „@ForscherRobert“ sowie auf zahlreichen Vorträgen, Besucherführungen und einigen Medienauftritten. Eine Auswahl davon wird unter 7.2 vorgestellt.

7.1. Gute Wisskomm – eine persönliche Sicht

„Fake News“ oder „Alternative Fakten“ sind moderne Beschreibungen für ein Phänomen, dass es schon deutlich länger gibt als soziale Medien oder das Internet. Dennoch verstärken und verbreiten sich solche Narrative über diese Medien deutlich schneller und stärker, als das vorher der Fall war. Auf der anderen Seite ist es über diese Plattformen aber auch so einfach wie nie zuvor, sich an solchen Debatten zu beteiligen und wissenschaftlich fundierte Argumente einzubringen. Viele der aktuellen Diskurse haben einen engen Bezug zur Wissenschaft: Klimawandel, Corona-Pandemie und natürlich auch die Diskussion um Landwirtschaft, Pflanzenzüchtung und Genomeditierung. Es war lange Zeit ein Problem, dass sich zum Beispiel die Agrar- und Pflanzenwissenschaften nach den Enttäuschungen über die öffentliche Gentechnik-Diskussion in den 1990er Jahren aus der Debatte zurückgezogen haben. Umweltorganisationen haben diese Lücke mit ihren Narrativen gefüllt und so das diffuse, fast allgegenwärtige Gefühl geprägt, konventionelle Landwirtschaft im Allgemeinen und Grüne Gentechnik im Speziellen seien gefährlich für die Umwelt, den Planeten und die Konsumenten. Die Corona-Pandemie und die breit angelegte und öffentlichkeitswirksame Kommunikation der daran beteiligten Forschenden hat deutlich gezeigt, dass zwar nicht alle Teile der Gesellschaft auf diese Weise erreicht werden konnten, aber dennoch eine breite Mehrheit die notwendigen Infektionsschutzmaßnahmen befürwortete und mittrug.

Aber wie kann man in die Wissenschaftskommunikation des eigenen Forschungsthemas einsteigen? Obwohl ich vorher nicht besonders *Social-Media*-affin war, erwies sich Twitter für mich als geeignete und niedrigschwellige Plattform. Zunächst unter dem Pseudonym „Forscher Robert“ habe ich dort ein stetig wachsendes, interessiertes Publikum gefunden und viele andere Wisskomm-Aktivitäten (siehe 7.2) resultierten aus ersten Kontakten über Twitter. Der Vorteil der neuen Medien besteht darin, dass jede und jeder eine Plattform finden kann, die zu der eigenen Persönlichkeit und dem Zielpublikum passt. Twitter eignet sich für kurze, präzise Mitteilungen oder das Teilen von Links an die Medienöffentlichkeit. Dort sind vor allem Journalistinnen und Journalisten sowie Politikerinnen und Politiker unterwegs, sodass nicht „die breite Masse“, aber sehr viele Multiplikatoren erreicht werden. Instagram und Facebook sind dagegen Medien, die auch eine breitere Basis in der Bevölkerung erreichen, wobei sich das Publikum und die Inhalte etwas unterscheiden. Facebook erreicht auch ältere Nutzerinnen und Nutzer und hat vor allem regional eine höhere Reichweite. Hier können außerdem längere Texte geschrieben und in entsprechenden Interessengruppen geteilt werden. Instagram setzt vor allem auf Bilder und kurze Videos und erreicht ein jüngeres Publikum. Wobei Jugendliche mittlerweile vor allem auf

der Videoplattform TikTok präsent sind. Wenn es nicht gleich online sein soll, ist auch nach wie vor ein Tag der offenen Tür eine gute Gelegenheit, um mit vergleichsweise geringem Aufwand über die eigene Forschungsarbeit zu berichten. Das Publikum kommt häufig aus lokalem Interesse, ist also oft unvoreingenommen gegenüber den konkreten Themen und somit offen für gute Wisskomm.

Damit stellt sich die Frage, was gute Wisskomm ist und wie es zu kommunizieren gilt. Mir geht es bei meinen Aktivitäten nicht darum, Menschen zu bekehren. Es geht mir bei meinen Aktivitäten nicht darum, Menschen zu bekehren. Vielmehr möchte ich die Perspektive der Wissenschaft in die öffentliche Diskussion über mein Forschungsthema einbringen. Diese Gentechnik-Diskussion wird bereits seit mehreren Jahrzehnten geführt, und eigentlich wurde jeder Aspekt bereits behandelt. Dadurch kann es schnell nervig werden, bestimmte Punkte immer wieder zu diskutieren. Aber es interessieren sich immer wieder (neue) Menschen für das Thema und die Tatsache, dass sie kritische Fragen stellen, ist nicht zwangsläufig ein Zeichen von Ablehnung, sondern von Interesse. Also heißt es freundlich und geduldig bleiben. Aus solchen Dialogen ergeben sich auch immer wieder neue Aspekte, die man selbst eben doch noch nicht bedacht hat und bei denen es sich lohnt, tiefer einzusteigen. Zumindest geht es mir immer wieder so. In öffentlichen Diskussionen sollten außerdem immer diejenigen mit bedacht werden, die nur mitlesen oder zuhören. Mit Freundlichkeit und Offenheit lässt sich deutlich mehr Sympathie gewinnen, auch wenn es keinen Konsens mit dem eigentlichen Gegenüber gibt. Es versteht sich von selbst, dass für Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler sachliche Argumente die Grundlage in solchen Diskussionen sein sollten und sich daher *Ad-hominem*-Angriffe verbieten.

Mit dem Aufkommen der Techniken der Genomeditierung hat die Debatte einen neuen *Spin* bekommen und eine erfrischende Wiederbelebung erfahren. Das öffentliche (Medien-) Interesse ist groß und es war manchmal sogar schwierig, alle Anfragen bedienen zu können. Als Wissenschaft können wir uns nicht über ein zu geringes Interesse beklagen, wie es in früheren Zeiten der Fall gewesen sein mag. Angesichts der enormen Herausforderungen, vor denen wir insbesondere mit der Klimakrise und daraus resultierenden Problemen stehen, ist die Offenheit für neue Lösungen groß und eine freundliche Kommunikation über die konstruktiven Beiträge, die gentechnische Ansätze hier im Bereich der Pflanzenzüchtung leisten können, trifft auf offene Ohren. Dabei ist es sinnvoll, die eigenen Inhalte aktiv zu kommunizieren, statt nur auf Kampagnen von gentechnikkritischen Umweltorganisationen zu reagieren. Es geht nicht darum, jene zu überzeugen, die bereits eine feste Meinung haben. Stattdessen ist es zielführender und macht auch deutlich mehr Spaß, die eigenen positiven Geschichten zu erzählen, von der eigenen Motivation und Zielen zu berichten, nicht nur Forschungsergebnisse zu kommunizieren, sondern auch Einblicke in den ganz praktischen Laboralltag zu geben, anstatt sich an anderen abzarbeiten.

Neben Sympathie ist dabei vor allem Vertrauen und Ehrlichkeit wichtig. Nichts ist enttäuschender als ein gebrochenes Versprechen. Als Gegensatz zu den überhöht dargestellten Risiken von Gentechnik erscheint es oft allzu verlockend, dem überhöhten Chancen gegenüber zu stellen. Dabei wird keine Technologie, kein Ansatz das Welthungerproblem oder andere Herausforderungen der Landwirtschaft allein lösen. Gentechnische Züchtungsmethoden werden substantielle Beiträge dazu liefern, aber sie werden dabei andere Maßnahmen natürlich nicht ersetzen. Solche Differenzierungen sollten der notwendigen Vereinfachung nicht zum Opfer fallen. Deshalb ist es auch besser, auf eine Frage mal mit „Das weiß ich nicht“ zu antworten, statt hinterher eine als Wissen dargestellte Vermutung korrigieren zu müssen. An solchen Stellen ist es dann auch sinnvoll, auf andere Fachleute zu verweisen. Ein entsprechendes Netzwerk ist dabei nicht nur hilfreich für gute Wisskomm, die Wisskomm selbst hilft auch, dieses Netzwerk aufzubauen. Denn gerade soziale Medien sind genau dafür gemacht, solche vielfältigen Kontakte zu knüpfen. Was sich aus solchen virtuellen Bekanntschaften entwickeln kann, zeigt die „*Progressive Agrarwende*“. Diese Initiative aus jungen, wissenschaftlich und politisch interessierten Menschen hat sich auf Twitter gefunden und aus einer ersten Idee hat sich mittlerweile ein erfolgreicher Wisskomm-

Blog und eine Diskussionsplattform mit einer Reihe von (Online-) Veranstaltungen mit weiter Sichtbarkeit entwickelt. Um den Ansatz einer evidenzbasierten und gleichzeitig wirkungsvollen Kommunikation auch auf andere Bereiche des Nachhaltigkeitsdiskurses zu erweitern, haben wir den Verein „[Öko-Progressives Netzwerk e.V.](#)“ gegründet, der sich unter dem Motto „Nachhaltigkeit ohne 'früher war alles besser'“ auf breiter Basis mit Themen wie Biotechnologie, Bioökonomie oder Landnutzung beschäftigt. Auf diese Weise sind sehr unterschiedliche Menschen zusammengekommen, mit verschiedenen fachlichen und politischen Hintergründen, vom Mitglied der Grünen Jugend bis zur konventionellen Landwirtin.

Dieses Beispiel zeigt, dass die sozialen Medien trotz des Risikos „abgeschlossener Blasen“ auch geeignet sind, unterschiedliche Menschen zusammenzubringen. Wichtig dafür ist, selbst offen zu bleiben. Wissenschaftskommunikation verstehe ich als Dialog. Es geht mir nicht darum, nur einseitig über meine Arbeit zu berichten, sondern mit Menschen über meine Forschung ins Gespräch zu kommen und so auch Rückmeldungen zu erhalten, die mir dabei helfen, die eigene Arbeit zu hinterfragen und damit besser zu machen – vor allem, wenn es um die gesellschaftliche Verantwortung der Forschung geht. Dabei helfen vielfältige Interaktionen und Reflektionen, um neue Perspektiven und „die andere Seite“ kennenzulernen. Daraus ergeben sich oftmals konstruktive Austausche, auch und gerade mit Menschen, die sonst eher gentechnikkritisch sozialisiert sind. Besonders hilfreich ist es dabei, nicht das Trennende zu suchen, sondern stattdessen gemeinsame Ziele zu erkennen und auch zu akzeptieren, dass unterschiedliche Wege dorthin beschritten werden können. So kann jede und jeder im Rahmen der eigenen Kompetenzen und Fähigkeiten das beitragen, was uns diesen Zielen näherbringt. Für eine nachhaltigere Landwirtschaft sind dies sowohl gentechnische Züchtungsmethoden als auch nachhaltige ackerbauliche Praktiken, die heute vielleicht vor allem im Ökolandbau etabliert sind. Durch kluge Kombination solcher unterschiedlichen Ansätze kommen wir insgesamt deutlich weiter, als durch gegenseitiges Behindern.

Zum Schluss dieses kleinen Exkurses möchte ich für Freude an der Kommunikation plädieren. Ja, als Forschende haben wir die Verantwortung, unsere Arbeiten verständlich zu erklären und damit die Gesellschaft frühzeitig am Fortschritt teilhaben zu lassen. Meiner Meinung nach bedeutet dies jedoch nicht, dass jede und jeder auch selbst öffentlich kommunizieren muss. Aber die eigene Arbeit vor diesem Aspekt zu reflektieren und gegebenenfalls zusammen mit professionellen Kommunikatorinnen und Kommunikatoren aufzuarbeiten, kann bereits ein erster Schritt sein. Wer den nächsten Schritt gehen möchte, sollte mit einem gewissen Spaß in die Kommunikation einsteigen. So wird Wisskomm nicht zu einer zusätzlichen Verpflichtung im davon ohnehin schon überfrachteten Forschungsalltag, sondern zu einer sinnvollen und bereichernden Ergänzung der eigentlichen Arbeit.

7.2. Ausgewählte Beispiele aus der Wissenschaftskommunikation

Worauf die zuvor beschriebenen Erfahrungen mit der Wissenschaftskommunikation zur Grünen Gentechnik beruhen, möchte ich im Folgenden anhand einiger ausgewählter Beispiele veranschaulichen. Für die digitale Version dieser Arbeit sind die Beiträge direkt im Text [verlinkt](#). Die Links sind zusätzlich im Anhang unter 10.4 zu finden.

7.2.1. Soziale Medien

Seit Januar 2017 betreibe ich den Twitter-Account „[@ForscherRobert](#)“ mit kurzen Informationen, Kommentaren und Diskussionen zu Grüner Gentechnik, Pflanzenzüchtung und Landwirtschaft. Die Plattform dient außerdem der Vernetzung und ist Ursprung vieler anderer Wisskomm-Aktivitäten, die hier kurz vorgestellt werden. Der Account hat derzeit gut 4700 Follower (Stand: Juli 2022).

Darüber hinaus habe ich an weiteren Aktivitäten in sozialen Medien mitgewirkt, wie dem YouTube-Projekt „[erforschtCRISPR](#)“, in Videos mit [transgen.de](#) oder bei den „[Biopionieren](#)“ sowie bei der Co-Betreuung der Facebook- und Twitter-Auftritte des IPK Gatersleben.

7.2.2. *Vorträge, Führungen und Tage der offenen Tür*

Etwa gleichzeitig mit Twitter begann ich auch im realen Leben mit Führungen von Besuchergruppen (von Schüler- über Studenten- bis hin zu Seniorengruppen) Einblicke in die praktische Laborarbeit und die theoretischen Hintergründe der Genomeditierung zu geben. Der am Institut fest etablierte jährliche Tag der offenen Tür gab hier weitere Möglichkeiten, diese Arbeiten vor Ort vorzustellen.

Für externe Vorträge und Diskussionen war ich unter anderem an Schulen (Gymnasium Aschersleben, Gymnasium Ballenstedt), an Universitäten (Uni Mainz, Uni Halle, Uni Hannover, Uni Würzburg) oder auf landwirtschaftlichen Veranstaltungen (Straubing, Waldenburg, Wittenberg).

7.2.3. *Politikberatung*

Vor allem bedingt durch die innerparteiliche Diskussion zum Umgang mit Grüner Gentechnik bei Bündnis90/ Die Grünen gab es immer wieder Einladungen und Anfragen, die Perspektive aus der praktischen Forschung in die politische Diskussion einzubringen. So war ich beim Parteikonvent des Göttinger Kreisverbandes im September 2018 eingeladen und später kam die Göttinger Europa-Abgeordnete Viola von Cramon auch zum „Gegenbesuch“ nach Gatersleben. Darüber hinaus ließ sich die damalige Landesvorsitzende der [Grünen in Sachsen-Anhalt](#) durch unsere Labore und Gewächshäuser führen.

Nicht um Grüne Gentechnik, sondern um gute Wissenschaftskommunikation, ihre Bedeutung und ihre Verbesserung ging es bei der vom Bundesministerium für Bildung und Forschung einberufenen Denkwerkstatt „[FactoryWissskomm](#)“. Über 150 Teilnehmerinnen und Teilnehmer aus Kommunikation und Forschung sowie die Präsidenten der großen deutschen Wissenschaftsorganisationen diskutierten in verschiedenen Arbeitsgruppen über mehrere Monate, wie die Wissenschaftskommunikation in Deutschland gestärkt werden kann und veröffentlichten am Ende konkrete [Handlungsempfehlungen](#) für Politik und Wissenschaft. Ich habe dabei in der Arbeitsgruppe „Kompetenzaufbau“ mitgewirkt.

7.2.4. *Medien*

Im Zuge der zunehmenden Berichterstattung zu „CRISPR & Co.“ kam es immer wieder auch zu Anfragen unterschiedlicher Medien, von Zeitungen, Radio und Fernsehen, sowohl über das Institut als auch über direkte Twitter-Kontakte.

Beim ersten Radio-Interview stand die Journalistin plötzlich mit Jochen im Labor und hielt mir das Mikrofon hin. Dies wurde später Teil eines 30-minütigen Stücks für [SWR2 Wissen](#). Weitere Interviews gab es bei [Deutschlandfunk Kultur](#) und im [Deutschlandfunk](#).

Auch klassische Print-Medien oder ihre Online-Ableger berichteten über unsere Arbeit, wie die [Mitteldeutsche Zeitung](#), das [Leibniz-Magazin](#) oder [ZEITonline](#) mit einer ausführlichen Reportage. Im Fernsehen wurde das Thema Genomeditierung bei Pflanzen ebenfalls vielfach aufgegriffen und sowohl klassische Wissenschaftsendungen wie [W wie Wissen](#), aber auch Nachrichtenformate wie das [ZDF heute-journal update](#) waren in Gatersleben zu Gast.

Ganz besonders gefreut habe ich mich, das Team um die Wissenschaftsjournalistin Mai Thi Nguyen-Kim für ihre Sendung MaiThinkX zum Thema [Grüne Gentechnik](#) fachlich beraten zu können. Nach der Aufzeichnung der Sendung war ich außerdem im Experten-Talk „[Ask Mai Anything](#)“ zu Gast und habe gemeinsam mit Mai Thi die Fragen des Studiopublikums beantwortet.

8. Fazit und Ausblick

Genetische Veränderungen sind die Grundlage von Evolution, Domestikation und Züchtung. Mithilfe immer vielfältigerer Methoden wie Auslese, Kreuzung, Biotechnologie und Mutagenese haben Forschende sowie Pflanzenzüchterinnen und -züchter in den vergangenen Jahrhunderten die genetische Diversität von Kulturpflanzen vergrößert und genutzt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Potentiale von Genomeditierung bei Gerste (*Hordeum vulgare* L.) am Beispiel der Etablierung von Virusresistenzen untersucht und weiterentwickelt. Durch gezielte Modifikation von *HvPDIL5-1* und *HvEIF4E* konnten BaMMV-resistente Gerstenlinien generiert werden. Mit dem Einsatz von Baseneditierung wurden außerdem neue Allele von *HvEIF4E* erzeugt, die die resistenzvermittelnden Eigenschaften bestenfalls mit gleichbleibendem Ertragspotential verbinden. Dies muss in folgenden Untersuchungen ermittelt werden.

Die Methoden der Genomeditierung können eine wichtige Ergänzung des pflanzenzüchterischen Werkzeugkastens sein. In Kombination mit Genomsequenzierung und Hochdurchsatzphänotypisierung lassen sich Gene und ihre vorteilhaften Allele immer schneller identifizieren. Mittels Genomeditierung hält auch die Nutzbarmachung dieser genetischen Ressourcen für die Züchtung damit Schritt und kann so einen Beitrag für resilientere Nutzpflanzen für eine nachhaltige Landwirtschaft leisten. Diesem Potential stehen jedoch noch einige Herausforderungen gegenüber, wie beispielsweise eine höhere Präzision, insbesondere im Hinblick auf die Vorhersagbarkeit der aus der Editierung resultierenden Sequenz, sowie eine Verringerung der Genotypenabhängigkeit der notwendigen Zellkulturtechniken, um Genomeditierung möglichst flexibel in zahlreichen Kulturarten sowie in unterschiedlichen Genotypen innerhalb der jeweiligen Arten nutzen zu können.

Um das Potential der Genomeditierung in die Anwendung bringen zu können, braucht es gesellschaftliche Akzeptanz für den Einsatz dieser Techniken in der Züchtung und auf dem Feld. Gute Wissenschaftskommunikation aus der Forschung selbst heraus kann einen Beitrag dazu leisten. So können hoffentlich bald Innovationen aus der Pflanzenbiotechnologie ihren Anteil zu einer nachhaltigeren Landwirtschaft beitragen.

9. Literaturverzeichnis für die Kapitel 1 und 6

- Adams, M.J., J.F. Antoniw, C.M. Fauquet, 2005:** Molecular criteria for genus and species discrimination within the family *Potyviridae*. *Archives of Virology* **150** (3), 459–479, DOI: 10.1007/s00705-004-0440-6.
- Ahmad, S., L. Tang, R. Shahzad, A.M. Mawia, G.S. Rao, S. Jamil, C. Wei, Z. Sheng, G. Shao, X. Wei, P. Hu, M.M. Mahfouz, S. Hu, S. Tang, 2021:** CRISPR-based crop improvements: a way forward to achieve zero hunger. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **69** (30), 8307–8323, DOI: 10.1021/acs.jafc.1c02653.
- Ala-Poikela, M., E. Goytia, T. Haikonen, M.-L. Rajamäki, J.P.T. Valkonen, 2011:** Helper component proteinase of the genus *Potyvirus* is an interaction partner of translation initiation factors eIF(iso)4E and eIF4E and contains a 4E binding motif. *Journal of Virology* **85** (13), 6784–6794, DOI: 10.1128/JVI.00485-11.
- Alqudah, A.M., A. Sallam, P. Stephen Baenziger, A. Börner, 2020:** GWAS: Fast-forwarding gene identification and characterization in temperate cereals: lessons from Barley - a review. *Journal of Advanced Research* **22**, 119–135, DOI: 10.1016/j.jare.2019.10.013.
- Anzalone, A.V., P.B. Randolph, J.R. Davis, A.A. Sousa, L.W. Koblan, J.M. Levy, P.J. Chen, C. Wilson, G.A. Newby, A. Raguram, D.R. Liu, 2019:** Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature* **576** (7785), 149–157, DOI: 10.1038/s41586-019-1711-4.
- Barrangou, R., C. Fremaux, H. Deveau, M. Richards, P. Boyaval, S. Moineau, D.A. Romero, P. Horvath, 2007:** CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* **315** (5819), 1709–1712, DOI: 10.1126/science.1138140.
- Bastet, A., D. Zafirov, N. Giovinazzo, A. Guyon-Debast, F. Nogué, C. Robaglia, J.-L. Gallois, 2019:** Mimicking natural polymorphism in *eIF4E* by CRISPR-Cas9 base editing is associated with resistance to potyviruses. *Plant Biotechnology Journal* **17** (9), 1736–1750, DOI: 10.1111/pbi.13096.
- Bateson, W., 1902:** Mendel's principles of heredity: a defence.
- Becker, D., R. Brettschneider, H. Lörz, 1994:** Fertile transgenic wheat from microprojectile bombardment of scutellar tissue. *The Plant Journal* **5** (2), 299–307, DOI: 10.1046/j.1365-313x.1994.05020299.x.
- Boch, J., H. Scholze, S. Schornack, A. Landgraf, S. Hahn, S. Kay, T. Lahaye, A. Nickstadt, U. Bonas, 2009:** Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science* **326** (5959), 1509–1512, DOI: 10.1126/science.1178811.
- Bolotin, A., B. Quinquis, A. Sorokin, S.D. Ehrlich, 2005:** Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology* **151** (Pt 8), 2551–2561, DOI: 10.1099/mic.0.28048-0.
- Bonas, U., R.E. Stall, B. Staskawicz, 1989:** Genetic and structural characterization of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Molecular & General Genetics* **218** (1), 127–136, DOI: 10.1007/BF00330575.
- Budhagatapalli, N., T. Halbach, S. Hiekel, H. Büchner, A.E. Müller, J. Kumlehn, 2020:** Site-directed mutagenesis in bread and durum Wheat via pollination by *cas9*/guide RNA-

- transgenic maize used as haploidy inducer. *Plant Biotechnology Journal* **18** (12), 2376–2378, DOI: 10.1111/pbi.13415.
- Bundessortenamt, 2021:** Beschreibende Sortenliste: Getreide, Mais, Öl- und Faserpflanzen, Leguminosen, Rüben, Zwischenfrüchte, URL: <https://www.bundessortenamt.de/bsa/sorten/beschreibende-sortenlisten/download-bsl-im-pdf-format>. Zugriff: 26. Mai 2022.
- Čermák, T., N.J. Baltes, R. Čegan, Y. Zhang, D.F. Voytas, 2015:** High-frequency, precise modification of the Tomato genome. *Genome Biology* **16**, 232, DOI: 10.1186/s13059-015-0796-9.
- Chandrasegaran, S., D. Carroll, 2016:** Origins of programmable nucleases for Genome Engineering. *Journal of Molecular Biology* **428** (5 Pt B), 963–989, DOI: 10.1016/j.jmb.2015.10.014.
- Chen, J., S. Li, Y. He, J. Li, L. Xia, 2022:** An update on precision Genome Editing by homology-directed repair in plants. *Plant Physiology* **188** (4), 1780–1794, DOI: 10.1093/plphys/kiac037.
- Cheng, M., J.E. Fry, S. Pang, H. Zhou, C.M. Hironaka, D.R. Duncan, T.W. Conner, Y. Wan, 1997:** Genetic transformation of Wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiology* **115** (3), 971–980, DOI: 10.1104/pp.115.3.971.
- Christian, M., T. Cermak, E.L. Doyle, C. Schmidt, F. Zhang, A. Hummel, A.J. Bogdanove, D.F. Voytas, 2010:** Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics* **186** (2), 757–761, DOI: 10.1534/genetics.110.120717.
- Colbert, T., B.J. Till, R. Tompa, S. Reynolds, M.N. Steine, A.T. Yeung, C.M. McCallum, L. Comai, S. Henikoff, 2001:** High-throughput screening for induced point mutations. *Plant Physiology* **126** (2), 480–484, DOI: 10.1104/pp.126.2.480.
- Cong, L., F.A. Ran, D. Cox, S. Lin, R. Barretto, N. Habib, P.D. Hsu, X. Wu, W. Jiang, L.A. Marraffini, F. Zhang, 2013:** Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* **339** (6121), 819–823, DOI: 10.1126/science.1231143.
- de Vries, H., 1901:** Die Mutationstheorie: Versuche und Beobachtungen über die Entstehung von Arten im Pflanzenreich. Veit & Comp.
- Delaux, P.-M., S. Schornack, 2021:** Plant evolution driven by interactions with symbiotic and pathogenic microbes. *Science* **371** (6531), DOI: 10.1126/science.aba6605.
- Dirzo, R., P.H. Raven, 2003:** Global state of biodiversity and loss. *Annual Review of Environment and Resources* **28** (1), 137–167, DOI: 10.1146/annurev.energy.28.050302.105532.
- Drews, G., G. Adam, C. Heinze, 2004:** Molekulare Pflanzenvirologie. Springer.
- Dunwell, J.M., 2010:** Haploids in flowering plants: origins and exploitation. *Plant Biotechnology Journal* **8** (4), 377–424, DOI: 10.1111/j.1467-7652.2009.00498.x.
- Duprat, A., C. Caranta, F. Revers, B. Menand, K.S. Browning, C. Robaglia, 2002:** The *Arabidopsis* eukaryotic initiation factor (iso)4E is dispensable for plant growth but required for susceptibility to potyviruses. *The Plant Journal* **32** (6), 927–934, DOI: 10.1046/j.1365-313x.2002.01481.x.
- Endo, M., M. Mikami, S. Toki, 2016:** Biallelic gene targeting in rice. *Plant Physiology* **170** (2), 667–677, DOI: 10.1104/pp.15.01663.

- Estes, A.P., M.K. Brakke, 1966:** Correlation of *Polymyxa graminis* with transmission of soil-borne Wheat mosaic virus. *Virology* **28** (4), 772–774, DOI: 10.1016/0042-6822(66)90266-2.
- FAOSTAT, 2022:** Agricultural Statistics, URL: <https://www.fao.org/faostat/en/>. Zugriff: 2. Juni 2022.
- Fuchs, M., 2017:** Pyramiding resistance-conferring gene sequences in crops. *Current Opinion in Virology* **26**, 36–42, DOI: 10.1016/j.coviro.2017.07.004.
- Gasiunas, G., R. Barrangou, P. Horvath, V. Siksnys, 2012:** Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109** (39), E2579-86, DOI: 10.1073/pnas.1208507109.
- Gayon, J., 2016:** From Mendel to epigenetics: history of genetics. *Comptes Rendus Biologies* **339** (7-8), 225–230, DOI: 10.1016/j.crv.2016.05.009.
- Gibbs, A.J., M. Hajizadeh, K. Ohshima, R.A.C. Jones, 2020:** The potyviruses: an evolutionary synthesis is emerging. *Viruses* **12** (2), DOI: 10.3390/v12020132.
- Gill, S.S., N.A. Anjum, R. Gill, M. Jha, N. Tuteja, 2015:** DNA damage and repair in plants under ultraviolet and ionizing radiations. *The Scientific World Journal* **2015**, 250158, DOI: 10.1155/2015/250158.
- Gomez, M.A., Z.D. Lin, T. Moll, R.D. Chauhan, L. Hayden, K. Renninger, G. Beyene, N.J. Taylor, J.C. Carrington, B.J. Staskawicz, R.S. Bart, 2019:** Simultaneous CRISPR/Cas9-mediated editing of Cassava *eIF4E* isoforms *nCBP-1* and *nCBP-2* reduces cassava brown streak disease symptom severity and incidence. *Plant Biotechnology Journal* **17** (2), 421–434, DOI: 10.1111/pbi.12987.
- Gottwald, S., P. Bauer, T. Komatsuda, U. Lundqvist, N. Stein, 2009:** TILLING in the two-rowed Barley cultivar 'Barke' reveals preferred sites of functional diversity in the gene *HvHox1*. *BMC Research Notes* **2**, 258, DOI: 10.1186/1756-0500-2-258.
- Graner, A., E. Bauer, A. Kellermann, Proeseler, G. Wenzel, F. Ordon, 1995:** RFLP analysis of resistance to the Barley yellow mosaic virus complex. *Agronomie* **15** (7-8), 475–479, DOI: 10.1051/agro:19950716.
- Guha, S., S.C. Maheshwari, 1964:** *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura*. *Nature* **204** (4957), 497, DOI: 10.1038/204497a0.
- Haas, M., M. Schreiber, M. Mascher, 2019:** Domestication and crop evolution of Wheat and Barley: genes, genomics, and future directions. *Journal of Integrative Plant Biology* **61** (3), 204–225, DOI: 10.1111/jipb.12737.
- Habekuss, A., T. Kühne, I. Krämer, F. Rabenstein, F. Ehrig, B. Ruge-Wehling, W. Huth, F. Ordon, 2007:** Identification of Barley mild mosaic virus Isolates in Germany breaking *rym5* resistance. *Journal of Phytopathology* **156**, 36-41, DOI: 10.1111/j.1439-0434.2007.01324.x.
- Haberlandt, G., 1902:** Culturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. *Sitzungsberichte der kaiserlichen Akademie der Wissenschaften* **CXI** (1).
- Han, G.-Z., 2019:** Origin and evolution of the plant immune system. *The New Phytologist* **222** (1), 70–83, DOI: 10.1111/nph.15596.

- Hariri, D., M. Meyer, H. Prud'homme, 2003:** Characterization of a new Barley mild mosaic virus pathotype in France. *European Journal of Plant Pathology* **109** (9), 921–928, DOI: 10.1023/B:EJPP.0000003663.32298.f4.
- Hasan, N., S. Choudhary, N. Naaz, N. Sharma, R.A. Laskar, 2021:** Recent advancements in molecular marker-assisted selection and applications in plant breeding programmes. *Journal of Genetic Engineering & Biotechnology* **19** (1), 128, DOI: 10.1186/s43141-021-00231-1.
- Haun, W., A. Coffman, B.M. Clasen, Z.L. Demorest, A. Lowy, E. Ray, A. Retterath, T. Stoddard, A. Juillerat, F. Cedrone, L. Mathis, D.F. Voytas, F. Zhang, 2014:** Improved Soybean oil quality by targeted mutagenesis of the fatty acid desaturase 2 gene family. *Plant Biotechnology Journal* **12** (7), 934–940, DOI: 10.1111/pbi.12201.
- Hensel, G., 2020:** Genetic transformation of *Triticeae* cereals - summary of almost three-decade's development. *Biotechnology Advances* **40**, 107484, DOI: 10.1016/j.biotechadv.2019.107484.
- Hensel, G., V. Valkov, J. Middlefell-Williams, J. Kumlehn, 2008:** Efficient generation of transgenic Barley: the way forward to modulate plant-microbe interactions. *Journal of Plant Physiology* **165** (1), 71–82, DOI: 10.1016/j.jplph.2007.06.015.
- Hernalsteens, J.-P., F. van Vliet, M. de Beuckeleer, A. Depicker, G. Engler, M. Lemmers, M. Holsters, M. van Montagu, J. Schell, 1980:** The *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid as a host vector system for introducing foreign DNA in plant cells. *Nature* **287** (5783), 654–656, DOI: 10.1038/287654a0.
- Hernandez, J., B. Meints, P. Hayes, 2020:** Introgression breeding in Barley: perspectives and case studies. *Frontiers in Plant Science* **11**, 761, DOI: 10.3389/fpls.2020.00761.
- Herrera-Estrella, L., A. Depicker, M. van Montagu, J. Schell, 1983:** Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector. *Nature* **303** (5914), 209–213, DOI: 10.1038/303209a0.
- Hillman, B.I., 1998:** Introduction to plant virology. *Methods in Molecular Biology* **81**, 3–12, DOI: 10.1385/0-89603-385-6:3.
- Hipper, C., V. Brault, V. Ziegler-Graff, F. Revers, 2013:** Viral and cellular factors involved in phloem transport of plant viruses. *Frontiers in Plant Science* **4**, 154, DOI: 10.3389/fpls.2013.00154.
- Hisano, H., F. Abe, R.E. Hoffie, J. Kumlehn, 2021:** Targeted genome modifications in cereal crops. *Breeding Science* **71** (4), 405–416, DOI: 10.1270/jsbbs.21019.
- Ho, K.M., G.E. Jones, 1980:** Mingo Barley. *Canadian Journal of Plant Science* **60** (1), 279–280, DOI: 10.4141/cjps80-041.
- Hofinger, B.J., J.R. Russell, C.G. Bass, T. Baldwin, M. dos Reis, P.E. Hedley, Y. Li, M. Macaulay, R. Waugh, K.E. Hammond-Kosack, K. Kanyuka, 2011:** An exceptionally high nucleotide and haplotype diversity and a signature of positive selection for the *eIF4E* resistance gene in Barley are revealed by allele mining and phylogenetic analyses of natural populations. *Molecular Ecology* **20** (17), 3653–3668, DOI: 10.1111/j.1365-294X.2011.05201.x.
- Huth, W., D. Lesemann, 1978:** Eine für die Bundesrepublik neue Virose an Wintergerste. *Nachrichtenblatt Deutscher Pflanzenschutzdienst* **30** (12), 184–185.
- IAEA, 2022:** Mutant Variety Database, URL: <https://nucleus.iaea.org/sites/mvd/SitePages/Home.aspx>. Zugriff: 5. Mai 2022.

- ISAAA, 2022:** GM Approval Database, URL: <https://www.isaaa.org/gmaprovaldatabase/default.asp>. Zugriff: 23. Juni 2022.
- Ishino, Y., M. Krupovic, P. Forterre, 2018:** History of CRISPR-Cas from encounter with a mysterious repeated sequence to Genome Editing technology. *Journal of Bacteriology* **200** (7), DOI: 10.1128/JB.00580-17.
- Ishino, Y., H. Shinagawa, K. Makino, M. Amemura, A. Nakata, 1987:** Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of Bacteriology* **169** (12), 5429–5433, DOI: 10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987.
- Ivanov, K.I., K. Eskelin, A. Lõhmus, K. Mäkinen, 2014:** Molecular and cellular mechanisms underlying potyvirus infection. *The Journal of General Virology* **95** (Pt 7), 1415–1429, DOI: 10.1099/vir.0.064220-0.
- Jacquier, N.M.A., L.M. Gilles, J.-P. Martinant, P.M. Rogowsky, T. Widiez, 2021:** Maize in planta haploid inducer lines: a cornerstone for doubled haploid technology. *Methods in Molecular Biology* **2288**, 25–48, DOI: 10.1007/978-1-0716-1335-1_2.
- Jansen, R., J.D.A. van Embden, W. Gaastra, L.M. Schouls, 2002:** Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology* **43** (6), 1565–1575, DOI: 10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x.
- Jayakodi, M., S. Padmarasu, G. Haberer, V.S. Bonthala, H. Gundlach, C. Monat, T. Lux, N. Kamal, D. Lang, A. Himmelbach, J. Ens, X.-Q. Zhang, T.T. Angessa, G. Zhou, C. Tan, C. Hill, P. Wang, M. Schreiber, L.B. Boston, C. Plott et al., 2020:** The Barley pan-genome reveals the hidden legacy of mutation breeding. *Nature* **588** (7837), 284–289, DOI: 10.1038/s41586-020-2947-8.
- Jiang, C., J. Kan, F. Ordon, D. Perovic, P. Yang, 2020a:** *Bymovirus*-induced yellow mosaic diseases in Barley and Wheat: viruses, genetic resistances and functional aspects. *Theoretical and Applied Genetics* **133** (5), 1623–1640, DOI: 10.1007/s00122-020-03555-7.
- Jiang, J., J.-F. Laliberté, 2011:** The genome-linked protein VPg of plant viruses—a protein with many partners. *Current Opinion in Virology* **1** (5), 347–354, DOI: 10.1016/j.coviro.2011.09.010.
- Jiang, Y.-Y., Y.-P. Chai, M.-H. Lu, X.-L. Han, Q. Lin, Y. Zhang, Q. Zhang, Y. Zhou, X.-C. Wang, C. Gao, Q.-J. Chen, 2020b:** Prime editing efficiently generates W542L and S621I double mutations in two *ALS* genes in Maize. *Genome Biology* **21** (1), 257, DOI: 10.1186/s13059-020-02170-5.
- Jinek, M., K. Chylinski, I. Fonfara, M. Hauer, J.A. Doudna, E. Charpentier, 2012:** A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* **337** (6096), 816–821, DOI: 10.1126/science.1225829.
- Jung, C., B. Till, 2021:** Mutagenesis and genome editing in crop improvement: perspectives for the global regulatory landscape. *Trends in Plant Science* **26** (12), 1258–1269, DOI: 10.1016/j.tplants.2021.08.002.
- Kalinina, N.O., A. Khromov, A.J. Love, M.E. Taliansky, 2020:** CRISPR applications in plant virology: virus resistance and beyond. *Phytopathology* **110** (1), 18–28, DOI: 10.1094/PHYTO-07-19-0267-IA.

- Kaneko, Y., S.W. Bang, 2014:** Interspecific and intergeneric hybridization and chromosomal engineering of *Brassicaceae* crops. *Breeding Science* **64** (1), 14–22, DOI: 10.1270/jsbbs.64.14.
- Kanyuka, K., A. Druka, D.G. Caldwell, A. Tymon, N. McCallum, R. Waugh, M.J. Adams, 2005:** Evidence that the recessive *Bymovirus* resistance locus *rym4* in barley corresponds to the *eukaryotic translation initiation factor 4E* gene. *Molecular Plant Pathology* **6** (4), 449–458, DOI: 10.1111/j.1364-3703.2005.00294.x.
- Kay, S., S. Hahn, E. Marois, G. Hause, U. Bonas, 2007:** A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator. *Science* **318** (5850), 648–651, DOI: 10.1126/science.1144956.
- Kim, Y.G., J. Cha, S. Chandrasegaran, 1996:** Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to *Fok* I cleavage domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93** (3), 1156–1160, DOI: 10.1073/pnas.93.3.1156.
- Knuhtsen, H., E. Hiebert, D.E. Purcifull, 1974:** Partial purification and some properties of Tobacco etch virus induced intranuclear inclusions. *Virology* **61** (1), 200–209, DOI: 10.1016/0042-6822(74)90254-2.
- Kohli, E., S. Causse, V. Baverel, L. Dubrez, N. Borges-Bonan, O. Demidov, C. Garrido, 2021:** Endoplasmic reticulum chaperones in viral infection: therapeutic perspectives. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **85** (4), e0003521, DOI: 10.1128/MMBR.00035-21.
- Komari, T., Y. Hiei, Y. Saito, N. Murai, T. Kumashiro, 1996:** Vectors carrying two separate T-DNAs for co-transformation of higher plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and segregation of transformants free from selection markers. *The Plant Journal* **10** (1), 165–174, DOI: 10.1046/j.1365-313x.1996.10010165.x.
- Kühne, T., 2009:** Soil-borne viruses affecting cereals: known for long but still a threat. *Virus Research* **141** (2), 174–183, DOI: 10.1016/j.virusres.2008.05.019.
- Kulturpflanzen: Botanik - Geschichte - Perspektiven, **2014**. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg, 263 S., ISBN: 978-3-642-55292-2.
- Kumlehn, J., G. Hensel, 2009:** Genetic transformation technology in the *Triticeae*. *Breeding Science* **59** (5), 553–560, DOI: 10.1270/jsbbs.59.553.
- Kumlehn, J., L. Serazetdinova, G. Hensel, D. Becker, H. Loerz, 2006:** Genetic transformation of Barley (*Hordeum vulgare* L.) via infection of androgenetic pollen cultures with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Biotechnology Journal* **4** (2), 251–261, DOI: 10.1111/j.1467-7652.2005.00178.x.
- Kusch, S., R. Panstruga, 2017:** *mlo*-based resistance: an apparently universal "weapon" to defeat powdery mildew disease. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **30** (3), 179–189, DOI: 10.1094/MPMI-12-16-0255-CR.
- Laibach, F., 1929:** Ectogenesis in plants: Methods and genetic possibilities of propagating embryos otherwise dying in the seed. *Journal of Heredity* **20** (5), 201–208, DOI: 10.1093/oxfordjournals.jhered.a103178.
- Landesanstalt für Landwirtschaft Bayern, 2022:** Abstammungskatalog Gerste, URL: <https://www.lfl.bayern.de/ipz/getreide/020389/index.php>. Zugriff: 6. Mai 2022.

- Lellis, A.D., K.D. Kasschau, S.A. Whitham, J.C. Carrington, 2002:** Loss-of-susceptibility mutants of *Arabidopsis thaliana* reveal an essential role for eIF(iso)4E during potyvirus infection. *Current Biology* **12** (12), 1046–1051, DOI: 10.1016/S0960-9822(02)00898-9.
- Léonard, S., D. Plante, S. Wittmann, N. Daigneault, M.G. Fortin, J.F. Laliberté, 2000:** Complex formation between potyvirus VPg and translation eukaryotic initiation factor 4E correlates with virus infectivity. *Journal of Virology* **74** (17), 7730–7737, DOI: 10.1128/jvi.74.17.7730-7737.2000.
- Li, H., H. Kondo, T. Kühne, Y. Shirako, 2016:** Barley yellow mosaic virus VPg is the determinant protein for breaking eIF4E-mediated recessive resistance in Barley plants. *Frontiers in Plant Science* **7**, 1449, DOI: 10.3389/fpls.2016.01449.
- Li, H., Y. Shirako, 2015:** Association of VPg and eIF4E in the host tropism at the cellular level of Barley yellow mosaic virus and Wheat yellow mosaic virus in the genus *Bymovirus*. *Virology* **476**, 159–167, DOI: 10.1016/j.virol.2014.12.010.
- Li, L., L.P. Wu, S. Chandrasegaran, 1992:** Functional domains in *Fok* I restriction endonuclease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89** (10), 4275–4279, DOI: 10.1073/pnas.89.10.4275.
- Lin, Q., Y. Zong, C. Xue, S. Wang, S. Jin, Z. Zhu, Y. Wang, A.V. Anzalone, A. Raguram, J.L. Doman, D.R. Liu, C. Gao, 2020:** Prime genome editing in Rice and Wheat. *Nature Biotechnology* **38** (5), 582–585, DOI: 10.1038/s41587-020-0455-x.
- Liu, G., Q. Lin, S. Jin, C. Gao, 2022:** The CRISPR-Cas toolbox and gene editing technologies. *Molecular Cell* **82** (2), 333–347, DOI: 10.1016/j.molcel.2021.12.002.
- Lu, Y., Y. Tian, R. Shen, Q. Yao, D. Zhong, X. Zhang, J.-K. Zhu, 2021:** Precise genome modification in Tomato using an improved prime editing system. *Plant Biotechnology Journal* **19** (3), 415–417, DOI: 10.1111/pbi.13497.
- Lutze, L.H., J.E. Cleaver, W.F. Morgan, R.A. Winegar, 1993:** Mechanisms involved in rejoining DNA double-strand breaks induced by ionizing radiation and restriction enzymes. *Mutation Research/ Genetic Toxicology* **299** (3-4), 225–232, DOI: 10.1016/0165-1218(93)90099-Y.
- Mahmood, F., R. Xu, M.U.N. Awan, Y. Song, Q. Han, X. Xia, J. Zhang, 2021:** PDIA3: Structure, functions and its potential role in viral infections. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **143**, 112110, DOI: 10.1016/j.biopha.2021.112110.
- Mandadi, K.K., K.-B.G. Scholthof, 2013:** Plant immune responses against viruses: how does a virus cause disease? *The Plant Cell* **25** (5), 1489–1505, DOI: 10.1105/tpc.113.111658.
- Martínez-Ainsworth, N.E., M.I. Tenaillon, 2016:** Superheroes and masterminds of plant domestication. *Comptes Rendus Biologies* **339** (7-8), 268–273, DOI: 10.1016/j.crv.2016.05.005.
- Mayer, K.F.X., R. Waugh, J.W.S. Brown, A. Schulman, P. Langridge, M. Platzer, G.B. Fincher, G.J. Muehlbauer, K. Sato, T.J. Close, R.P. Wise, N. Stein, 2012:** A physical, genetic and functional sequence assembly of the Barley genome. *Nature* **491** (7426), 711–716, DOI: 10.1038/nature11543.
- McCallum, C.M., L. Comai, E.A. Greene, S. Henikoff, 2000:** Targeting induced local lesions IN genomes (TILLING) for plant functional genomics. *Plant Physiology* **123** (2), 439–442, DOI: 10.1104/pp.123.2.439.
- Meinel, A., 2008:** Aufbruch in die wissenschaftliche Pflanzenzüchtung: Der Beitrag von Wilhelm Rimpau (1842-1903). *Vorträge für Pflanzenzüchtung* **76**.

- Mendel, G., 1866:** Versuche über Pflanzen-Hybriden. Verhandlungen des naturforschenden Vereins in Brünn (IV), 3–47.
- Miedaner, T., V. Korzun, 2012:** Marker-assisted selection for disease resistance in Wheat and Barley breeding. *Phytopathology* **102** (6), 560–566, DOI: 10.1094/PHYTO-05-11-0157.
- Miller, J., A.D. McLachlan, A. Klug, 1985:** Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. *The EMBO journal* **4** (6), 1609–1614, DOI: 10.1002/j.1460-2075.1985.tb03825.x.
- Modrzejewski, D., F. Hartung, T. Sprink, D. Krause, C. Kohl, R. Wilhelm, 2019:** What is the available evidence for the range of applications of Genome-Editing as a new tool for plant trait modification and the potential occurrence of associated off-target effects: a systematic map. *Environmental Evidence* **8** (1), DOI: 10.1186/s13750-019-0171-5.
- Mojica, F.J.M., C. Díez-Villaseñor, J. García-Martínez, E. Soria, 2005:** Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of Molecular Evolution* **60** (2), 174–182, DOI: 10.1007/s00239-004-0046-3.
- Moscou, M.J., A.J. Bogdanove, 2009:** A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science* **326** (5959), 1501, DOI: 10.1126/science.1178817.
- Muller, H.J., 1930:** Types of visible variations induced by X-rays in *Drosophila*. *Journal of Genetics* **22** (3), 299–334, DOI: 10.1007/BF02984195.
- Nambiar, T.S., L. Baudrier, P. Billon, A. Ciccía, 2022:** CRISPR-based genome editing through the lens of DNA repair. *Molecular Cell* **82** (2), 348–388, DOI: 10.1016/j.molcel.2021.12.026.
- Nieto, C., M. Morales, G. Orjeda, C. Clepet, A. Monfort, B. Sturbois, P. Puigdomènech, M. Pitrat, M. Caboche, C. Dogimont, J. Garcia-Mas, M.A. Aranda, A. Bendahmane, 2006:** An *eIF4E* allele confers resistance to an uncapped and non-polyadenylated RNA virus in Melon. *The Plant Journal* **48** (3), 452–462, DOI: 10.1111/j.1365-313X.2006.02885.x.
- Nover, E. Schwarzbach, 1971:** Inheritance studies with a mildew resistant Barley mutant. *Barley Genetics Newsletter* **1** (2), 36–37.
- Ordon, F., A. Habekuss, U. Kastirr, F. Rabenstein, T. Kühne, 2009:** Virus resistance in cereals: sources of resistance, genetics and breeding. *Journal of Phytopathology* **157** (9), 535–545, DOI: 10.1111/j.1439-0434.2009.01540.x.
- Ordon, F., A. Schiemann, B. Pellio, V. Dauck, E. Bauer, S. Streng, W. Friedt, A. Graner, 1999:** Application of molecular markers in breeding for resistance to the Barley yellow mosaic virus complex: Einsatzmöglichkeiten molekularer Marker in der Resistenzzüchtung gegen den Gelbmosaikviruskomplex der Gerste. *Journal of Plant Diseases and Protection* **3** (106), 256–264.
- Ossowski, S., K. Schneeberger, J.I. Lucas-Lledó, N. Warthmann, R.M. Clark, R.G. Shaw, D. Weigel, M. Lynch, 2010:** The rate and molecular spectrum of spontaneous mutations in *Arabidopsis thaliana*. *Science* **327** (5961), 92–94, DOI: 10.1126/science.1180677.
- Pallas, V., J.A. García, 2011:** How do plant viruses induce disease? Interactions and interference with host components. *The Journal of General Virology* **92** (Pt 12), 2691–2705, DOI: 10.1099/vir.0.034603-0.
- Palloix, A., V. Ayme, B. Moury, 2009:** Durability of plant major resistance genes to pathogens depends on the genetic background, experimental evidence and consequences for breeding strategies. *The New Phytologist* **183** (1), 190–199, DOI: 10.1111/j.1469-8137.2009.02827.x.

- Pankin, A., M. von Korff, 2017:** Co-evolution of methods and thoughts in cereal domestication studies: a tale of Barley (*Hordeum vulgare*). *Current Opinion in Plant Biology* **36**, 15–21, DOI: 10.1016/j.pbi.2016.12.001.
- Pavletich, N.P., C.O. Pabo, 1991:** Zinc Finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å. *Science* **252** (5007), 809–817, DOI: 10.1126/science.2028256.
- Plessis, A., A. Perrin, J.E. Haber, B. Dujon, 1992:** Site-specific recombination determined by I-SceI, a mitochondrial group I intron-encoded endonuclease expressed in the Yeast nucleus. *Genetics* **130** (3), 451–460, DOI: 10.1093/genetics/130.3.451.
- Pourcel, C., G. Salvignol, G. Vergnaud, 2005:** CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology* **151** (3), 653–663, DOI: 10.1099/mic.0.27437-0.
- Pourkheirandish, M., F. Dai, S. Sakuma, H. Kanamori, A. Distelfeld, G. Willcox, T. Kawahara, T. Matsumoto, B. Kilian, T. Komatsuda, 2017:** On the origin of the non-brittle rachis trait of domesticated Einkorn Wheat. *Frontiers in Plant Science* **8**, 2031, DOI: 10.3389/fpls.2017.02031.
- Pourkheirandish, M., G. Hensel, B. Kilian, N. Senthil, G. Chen, M. Sameri, P. Azhaguvel, S. Sakuma, S. Dhanagond, R. Sharma, M. Mascher, A. Himmelbach, S. Gottwald, S.K. Nair, A. Tagiri, F. Yukuhiro, Y. Nagamura, H. Kanamori, T. Matsumoto, G. Willcox et al., 2015:** Evolution of the grain dispersal system in Barley. *Cell* **162** (3), 527–539, DOI: 10.1016/j.cell.2015.07.002.
- Puchta, H., B. Dujon, B. Hohn, 1993:** Homologous recombination in plant cells is enhanced by in vivo induction of double strand breaks into DNA by a site-specific endonuclease. *Nucleic Acids Research* **21** (22), 5034–5040, DOI: 10.1093/nar/21.22.5034.
- Puchta, H., F. Fauser, 2014:** Synthetic nucleases for genome engineering in plants: prospects for a bright future. *The Plant Journal* **78** (5), 727–741, DOI: 10.1111/tpj.12338.
- Pyott, D.E., E. Sheehan, A. Molnar, 2016:** Engineering of CRISPR/Cas9-mediated potyvirus resistance in transgene-free *Arabidopsis* plants. *Molecular Plant Pathology* **17** (8), 1276–1288, DOI: 10.1111/mpp.12417.
- Qasim, W., H. Zhan, S. Samarasinghe, S. Adams, P. Amrolia, S. Stafford, K. Butler, C. Rivat, G. Wright, K. Somana, S. Ghorashian, D. Pinner, G. Ahsan, K. Gilmour, G. Lucchini, S. Inglott, W. Mifsud, R. Chiesa, K.S. Peggs, L. Chan et al., 2017:** Molecular remission of infant B-ALL after infusion of universal TALEN gene-edited CAR T cells. *Science Translational Medicine* **9** (374), DOI: 10.1126/scitranslmed.aaj2013.
- Ravi, M., S.W.L. Chan, 2010:** Haploid plants produced by centromere-mediated genome elimination. *Nature* **464** (7288), 615–618, DOI: 10.1038/nature08842.
- Revers, F., J.A. García, 2015:** Molecular biology of potyviruses. *Advances in Virus Research* **92**, 101–199, DOI: 10.1016/bs.aivir.2014.11.006.
- Rouet, P., F. Smih, M. Jasin, 1994:** Introduction of double-strand breaks into the genome of mouse cells by expression of a rare-cutting endonuclease. *Molecular and Cellular Biology* **14** (12), 8096–8106, DOI: 10.1128/mcb.14.12.8096-8106.1994.
- Rudin, N., E. Sugarman, J.E. Haber, 1989:** Genetic and physical analysis of double-strand break repair and recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122** (3), 519–534, DOI: 10.1093/genetics/122.3.519.

- Ruffel, S., M.-H. Dussault, A. Palloix, B. Moury, A. Bendahmane, C. Robaglia, C. Caranta, 2002:** A natural recessive resistance gene against Potato virus Y in pepper corresponds to the *eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E)*. *The Plant Journal* **32** (6), 1067–1075, DOI: 10.1046/j.1365-313x.2002.01499.x.
- Sanfaçon, H., 2015:** Plant translation factors and virus resistance. *Viruses* **7** (7), 3392–3419, DOI: 10.3390/v7072778.
- Satpathy, P., S.A. de La Fuente, V. Ott, A. Müller, H. Büchner, D.E.S. Daghma, J. Kumlehn, 2021:** Generation of doubled haploid Barley by interspecific pollination with *Hordeum bulbosum*. *Methods in Molecular Biology* **2287**, 215–226, DOI: 10.1007/978-1-0716-1315-3_10.
- Schiemann, E., 1955:** Emmy Stein. *Der Züchter* **25** (3), 65--67.
- Schmidt, C., P. Fransz, M. Rönspies, S. Dreissig, J. Fuchs, S. Heckmann, A. Houben, H. Puchta, 2020:** Changing local recombination patterns in *Arabidopsis* by CRISPR/Cas mediated chromosome engineering. *Nature Communications* **11** (1), 4418, DOI: 10.1038/s41467-020-18277-z.
- Schmitt-Keichinger, C., 2019:** Manipulating cellular factors to combat viruses: a case study from the plant eukaryotic translation initiation factors eIF4. *Frontiers in Microbiology* **10**, 17, DOI: 10.3389/fmicb.2019.00017.
- Scholthof, K.-B.G., 2004:** Tobacco mosaic virus: a model system for plant biology. *Annual Review of Phytopathology* **42**, 13–34, DOI: 10.1146/annurev.phyto.42.040803.140322.
- Scholthof, K.-B.G., S. Adkins, H. Czosnek, P. Palukaitis, E. Jacquot, T. Hohn, B. Hohn, K. Saunders, T. Candresse, P. Ahlquist, C. Hemenway, G.D. Foster, 2011:** Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* **12** (9), 938–954, DOI: 10.1111/j.1364-3703.2011.00752.x.
- Schreiber, M., A. Barakate, N. Uzrek, M. Macaulay, A. Sourdille, J. Morris, P.E. Hedley, L. Ramsay, R. Waugh, 2019:** A highly mutagenised Barley (cv. Golden Promise) TILLING population coupled with strategies for screening-by-sequencing. *Plant Methods* **15**, 99, DOI: 10.1186/s13007-019-0486-9.
- Schwarzbach, E., 1967:** Recessive total resistance of Barley to mildew (*Erysiphe graminis* D. C. f. *sp. hordei* Marchal) as a mutation induced by ethylenmethansulfonate. *Genetika A Slechteni* **XL** (3), 159–162.
- Schwarzbach, E., P. Smýkal, O. Dostál, M. Jarkovská, S. Valová, 2014:** Gregor J. Mendel – genetics founding father. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding* **50** (No. 2), 43–51, DOI: 10.17221/54/2014-CJGPB.
- Seguí-Simarro, J.M., N.M.A. Jacquier, T. Widiez, 2021:** Overview of *in vitro* and *in vivo* doubled haploid technologies. *Methods in Molecular Biology* **2287**, 3–22, DOI: 10.1007/978-1-0716-1315-3_1.
- Seol, J.-H., E.Y. Shim, S.E. Lee, 2018:** Microhomology-mediated end joining: Good, bad and ugly. *Mutation research* **809**, 81–87, DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2017.07.002.
- 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, A. Kondo, 2017:** Targeted base editing in Rice and Tomato using a CRISPR-Cas9 cytidine deaminase fusion. *Nature Biotechnology* **35** (5), 441–443, DOI: 10.1038/nbt.3833.

- Shortle, D., P. Grisafi, S.J. Benkovic, D. Botstein, 1982:** Gap misrepair mutagenesis: efficient site-directed induction of transition, transversion, and frameshift mutations *in vitro*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **79** (5), DOI: 10.1073/pnas.79.5.1588.
- Singh, R., K. Kumar, C. Bharadwaj, P.K. Verma, 2022:** Broadening the horizon of crop research: a decade of advancements in plant molecular genetics to divulge phenotype governing genes. *Planta* **255** (2), 46, DOI: 10.1007/s00425-022-03827-0.
- Skoog, F., C.O. Miller, 1957:** Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. Symposia of the Society for Experimental Biology **11**, 118–130.
- Stein, N., D. Perovic, J. Kumlehn, B. Pellio, S. Stracke, S. Streng, F. Ordon, A. Graner, 2005:** The *eukaryotic translation initiation factor 4E* confers multiallelic recessive *Bymovirus* resistance in *Hordeum vulgare* (L.). *The Plant Journal* **42** (6), 912–922, DOI: 10.1111/j.1365-313X.2005.02424.x.
- Stinson, B.M., J.J. Loparo, 2021:** Repair of DNA double-strand breaks by the nonhomologous end joining pathway. *Annual Review of Biochemistry* **90**, 137–164, DOI: 10.1146/annurev-biochem-080320-110356.
- Stubbe, H., 1930:** Untersuchungen über die experimentelle Auslösung von Mutationen bei *Antirrhinum majus*. II. *Zeitschrift für Induktive Abstammungs- und Vererbungslehre* **56** (1), 202–232, DOI: 10.1007/BF01739803.
- Svitashev, S., J.K. Young, C. Schwartz, H. Gao, S.C. Falco, A.M. Cigan, 2015:** Targeted mutagenesis, precise gene editing, and site-specific gene insertion in Maize using Cas9 and guide RNA. *Plant Physiology* **169** (2), 931–945, DOI: 10.1104/pp.15.00793.
- Tavert-Roudet, G., A. Abdul-Razzak, B. Doublet, J. Walter, T. Delaunay, S. German-Retana, T. Michon, O. Le Gall, T. Candresse, 2012:** The C terminus of lettuce mosaic potyvirus cylindrical inclusion helicase interacts with the viral VPg and with Lettuce translation eukaryotic initiation factor 4E. *The Journal of General Virology* **93** (Pt 1), 184–193, DOI: 10.1099/vir.0.035881-0.
- Thorpe, T., 2012:** History of plant tissue culture. *Methods in Molecular Biology* **877**, 9–27, DOI: 10.1007/978-1-61779-818-4_2.
- Thudi, M., R. Palakurthi, J.C. Schnable, A. Chitikineni, S. Dreisigacker, E. Mace, R.K. Srivastava, C.T. Satyavathi, D. Odeny, V.K. Tiwari, H.-M. Lam, Y.B. Hong, V.K. Singh, G. Li, Y. Xu, X. Chen, S. Kaila, H. Nguyen, S. Sivasankar, S.A. Jackson et al., 2021:** Genomic resources in plant breeding for sustainable agriculture. *Journal of Plant Physiology* **257**, 153351, DOI: 10.1016/j.jplph.2020.153351.
- Tian, S., L. Jiang, X. Cui, J. Zhang, S. Guo, M. Li, H. Zhang, Y. Ren, G. Gong, M. Zong, F. Liu, Q. Chen, Y. Xu, 2018:** Engineering herbicide-resistant Watermelon variety through CRISPR/Cas9-mediated base-editing. *Plant Cell Reports* **37** (9), 1353–1356, DOI: 10.1007/s00299-018-2299-0.
- Till, B.J., S. Datta, J. Jankowicz-Cieslak, 2018:** TILLING: the next generation. *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology* **164**, 139–160, DOI: 10.1007/10_2017_54.
- Tingay, S., D. McElroy, R. Kalla, S. Fieg, M. Wang, S. Thornton, R. Brettell, 1997:** *Agrobacterium tumefaciens*-mediated Barley transformation. *The Plant Journal* **11** (6), 1369–1376, DOI: 10.1046/j.1365-313X.1997.11061369.x.

- Turesson, S.D., C.-T. Larsson, F. Ordon, 2021:** Use of molecular markers for doubled haploid technology: from academia to plant breeding companies. In: Segui-Simarro, J.M. (Hrsg.). *Doubled haploid technology: Volume 2: Hot topics, Apiaceae, Brassicaceae, Solanaceae*, New York, NY, Springer US; Imprint Humana, S. 49–72, DOI: 10.1007/978-1-0716-1335-1_3.
- Valli, A.A., A. Gallo, B. Rodamilans, J.J. López-Moya, J.A. García, 2018:** The HCPro from the *Potyviridae* family: an enviable multitasking Helper Component that every virus would like to have. *Molecular Plant Pathology* **19** (3), 744–763, DOI: 10.1111/mpp.12553.
- van Vu, T., D. Thi Hai Doan, J. Kim, Y.W. Sung, M. Thi Tran, Y.J. Song, S. Das, J.-Y. Kim, 2021:** CRISPR/Cas-based precision genome editing via microhomology-mediated end joining. *Plant Biotechnology Journal* **19** (2), 230–239, DOI: 10.1111/pbi.13490.
- Vasil, V., A.C. Hildebrandt, 1965:** Differentiation of Tobacco plants from single, isolated cells in microcultures. *Science* **150** (3698), 889–892, DOI: 10.1126/science.150.3698.889.
- Veillet, F., L. Chauvin, M.-P. Kermarrec, F. Sevestre, M. Merrer, Z. Terret, N. Szydlowski, P. Devaux, J.-L. Gallois, J.-E. Chauvin, 2019a:** The *Solanum tuberosum* *GBSSI* gene: a target for assessing gene and base editing in tetraploid Potato. *Plant Cell Reports* **38** (9), 1065–1080, DOI: 10.1007/s00299-019-02426-w.
- Veillet, F., L. Perrot, L. Chauvin, M.-P. Kermarrec, A. Guyon-Debast, J.-E. Chauvin, F. Nogué, M. Mazier, 2019b:** Transgene-free genome editing in Tomato and Potato plants using *Agrobacterium*-mediated delivery of a CRISPR/Cas9 cytidine base editor. *International Journal of Molecular Sciences* **20** (2), DOI: 10.3390/ijms20020402.
- Wan, Y., P.G. Lemaux, 1994:** Generation of large numbers of independently transformed fertile Barley plants. *Plant Physiology* **104** (1), 37–48, DOI: 10.1104/pp.104.1.37.
- Wang, A., 2021:** Cell-to-cell movement of plant viruses via plasmodesmata: a current perspective on potyviruses. *Current Opinion in Virology* **48**, 10–16, DOI: 10.1016/j.coviro.2021.03.002.
- Werner, K., W. Friedt, F. Ordon, 2005:** Strategies for pyramiding resistance genes against the Barley yellow mosaic virus complex (BaMMV, BaYMV, BaYMV-2). *Molecular Breeding* **16** (1), 45–55, DOI: 10.1007/s11032-005-3445-2.
- White, P.R., A.C. Braun, 1941:** Crown gall production by bacteria-free tumor tissues. *Science* **94** (2436), 239–241, DOI: 10.1126/science.94.2436.239.
- Wittmann, S., H. Chatel, M.G. Fortin, J.F. Laliberté, 1997:** Interaction of the viral protein genome linked of turnip mosaic potyvirus with the translational eukaryotic initiation factor (iso) 4E of *Arabidopsis thaliana* using the Yeast two-hybrid system. *Virology* **234** (1), 84–92, DOI: 10.1006/viro.1997.8634.
- Yang, P., A. Habekuß, B.J. Hofinger, K. Kanyuka, B. Kilian, A. Graner, F. Ordon, N. Stein, 2016:** Sequence diversification in recessive alleles of two host factor genes suggests adaptive selection for *Bymovirus* resistance in cultivated Barley from East Asia. *Theoretical and Applied Genetics* **130** (2), 331–344, DOI: 10.1007/s00122-016-2814-z.
- Yang, P., T. Lüpken, A. Habekuss, G. Hensel, B. Steuernagel, B. Kilian, R. Ariyadasa, A. Himmelbach, J. Kumlehn, U. Scholz, F. Ordon, N. Stein, 2014:** *Protein Disulfide Isomerase Like 5-1* is a susceptibility factor to plant viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111** (6), 2104–2109, DOI: 10.1073/pnas.1320362111.

Yang, S., L. Wang, J. Huang, X. Zhang, Y. Yuan, J.-Q. Chen, L.D. Hurst, D. Tian, 2015: Parent-progeny sequencing indicates higher mutation rates in heterozygotes. *Nature* **523** (7561), 463–467, DOI: 10.1038/nature14649.

Yoon, Y.-J., J. Venkatesh, J.-H. Lee, J. Kim, H.-E. Lee, D.-S. Kim, B.-C. Kang, 2020: Genome Editing of *eIF4E1* in Tomato confers resistance to Pepper mottle virus. *Frontiers in Plant Science* **11**, 1098, DOI: 10.3389/fpls.2020.01098.

Zaenen, I., N. van Larebeke, H. Teuchy, M. van Montagu, J. Schell, 1974: Supercoiled circular DNA in crown-gall inducing *Agrobacterium* strains. *Journal of Molecular Biology* **86** (1), 109–127, DOI: 10.1016/S0022-2836(74)80011-2.

Zhu, G., H. Zhu, 2022: Modified gene editing systems: diverse bioengineering tools and crop improvement. *Frontiers in Plant Science* **13**, 847169, DOI: 10.3389/fpls.2022.847169.

10. Anhang

10.1. Supplementary Material Chapter 3: Targeted Knockout of Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E Confers Bymovirus Resistance in Winter Barley

10.1.1. S1: Sequences, Off-Target Analysis, mutated Alleles

Off-target Analysis:

Target Motif 1

5'-TGGTTCGACAACCCGCAGGGCAAGTCCCGGGCGGT-3'

>Query_1:1-35_alignment_gn1|Hv-Morex3|chr3H:612458327-612458361

TGGTTCGACAACCCGCAGGGCAAGTCCCGGGCGGT

|||||

TGGTTCGACAACCCGCAGGGCAAGTCCCGGGCGGT

>Query_1:1-35_alignment_gn1|HvIgr1|chr3H:617019814-617019848

TGGTTCGACAACCCGCAGGGCAAGTCCCGGGCGGT

|||||

TGGTTCGACAACCCGCAGGGCAAGTCCCGGGCGGT

Target Motif 2

5'-ACCCATTTGTGCCAATGGCGGTAAATGGACCATC-3'

>Query_1:1-35_alignment_gn1|Hv-Morex3|chr3H:612460127-612460161

ACCCATTTGTGCCAATGGCGGTAAATGGACCATC

|||||

ACCCATTTGTGCCAATGGCGGTAAATGGACCATC

>Query_1:1-35_alignment_gn1|HvIgr1|chr3H:617021506-617021540

ACCCATTTGTGCCAATGGCGGTAAATGGACCATC

|||||

ACCCATTTGTGCCAATGGCGGTAAATGGACCATC

>Query_1:1-35_alignment_gn1|Hv-Morex3|chr1H:244446841-244446875

ACCCATTTGTGCCAATGGCGGTAAATGGACCATC

|||||

ACCCATTTGTGCCAATGGTCGTAAATGGACCATC

>Query_1:1-35_alignment_gn1|HvIgr1|chr1H:245488239-245488273

ACCCATTTGTGCCAATGGCGGTAAATGGACCATC

|||||

ACCCATTTGTGCCAATGGTCGTAAATGGACCATC

Target Motif 3

5' -GGAGCAGTCGTCAGCGTGCGTAAGAACCAGGAAAG-3'

>Query_1:1-35_alignment_gn1|Hv-Morex3|chr3H:612460340-612460374
GGAGCAGTCGTCAGCGTGCGTAAGAACCAGGAAAG
|||||
GGAGCAGTCGTCAGCGTGCGTAAGAACCAGGAAAG

>Query_1:1-35_alignment_gn1|HvIgr1|chr3H:617021719-617021753
GGAGCAGTCGTCAGCGTGCGTAAGAACCAGGAAAG
|||||
GGAGCAGTCGTCAGCGTGCGTAAGAACCAGGAAAG

Target Motif 4

5' -CAGGAGGATGCTAAGAGGTCCGACAAAGGCGCCAA-3'

>Query_1:1-35_alignment_gn1|Hv-Morex3|chr3H:612462700-612462734
CAGGAGGATGCTAAGAGGTCCGACAAAGGCGCCAA
|||||
CAGGAGGATGCTAAGAGGTCCGACAAAGGCGCCAA

>Query_1:1-35_alignment_gn1|HvIgr1|chr3H:617022876-617022910
CAGGAGGATGCTAAGAGGTCCGACAAAGGCGCCAA
|||||
CAGGAGGATGCTAAGAGGTCCGACAAAGCGCCAA

EIF4E_wild-type_cds

M A E D T E T R P A S A G A E E R E E G E I A
ATGGCGGAGGACACGGAGACGAGGCCCGCGTCGGCGGGCGCGGAGGAGAGGGAGGGGGAGATCGCG

D D G D G S A A A A A G R V S A H P L E N A W
GACGACGGAGACGGGTCCGCGGGCGGGCGGCCGGGCGCGTCAGCGCCCACCCTCTGGAGAACGCCTGG

Target motif 1
T F W F D N P Q G K S R A V A W G S T I H P I
ACCTTCTGTTTCGACAACCCGCAGGGCAAGTCCCGGCGGTGGCCTGGGGGAGCACCATCCACCCCATC

H T F S T V E D F W S L Y N N I H H P S K L N
CACACCTTCTCCACCGTCGAGGACTTCTGGAGCCTTTACAACAATATTCATCACCCCTAGCAAGTTGAAT

Target motif 2
V G A D F H C F K D K I E P K W E D P I C A N
GTTGGAGCCGACTTCCATTGCTTCAAGGATAAGATTGAGCCAAAATGGGAAGACCCCATTTGTGCCAAT

tif 2
G G K W T I S C G K G K S D T F W L H T L L A
GGCGGTAAATGGACCATCAGTTGTGGCAAAGGGAAATCTGACACATTTTGGTTGCATACTTTGCTGGCA

Target motif 3
L I G E Q F D F G D E I C G A V V S V R K N Q
TTGATTGGTGAACAATTCGACTTTGGTGATGAAATTTGCGGAGCAGTCGTCAGCGTGCGTAAGAACCAG

E R V A I W T K N A A N E T A Q I S I G K Q W
GAAAGAGTAGCTATCTGGACTAAAAATGCTGCCAATGAAACTGCTCAGATAAGCATCGGTAAGCAGTGG

Target motif 4
K E F L D Y K D S I G F V V H E D A K R S D K
AAGGAGTTTCTGGACTACAAGGACTCCATTGGATTTCGTCGTTTCATGAGGATGCTAAGAGGTCCGACAAA

G A K N R Y T V *
GGCGCCAAGAACCGCTACACGGTTTGA

eif4e_A169_cds

M A E D T E T R P A S A G A E E R E E G E I A
ATGCGGAGGACACGGAGACGAGGCCCGCGTCGGCGGGCGCGGAGGAGGGAGGGGGAGATCGCG
D D G D G S A A A A A G R V S A H P L E N A W
GACGACGGAGACGGGTCCGCGGGCGGGCGGCCGGGCGCGTCAGCGCCCACCCTCTGGAGAACGCCTGG
T F W F D N P Q G K I P G G G L G E H H P P H
ACCTTCTGTTTCGACAACCCGAGGGCAAGATCCCGGGCGGTGGCTGGGGGAGCACCATCCACCCCAT
P H L L H R R G L L E P L Q Q Y S S P * Q V E
CCACACCTTCTCCACCGTTCGAGGACTTCTGGAGCCTTTACAACAATATTCATCACCCCTAGCAAGTTGAA
C W S R L P L L Q G * D * A K M G R P H L C Q
TGTTGGAGCCGACTTCCATTGCTTCAAGGATTAAGATTGAGCCAAAATGGGAAGACCCCATTTGTGCCAA
W R * M D H Q L W Q R E I * H I L V A Y F A G
TGGCGGTAAATGGACCATCAGTTGTGGCAAAGGGAAATCTGACACATTTTGGTTGCATACTTTGCTGGC
I D W * T I R L W * * N L R S S R Q R A * E P
ATTGATTGGTGAACAATTCGACTTTGGTGTGATGAAATTTGCGGAGCAGTCGTCAGCGTGCGTAAAGAACCA
G K S S Y L D * K C C Q * N C S D K H R * A V
GGAAAGAGTAGCTATCTGGACTAAAAATGCTGCCAATGAAACTGCTCAGATAAGCATCGGTAAAGCAGTG
E G V S G L Q G L H W I R R S * G C * E V R Q
GAAGGAGTTTCTGGACTACAAGGACTCCATTGGATTGTCGTTTCAATGAGGATGCTAAAGAGGTCCGACAA
R R Q E P L H G L
AGGCGCCAAGAACCCTACACGGTTTGA

eif4e_T169_cds

M A E D T E T R P A S A G A E E R E E G E I A
ATGCGGAGGACACGGAGACGAGGCCCGCGTCGGCGGGCGCGGAGGAGGGAGGGGGAGATCGCG
D D G D G S A A A A A G R V S A H P L E N A W
GACGACGGAGACGGGTCCGCGGGCGGGCGGCCGGGCGCGTCAGCGCCCACCCTCTGGAGAACGCCTGG
T F W F D N P Q G K F P G G G L G E H H P P H
ACCTTCTGTTTCGACAACCCGAGGGCAAGTTCCCGGGCGGTGGCTGGGGGAGCACCATCCACCCCAT
P H L L H R R G L L E P L Q Q Y S S P * Q V E
CCACACCTTCTCCACCGTTCGAGGACTTCTGGAGCCTTTACAACAATATTCATCACCCCTAGCAAGTTGAA
C W S R L P L L Q G * D * A K M G R P H L C Q
TGTTGGAGCCGACTTCCATTGCTTCAAGGATTAAGATTGAGCCAAAATGGGAAGACCCCATTTGTGCCAA
W R * M D H Q L W Q R E I * H I L V A Y F A G
TGGCGGTAAATGGACCATCAGTTGTGGCAAAGGGAAATCTGACACATTTTGGTTGCATACTTTGCTGGC
I D W * T I R L W * * N L R S S R Q R A * E P
ATTGATTGGTGAACAATTCGACTTTGGTGTGATGAAATTTGCGGAGCAGTCGTCAGCGTGCGTAAAGAACCA
G K S S Y L D * K C C Q * N C S D K H R * A V
GGAAAGAGTAGCTATCTGGACTAAAAATGCTGCCAATGAAACTGCTCAGATAAGCATCGGTAAAGCAGTG
E G V S G L Q G L H W I R R S * G C * E V R Q
GAAGGAGTTTCTGGACTACAAGGACTCCATTGGATTGTCGTTTCAATGAGGATGCTAAAGAGGTCCGACAA
R R Q E P L H G L
AGGCGCCAAGAACCCTACACGGTTTGA

10.1.2. Table S1: Oligonucleotide Sequences

Table 10-1: Oligonucleotide sequences of primers and gRNAs

Name	5'→3' sequence
Primers	
TM1_f_NGS	GACGACGGAGACGGGTC
TM1_r_NGS	GATGGGGTGGATGGTGCTC
TM2_f_NGS	CATCACCTAGCAAGTTGAATG
TM2_r_NGS	GTATGCAACCAAAATGTGTGTCAG
TM3_f_NGS	GTTGCTGGCATTGATTGGTG
TM3_r_NGS	GAATACATACCTGAGCAGTTTC
TM4_f_NGS	GTCTTGCTATCACCGATACG
TM4_r_NGS	CATGAGAAGCTTTCTTGCATC
TM1_f_Sanger	GACCGTAACCTTTGCCTCTG
TM1_r_Sanger	GATGGGGTGGATGGTGCTC
TM2+3_f_Sanger	GACAATTTGACACCGTGGCTTG
TM2+3_r_Sanger	CATTTATCACAATCACACAGTGAAG
cas9_f	TTTAGCCCTGCCTTCATACG
cas9_r	TTAATCATGTGGGCCAGAGC
gRNA oligos	
gRNA1_rym4_I_f	tggcACAACCCGCAGGGCAAGTCC
gRNA1_rym4_I_r	aaacGGACTIONGCCCTGCCGGTTGT
gRNA2_rym4_II_f	tggcATTTGTGCCAATGGCGGTAAA
gRNA2_rym4_II_r	aaacTTTACCGCCATTGGCACAAAT
gRNA3_rym5_II_III_f	tggcCGTCAGCGTGCGTAAGAACC
gRNA3_rym5_II_III_r	aaacGGTTCTTACGCACGCTGACGT
gRNA4_rym4_IV_f	tggcATGCTAAGAGGTCCGACAA
gRNA4_rym4_IV_r	aaacTTGTCGGACCTCTTAGCAT

10.1.3. Table S2: Plant Data and Statistics

Table 10-2: BaMMV resistance tests in M₂ generation: Phenotyping and genotyping data

Plant	symptom assessment	ELISA Extinction E405		Cas9 PCR present + absent -	Sanger Sequencing target motif 1	number of grains	grain weight per plant [g]	thousand grain weight [g]
		30'	60'					
P1 progeny								
P1-1	-	0,0085	0,02	+	+A	92	4,11	44,7
P1-2	-	0,0095	0,03	+	+A	69	3,21	46,5
P1-3	-	0,0075	0,02	+	+A	80	3,82	47,8
P1-4	-	0,0055	0,02	+	+A	42	1,93	46,0
P1-5	-	0,0075	0,02	+	+A	117	5,92	50,6
P1-6	-	0,0065	0,02	+	+A	77	3,95	51,3
P1-7	-	0,0075	0,02	+	+A	83	3,94	47,5
P1-8	-	0,0075	0,02	+	+A	1	0,04	40,0
P1-9	-	0,0085	0,02	+	+A	49	2,47	50,4
P1-10	-	0,0095	0,02	+	+A	80	3,27	40,9
P1-11	-	0,0065	0,02	+	+A	68	2,91	42,8
P1-12	-	0,0105	0,03	+	+A	101	4,31	42,7
P1-15	-	0,0175	0,03	+	+A	78	3,69	47,3
P2 progeny								
P3-1	-	0,0205	0,04	+	+T	70	3,18	45,4
P3-2	-	0,0195	0,04	+	+T	77	3,72	48,3
P3-4	-	0,0175	0,03	+	+T	73	3,26	44,7
P3-5	-	0,0175	0,03	+	+T	94	4,51	48,0
P3-6	-	0,0195	0,03	+	+T	42	1,78	42,4
P3-7	-	0,0125	0,03	+	+T	54	2,86	53,0
P3-8	-	0,0145	0,03	+	+T	118	5,19	44,0
P3-9	-	0,0145	0,03	+	+T	110	5,24	47,6
P3-10	-	0,0145	0,03	+	+T	75	3,75	50,0
P4 progeny								
P4-1	-	0,0135	0,03	+	+T	88	3,7	42,0
P4-2	-	0,0115	0,02	+	+T	83	3,54	42,7
P4-3	-	0,0165	0,03	+	+T	84	4,28	51,0
P4-5	-	0,0195	0,04	+	+T	31	1,31	42,3
P4-6	-	0,0165	0,03	+	+T	97	4,54	46,8
P4-7	-	0,0175	0,03	+	+T	114	5,24	46,0
P4-8	-	0,0145	0,03	+	+T	63	2,75	43,7
P4-9	-	0,0145	0,03	+	+T	61	2,64	43,3
P4-10	-	0,0125	0,02	+	+T	26	1,18	45,4
P4-11	-	0,0335	0,07	+	+T	35	1,68	48,0
P4-12	+	0,0245	0,05	+	+T	108	5,05	46,8
P4-13	-	0,0195	0,04	+	+T	78	3,74	47,9
P4-14	-	0,0145	0,03	+	+T	126	6,05	48,0
P4-16	-	0,0245	0,05	+	+T	38	1,74	45,8

10. Anhang – Supplementary Material Chapter 3: Targeted Knockout of *EIF4E*

P4-17	-	0,0195	0,04	+	+T	65	3,02	46,5
P4-18	-	0,0185	0,04	+	+T	58	2,65	45,7
lgri wild-type control								
lgri-1	+	0,39	0,68					
lgri-2	+	0,16	0,28					
lgri-3	+	0,79	1,40					
lgri-4	+	0,39	0,68					
lgri-5	+	0,57	1,00					
lgri-6	+	0,6085	1,35	-	wild-type	311	14,78	47,5
lgri-7	+	0,5605	1,28	-	wild-type	197	10,28	52,2
lgri-8	-	0,0195	0,04	-	wild-type	178	8,18	46,0
lgri-9	uninfected			-	wild-type	142	6,9	48,6
lgri-10	uninfected			-	wild-type	256	12,3	48,0
lgri-11	uninfected			-	wild-type	270	11,9	44,1
lgri-12	uninfected			-	wild-type	161	8,6	53,4
lgri-13	uninfected			-	wild-type	241	12,4	51,5
non-mutated transgenic control								
control_P1_14	-	0,00	0,01	+	wild-type	217	12,8	59,0
control_P1_19	+	0,91	1,53	+	wild-type	206	9,7	47,1
control_P1_20	+	0,29	0,58	+	wild-type	236	12,7	53,8
control_P3_16	-	0,00	0,02	+	wild-type	194	9,1	46,9
control_P6_18	+	1,50	1,75	+	wild-type	139	6,5	46,8
internal ELISA controls								
negative control		0,0025	0,01					
negative control		0,0035	0,01					
Buffer		-0,0025	0,00					
Buffer		0,0065	0,02					
positive control		0,6635	1,70					
positive control		0,7635	1,74					

Statistics: Thousand Grain Weight (TGW):

summary(TGW.data)

Family	TGW
non_mutated_ctrl: 5	Min.: 40,00
lgri_wt: 8	1st Qu.: 44,70
P1-M2 :13	Median: 46,80
P3-M2 : 9	Mean: 47,03
P4-M2 :16	3rd Qu.: 48,15
	Max.: 59,00

ANOVA

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
Family	4	135,7	33,92	2,939	0,0303	*
Residuals	46	530,9	11,54			

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Post Hoc Test

Tukey multiple comparisons of means

95% family-wise confidence level

\$family

	diff	lwr	upr	p adj
lgri_wt-non_mutated_ctrl	-1,8075000	-7,305964	3,69096414	0,8824734
P1-M2-non_mutated_ctrl	-4,6815385	-9,757044	0,3939669	0,0835086
P3-M2-non_mutated_ctrl	-3,6755556	-9,055248	1,70413726	0,3116251
P4-M2-non_mutated_ctrl	-4,97625	-9,917813	-0,03468661	0,0476482
P1-M2-lgri_wt	-2,8740385	-7,208076	1,45999934	0,3409724
P3-M2-lgri_wt	-1,8680556	-6,554656	2,81854489	0,7890536
P4-M2-lgri_wt	-3,16875	-7,345133	1,00763332	0,2155835
P3-M2-P1-M2	1,0059829	-3,176345	5,18831126	0,9591981
P4-M2-P1-M2	-0,2947115	-3,896076	3,3066527	0,9993299
P4-M2-P3-M2	-1,3006944	-5,319421	2,71803228	0,8881823

Statistics: Grain Number per Plant

summary(grain_number.data)

Family	grain_number
non_mutated_ctrl: 5	Min.: 1,00
lgri_wt: 8	1st Qu.: 66,5
P1-M2 :13	Median: 83,0
P3-M2 : 9	Mean: 108,9
P4-M2 :16	3rd Qu.: 132,5
	Max.: 311,0

ANOVA

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
Family	4	185029	46257	36	1,07E-13	***
Residuals	46	58574	1273			

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Post Hoc Test

Tukey multiple comparisons of means

95% family-wise confidence level

\$family

	diff	lwr	upr	p adj
lgri_wt-non_mutated_ctrl	21,1	-36,6521	78,8521	0,8367603
P1-M2-non_mutated_ctrl	-126,3230769	-179,63271	-73,01344	0,0000002
P3-M2-non_mutated_ctrl	-119,1777778	-175,68239	-62,67317	0,0000029
P4-M2-non_mutated_ctrl	-126,2125	-178,1153	-74,3097	0,0000001
P1-M2-lgri_wt	-147,4230769	-192,94484	-101,90131	0
P3-M2-lgri_wt	-140,2777778	-189,50262	-91,05293	0
P4-M2-lgri_wt	-147,3125	-191,17837	-103,44663	0
P3-M2-P1-M2	7,1452991	-36,78302	51,07361	0,9903413
P4-M2-P1-M2	0,1105769	-37,71569	37,93684	1
P4-M2-P3-M2	-7,0347222	-49,24468	35,17523	0,989411

10.2. Supplementary Material Chapter 4: Novel Resistance to the Bymovirus BaMMV established by Targeted Mutagenesis of the *PDIL5-1* Susceptibility Gene in Barley

10.2.1. S1: Sequences, Off-Target Analysis, mutated Alleles

Off-target Analysis:

Target Motif 1

BLASTN 2.10.0+

Query: 5'-AAATACATCATCGACCCACCCCGACTGGCGTAT-3'

Database:/data/blast_db/db2/Hv-Morex3/Hv-Morex3/data/blast_db/db2/pan-barley/HvGolden_Promise /data/blast_db/db2/pan-barley/HvIgri

3 hits found

Morex v3

Score: 60.80 (66), E value: 3.15×10⁻⁸, Identity: 33/33 (100%), Gaps: 0/33 (0%), Strand: + / +

Query 1 AAATACATCATCGACCCACCCCGACTGGCGTAT 33

|||||

Subject 454640260 AAATACATCATCGACCCACCCCGACTGGCGTAT 454640292

Igri

Score: 60.80 (66), E value: 3.15×10⁻⁸, Identity: 33/33 (100%), Gaps: 0/33 (0%), Strand: + / +

Query 1 AAATACATCATCGACCCACCCCGACTGGCGTAT 33

|||||

Subject 463842006 AAATACATCATCGACCCACCCCGACTGGCGTAT 463842038

Golden Promise

Score: 60.80 (66), E value: 3.15×10⁻⁸, Identity: 33/33 (100%), Gaps: 0/33 (0%), Strand: + / +

Query 1 AAATACATCATCGACCCACCCCGACTGGCGTAT 33

|||||

Subject 433170943 AAATACATCATCGACCCACCCCGACTGGCGTAT 433170975

Target Motif 2

BLASTN 2.10.0+

Query: 5'-CCGTCCTCCGTTTCGAGCCATGGATCCGGCTCTT-3'

Database:/data/blast_db/db2/Hv-Morex3/Hv-Morex3/data/blast_db/db2/pan-barley/HvGolden_Promise /data/blast_db/db2/pan-barley/HvIgri

3 hits found

Morex v3

Score: 60.80 (66), E value: 3.15×10⁻⁸, Identity: 33/33 (100%), Gaps: 0/33 (0%), Strand: + / +

```
Query          1 CCGTCCTCCGTTTCGAGCCATGGATCCGGCTCTT 33
                |||
Subject 454640327 CCGTCCTCCGTTTCGAGCCATGGATCCGGCTCTT 454640359
```

Igri

Score: 60.80 (66), E value: 3.15×10⁻⁸, Identity: 33/33 (100%), Gaps: 0/33 (0%), Strand: + / +

```
Query          1 CCGTCCTCCGTTTCGAGCCATGGATCCGGCTCTT 33
                |||
Subject 463842073 CCGTCCTCCGTTTCGAGCCATGGATCCGGCTCTT 463842105
```

Golden Promise

Score: 60.80 (66), E value: 3.15×10⁻⁸, Identity: 33/33 (100%), Gaps: 0/33 (0%), Strand: + / +

```
Query          1 CCGTCCTCCGTTTCGAGCCATGGATCCGGCTCTT 33
                |||
Subject 433171010 CCGTCCTCCGTTTCGAGCCATGGATCCGGCTCTT 433171042
```

Target Motif 3

BLASTN 2.10.0+

Query: 5'-GCAAGCAAACCAGTCTGCTCAAAGGTGGACATT-3'

Database:/data/blast_db/db2/Hv-Morex3/Hv-Morex3/data/blast_db/db2/pan-barley/HvGolden_Promise /data/blast_db/db2/pan-barley/HvIgri

3 hits found

Morex v3

Score: 60.80 (66), E value: 3.15×10⁻⁸, Identity: 33/33 (100%), Gaps: 0/33 (0%), Strand: + / +

```
Query          1 GCAAGCAAACCAGTCTGCTCAAAGGTGGACATT 33
                |||
Subject 454641111 GCAAGCAAACCAGTCTGCTCAAAGGTGGACATT 454641143
```

Igri

Score: 60.80 (66), E value: 3.15×10⁻⁸, Identity: 33/33 (100%), Gaps: 0/33 (0%), Strand: + / +

```
Query          1 GCAAGCAAACCAGTCTGCTCAAAGGTGGACATT 33
                |||
Subject 463842857 GCAAGCAAACCAGTCTGCTCAAAGGTGGACATT 463842889
```

Golden Promise

Score: 60.80 (66), E value: 3.15×10⁻⁸, Identity: 33/33 (100%), Gaps: 0/33 (0%), Strand: + / +

```
Query          1 GCAAGCAAACCAGTCTGCTCAAAGGTGGACATT 33
                |||
Subject 433171794 GCAAGCAAACCAGTCTGCTCAAAGGTGGACATT 433171826
```

Target Motif 4

BLASTN 2.10.0+

Query: 5'-GGAGGACCTCGGAAAGGTCATCGAAGGTACAG-3'

Database:/data/blast_db/db2/Hv-Morex3/Hv-Morex3/data/blast_db/db2/pan-barley/HvGolden_Promise /data/blast_db/db2/pan-barley/HvIgri

3 hits found

Morex v3

Score: 58.99 (64), E value: 8.80×10⁻⁸, Identity: 32/32 (100%), Gaps: 0/32 (0%), Strand: + / +

Query 1 GGAGGACCTCGGAAAGGTCATCGAAGGTACAG 32

|||||

Subject 454641047 GGAGGACCTCGGAAAGGTCATCGAAGGTACAG 454641078

Igri

Score: 58.99 (64), E value: 8.80×10⁻⁸, Identity: 32/32 (100%), Gaps: 0/32 (0%), Strand: + / +

Query 1 GGAGGACCTCGGAAAGGTCATCGAAGGTACAG 32

|||||

Subject 463842793 GGAGGACCTCGGAAAGGTCATCGAAGGTACAG 463842824

Golden Promise

Score: 58.99 (64), E value: 8.80×10⁻⁸, Identity: 32/32 (100%), Gaps: 0/32 (0%), Strand: + / +

Query 1 GGAGGACCTCGGAAAGGTCATCGAAGGTACAG 32

|||||

Subject 433171730 GGAGGACCTCGGAAAGGTCATCGAAGGTACAG 433171761

PDIL5-1_wild-type_cds

5' UTR Target mo-
GACCGGCCAGAGAAATACATCATCGACCCA

tif 1 Target mo-
CACCCCGACTGGCGTATCCGCCTTCTCCTCGTCTCCCCGTCTTCGCCGTGGCCGTCCCGTTCGAGCC

tif 2
M D P A L R R R S R L P I H L L L V A V T L L
ATGGATCCGGCTCTTCGGCGCCGCTCCCGCCTCCCTATCCACCTCCTGCTGGTGGCCGTACGTTACTG

A A L A A R S G A E V I T L T E E T F S D K I
GCGGCCCTCGCCGCGGATCCGGCGCCGAGGTCATCACCTCACCGAAGAGACCTTCTCCGACAAGATA

K E K D T V W F V Q F C V P W C K H C K S L G
AAGGAGAAGGACACGGTGTGGTTTGTGCAATTCTGCGTCCCTTGGTGTAAAGCACTGCAAGAGCCTAGGA

Target Motif 4
T L W E D L G K V I E G T D E I E I G K V D C
ACTCTTTGGGAGGACCTCGGAAAGGTCATCGAAGGTACAGATGAAATTAATAATCGGAAAAGTTGATTGC

Target Motif 3
G A S K P V C S K V D I H S Y P T F K V F Y D
GGTGCAAGCAAACAGTCTGCTCAAAGGTGGACATTCAATTCATACCCAACATTCAAGGTATTCTATGAT

G E E V A K Y K G P R D V E S L K N F V L N E
GGCGAAGAAGTTGCAAAATATAAAGGGCCTAGGGATGTGGAATCTCTCAAGAATTTTGTGTTGAACGAA

A E K A G E A T L E D E L *
GCTGAGAAAGCAGGAGAGGCGACACTTGAAGATGAGCTATAG

PDIL5-1_GPTM2_P11_4_cds (BaMMV susceptible)

5' UTR
GACCGGCCAGAGAAATACATCATCGACCCA

Target mo-
CACCCCGACTGGCGTATCCGCCTTCTCCTCGTCTCCCCGTCTTCGCCGTGGCCGTCCCGTTCGAGCC

tif 2
M A Y P A L R R R S R L P I H L L L V A V T L
ATGGCGTATCCGGCTCTTCGGCGCCGCTCCCGCCTCCCTATCCACCTCCTGCTGGTGGCCGTACGTTA

L A A L A A R S G A E V I T L T E E T F S D K
CTGGCGGCCCTCGCCGCGGATCCGGCGCCGAGGTCATCACCTCACCGAAGAGACCTTCTCCGACAAG

I K E K D T V W F V Q F C V P W C K H C K S L
ATAAAGGAGAAGGACACGGTGTGGTTTGTGCAATTCTGCGTCCCTTGGTGTAAAGCACTGCAAGAGCCTA

G T L W E D L G K V I E G T D E I E I G K V D
GGAATCTTTGGGAGGACCTCGGAAAGGTCATCGAAGGTACAGATGAAATTAATAATCGGAAAAGTTGAT

C G A S K P V C S K V D I H S Y P T F K V F Y
TGCGGTGCAAGCAAACAGTCTGCTCAAAGGTGGACATTCAATTCATACCCAACATTCAAGGTATTCTAT

D G E E V A K Y K G P R D V E S L K N F V L N
GATGGCGAAGAAGTTGCAAAATATAAAGGGCCTAGGGATGTGGAATCTCTCAAGAATTTTGTGTTGAAC

E A E K A G E A T L E D E L *
GAAGCTGAGAAAGCAGGAGAGGCGACACTTGAAGATGAGCTATAG

GPTM4_P5_9 PDIL5-1_I79Y_cds (BaMMV resistant)

M D P A L R R R S R L P I H L L L V A V T L L
ATGGATCCGGCTCTTCGGCGCCGCTCCCGCCTCCCTATCCACCTCCTGCTGGTGGCCGTCACGTTACTG

A A L A A R S G A E V I T L T E E T F S D K I
GCGGCCCTCGCCGCGCGATCCGGCGCCGAGGTCATCACCTCACCGAAGAGACCTTCTCCGACAAGATA

K E K D T V W F V Q F C V P W C K H C K S L G
AAGGAGAAGGACACGGTGTGGTTTTGTGCAATTCTGCGTCCCTTGGTGTAAAGCACTGCAAGAGCCTAGGA

Target Motif 4

T L W E D L G K V Y E G T D E I K I G K V D C
ACTCTTTGGGAGGACCTCGGAAAGGTCTACGAAGGTACAGATGAAATTAATAATCGGAAAAGTTGATTGC

G A S K P V C S K V D I H S Y P T F K V F Y D
GGTGCAAGCAAACCAAGTCTGCTCAAAGGTGGACATTCATTCATACCCAACATTCAAGGTATTCTATGAT

G E E V A K Y K G P R D V E S L K N F V L N E
GGCGAAGAAGTTGCAAAATATAAAGGGCCTAGGGATGTGGAATCTCTCAAGAATTTTGTGTTGAACGAA

A E K A G E A T L E D E L *
GCTGAGAAAGCAGGAGAGGCGACACTTGAAGATGAGCTATAG

10.2.2. Table S1: Oligonucleotide Sequences

Table 10-3: Oligonucleotide sequences of primers and gRNAs

f: forward, r: reverse; lower case letters in sequence indicate single stranded overhangs after hybridization of the respective forward and reverse oligo

Genetic element	Abbreviation	5'→3' sequence
Primer		
Region of target motifs 1 and 2	TM1_TM2_f	CATATGACGTCGCGGTCTCC
	TM1_TM2_r	GATGCACGACAAGGGGAAAGC
Region of target motifs 3 and 4	TM3_TM4_f	GTGCACTGCCGTTGCTTAAG
	TM3_TM4_r	CGAACCCAATGCAATAGATTCC
<i>cas9</i>	cas9_f	TTTAGCCCTGCCTTCATACG
	cas9_r	TTAATCATGTGGGCCAGAGC
gRNA oligos		
Specific part of gRNA1	Target Motif 1_f	tggcATCATCGACCCACCCGAC
	Target Motif 1_r	aaacGTCGGGGTGGGTTCGATGAT
Specific part of gRNA2	Target Motif 2_f	tggcACTCCGTTTCGAGCCATGGATC
	Target Motif 2_r	aaacGATCCATGGCTCGAACGGAGT
Specific part of gRNA3	Target Motif 3_f	tggcAAACCAGTCTGCTCAAAGG
	Target Motif 3_r	aaacCCTTTGAGCAGACTGGTTT
Specific part of gRNA4	Target Motif 4_f	tggcACCTCGGAAAGGTCATCGA
	Target Motif 4_r	aaacTCGATGACCTTTCCGAGGT

10.2.3. Table S2: Plant Data and Statistics

Legend:

symptom assessment

- + visible viral symptoms
 - no visible viral symptoms
 +? unclear visible viral symptoms

Cas9 PCR

- + present
 - absent

Sanger sequencing

- x bp Del/ Ins homozygous deletion or insertion of the given size
 bi-allelic two different mutated alleles present
 heterozygous/ cimeric double peaks in chromatogram indicate more than one allele present
 complex homozygous mutation combining deletion of few bases and insertion of other bases
 non-mutated same sequence as the wild-type

Table 10-4: BaMMV resistance tests in M₂ generation: Phenotyping and genotyping data for target motif 2 in 'Igr1' genetic background

(continued for 3 pages)

Plant	symptom assessment	ELISA Extinction E405		Cas9 PCR	Sanger Sequencing target motif 2	number of grains	grain weight per plant [g]	thousand grain weight [g]
		30'	60'					
IG4TM2_P1								
IG4TM2_P1_9	+?	0,00	0,01	+	2 bp Del	192	10	52,1
IG4TM2_P1_21	-	0,01	0,03	+	2 bp Del	218	11,1	50,9
IG4TM2_P1_32	-	0,01	0,03	+	2 bp Del	215	9,42	43,8
IG4TM2_P1_35	-	0,01	0,03	+	2 bp Del	310	14,94	48,2
IG4TM2_P1_37	-	0,01	0,03	+	2 bp Del	261	12,98	49,7
IG4TM2_P1_1	-	0,01	0,03	+	2 bp Del	125	6,22	49,8
IG4TM2_P1_8	-	0,01	0,02	+	2 bp Del	130	6,1	46,9
IG4TM2_P1_12	-	0,00	0,02	+	2 bp Del	214	10,64	49,7
IG4TM2_P1_19	-	0,01	0,03	+	2 bp Del	188	9,47	50,4
IG4TM2_P6								
IG4TM2_P6_1	-	0,01	0,02	+	58 bp Del	257	11,7	45,5
IG4TM2_P6_2	-?	0,07	0,14	+	heterozyg.: 58 bp Del + non-mutated	205	9,71	47,4
IG4TM2_P6_3	+?	0,01	0,02	+				
IG4TM2_P6_4	+?	0,00	0,01	-	bi-allelic: 58 bp Del + 10 bp Ins	185	8,8	47,6
IG4TM2_P6_5	-?	0,83	1,44	+				
IG4TM2_P6_6	-?	0,00	0,02	+	58 bp Del	214	10,79	50,4
IG4TM2_P6_7	+?	1,44	1,77	+	heteroz.: 58 bp Del + non-mutated	139	6,82	49,1
IG4TM2_P6_8	+?	1,30	1,75	-	non-mutated	186	9,41	50,6

10. Anhang – Supplementary Material Chapter 4: Targeted Mutagenesis of *PDIL5-1*

IG4TM2_P6_9	+	0,20	0,40	+	heteroz.: 58 bp Del + non-mutated	175	9,18	52,5
IG4TM2_P6_10	+	0,36	0,71	-	heteroz.: 58 bp Del + non-mutated	174	9,59	55,1
IG4TM2_P6_11	+?	0,46	0,87	+	heteroz.: 58 bp Del + non-mutated	282	14,62	51,8
IG4TM2_P6_12	-	0,00	0,01	+	heteroz.: 58 bp Del + non-mutated	241	12,17	50,5
IG4TM2_P6_13	+?	0,00	0,01	+	58 bp Del	230	12,18	53,0
IG4TM2_P6_14	+?	0,00	0,01	+	heteroz.: 58 bp Del + non-mutated	195	10,48	53,7
IG4TM2_P6_15	-	0,33	0,62	+	heteroz.: 58 bp Del + non-mutated	182	7,23	39,7
IG4TM2_P6_16	+	0,58	1,05	+				
IG4TM2_P6_17	+?	0,00	0,00	+	heteroz.: 58 bp Del + non-mutated	184	8,36	45,4
IG4TM2_P6_18	+?	0,21	0,40	+				
IG4TM2_P6_19	+?	0,00	0,01	+	58 bp Del	284	13,68	48,2
IG4TM2_P6_20	+?	0,01	0,02	+	58 bp Del	195	10,41	53,4
IG6TM2_P1								
IG6TM2_P1_3	+	0,83	1,38	+				
IG6TM2_P1_6	+	1,39	1,77	+	non-mutated	86	3,22	37,4
IG6TM2_P1_10	+?	0,33	0,62	+				
IG6TM2_P1_11	+?	0,86	1,44	+	heterozygous/ chimeric	79	2,89	36,6
IG6TM2_P1_12	+	1,39	1,79	+				
IG6TM2_P1_13	-	0,34	0,62	+	heterozygous/ chimeric	22	0,71	32,3
IG6TM2_P1_16	-	0,84	1,42	+	non-mutated	107	4,01	37,5
IG6TM2_P1_20	+	0,83	1,43	+				
IG6TM2_P1_21	-	0,26	0,58	+	non-mutated	31	1,07	34,5
IG6TM2_P1_22	-	0,01	0,02	+	heterozygous/ chimeric	47	2,02	43,0
IG6TM2_P1_23	-	0,01	0,03	+	heterozygous/ chimeric	77	2,88	37,4
IG6TM2_P1_24	-	0,44	0,87	+				
IG6TM2_P1_28	-	0,01	0,03	+	heterozygous/ chimeric	96	3,73	38,9
IG6TM2_P1_35	-	0,01	0,03	+	heterozygous/ chimeric	35	1,42	40,6
IG6TM2_P1_36	+?	0,33	0,73	+				
IG6TM2_P1_37	-	0,01	0,03	+	non-mutated	93	4,08	43,9
IG6TM2_P2								
IG6TM2_P2_4	-	0,00	0,00	+	22 bp Del.	138	5,4	39,1
IG6TM2_P2_5	-	0,00	0,00	+	22 bp Del.	140	5,4	38,6
IG6TM2_P2_6	-	0,00	0,00	+	22 bp Del.	137	5,28	38,5
IG6TM2_P2_7	-	0,00	0,01	+	22 bp Del.	93	3,97	42,7
IG6TM2_P2_10	+?	0,00	0,00	+	22 bp Del.	49	2,09	42,7
IG6TM2_P2_11	+	0,00	0,00	+	22 bp Del.			
IG6TM2_P2_14	-?	-0,01	0,00	+	22 bp Del.	107	4,46	41,7
IG6TM2_P2_17	-	-0,01	-0,01	+	22 bp Del.	122	5,3	43,4
IG6TM2_P2_18	+?	0,00	0,01	+	22 bp Del.	98	4,46	45,5
IG6TM2_P2_20	+?	0,00	0,01	+	22 bp Del.	91	3,65	40,1
IG6TM2_P2_21	-	0,01	0,04	+	22 bp Del	49	1,38	28,2
IG6TM2_P2_22	-	0,01	0,03	+	22 bp Del	79	2,96	37,5
IG6TM2_P2_23	-	0,01	0,03	+	22 bp Del	45	1,64	36,4
IG6TM2_P2_24	-	0,01	0,04	+	22 bp Del	31	1,29	41,6
IG6TM2_P2_27	-	0,01	0,03	+	22 bp Del	40	1,28	32,0

10. Anhang – Supplementary Material Chapter 4: Targeted Mutagenesis of *PDIL5-1*

IG6TM2_P2_33	-	0,01	0,03	+	22 bp Del	55	2,72	49,5
IG6TM2_P2_36	-	0,01	0,02	+	22 bp Del	87	3,24	37,2
IG6TM2_P2_37	-	0,01	0,03	+	22 bp Del	26	0,98	37,7
IG6TM2_P2_40	-	0,01	0,02	+	22 bp Del	24	0,75	31,3
IG7TM2_P1								
IG7TM2_P1_1	+	1,32	1,73	+				
IG7TM2_P1_2	+	1,47	1,75	-				
IG7TM2_P1_3	+	1,13	1,65	+	non-mutated	210	9,76	46,5
IG7TM2_P1_4	+	1,04	1,60	+				
IG7TM2_P1_5	+?	0,01	0,01	+	4 bp Ins	308	15,1	49,0
IG7TM2_P1_6	+	1,03	1,61	+				
IG7TM2_P1_7	+?	1,10	1,68	-				
IG7TM2_P1_8	+?	0,80	1,37	+				
IG7TM2_P1_10	+	1,14	1,70	-				
IG7TM2_P1_11	+	1,42	1,81	+	non-mutated	215	10,87	50,6
IG7TM2_P1_12	+	1,09	1,61	+				
IG7TM2_P1_14	+	0,88	1,43	+				
IG7TM2_P1_15	+	0,92	1,50	+	non-mutated	278	13,28	47,8
IG7TM2_P1_16	+	1,32	1,71	+				
IG7TM2_P1_18	+	0,99	1,55	+	non-mutated	272	12,57	46,2

Table 10-5: BaMMV resistance tests in M₂ generation: Phenotyping and genotyping data for target motif 1 in 'Golden Promise' genetic background

(continued for 3 pages)

Plant	symptom assessment	ELISA Extinction E405		Cas9 PCR	Sanger Sequencing target motif 1	number of grains	grain weight per plant [g]	thousand grain weight [g]
		30'	60'					
GPTM1_P1								
GPTM1_P1_1	-	0,01	0,02	+	1 bp Ins	375	11,57	30,9
GPTM1_P1_2	+	0,68	1,29	+				
GPTM1_P1_3	+?	0,83	1,49	+				
GPTM1_P1_4	+	0,92	1,60	+	21 bp Del	229	6,03	26,3
GPTM1_P1_5	+?	0,83	1,51	+				
GPTM1_P1_6	+	0,30	0,65	+				
GPTM1_P1_7	+	0,51	1,00	-	non-mutated	173	4,96	28,7
GPTM1_P1_8	-	0,01	0,03	+	heterozygous/ chimeric	157	4,41	28,1
GPTM1_P1_9	+	0,86	1,54	+				
GPTM1_P1_10	+	1,00	1,67	-				
GPTM1_P1_11	(+)	0,71	1,35	+				
GPTM1_P1_12	+	0,57	1,10	+				
GPTM1_P1_13	+?	0,57	1,11	+?				
GPTM1_P1_14	+?	0,57	1,12	+				
GPTM1_P1_15	+?	0,00	0,02	+	heterozygous/ chimeric	347	10,14	29,2

10. Anhang – Supplementary Material Chapter 4: Targeted Mutagenesis of *PDIL5-1*

GPTM1_P1_16	-	0,01	0,02	-	18 bp Del	368	12,2	33,2
GPTM1_P1_17	+?	0,53	1,06	+				
GPTM1_P1_18	+	0,74	1,36	-				
GPTM1_P1_19	+?	0,61	1,16	+				
GPTM1_P1_20	+?	0,52	1,01	+				
GPTM1_P7								
GPTM1_P7_1	+?	0,64	1,23	+				
GPTM1_P7_2	-	0,58	1,15	+	heterozygous/ chimeric	215	6,27	29,2
GPTM1_P7_3	-	0,95	1,61	+				
GPTM1_P7_4	+	0,58	1,13	+				
GPTM1_P7_5	+	1,03	1,67	-				
GPTM1_P7_6	+	0,57	1,10	+				
GPTM1_P7_7	+	0,40	0,81	+?				
GPTM1_P7_8	+?	0,86	1,53	+?				
GPTM1_P7_9	+?	0,78	1,45	+	heterozygous/ chimeric	167	5,19	31,1
GPTM1_P7_10	-	0,60	1,16	+				
GPTM1_P7_11	+	0,76	1,38	+				
GPTM1_P7_12	+	0,80	1,44	+				
GPTM1_P7_13	+	0,58	1,13	-	heterozygous/ chimeric	255	7,63	29,9
GPTM1_P7_14	+	1,06	1,68	+				
GPTM1_P7_15	+?	0,65	1,26	+				
GPTM1_P7_16	+	0,78	1,45	+				
GPTM1_P7_17	+	0,84	1,51	+				
GPTM1_P7_18	+	0,65	1,24	-				
GPTM1_P7_20	+?	0,85	1,52	+				
GPTM1_P12								
GPTM1_P12_1	+?	0,01	0,04	+	heterozygous/ chimeric	204	6,71	32,9
GPTM1_P12_2	+	0,51	1,10	+	heterozygous/ chimeric	239	4,44	18,6
GPTM1_P12_3	+	0,01	0,04	+	heterozygous/ chimeric	249	5,87	23,6
GPTM1_P12_4	+?	0,01	0,04	+	2 bp Ins			
GPTM1_P12_5	+?	0,01	0,03	+	heterozygous/ chimeric	178	4,39	24,7
GPTM1_P12_6	+	0,64	1,29	+				
GPTM1_P12_7	+	0,01	0,03	+	heterozygous/ chimeric	310	7,88	25,4
GPTM1_P12_8	+	0,49	1,09	+				
GPTM1_P12_9	+	0,76	1,48	-	heterozygous/ chimeric	157	3,48	22,2
GPTM1_P12_10	+?	0,98	1,69	-				
GPTM1_P12_11	+?	0,00	0,02	+	1 bp Ins	267	8,97	33,6
GPTM1_P12_12	+?	0,00	0,02	+				
GPTM1_P12_13	+?	0,01	0,04	-	non-mutated	155	4,07	26,3
GPTM1_P12_14	-	0,01	0,03	+				
GPTM1_P12_15	+?	0,01	0,03	+	heterozygous/ chimeric	257	8,28	32,2
GPTM1_P12_16	-	0,01	0,03	+				
GPTM1_P12_17	-	0,01	0,03	+	complex	302	8,55	28,3
GPTM1_P12_18	-	0,00	0,02	-				
GPTM1_P12_19	-	0,01	0,03	-	heterozygous/ chimeric	156	4,53	29,0

10. Anhang – Supplementary Material Chapter 4: Targeted Mutagenesis of *PDIL5-1*

GPTM1_P12_20	+?	0,01	0,03	+	heterozygous/ chimeric	294	7,94	27,0
GPTM1_P16								
GPTM1_P16_2	+?	0,00	0,02	+				
GPTM1_P16_4	+?	0,00	0,02	+	heterozygous/ chimeric	119	1,75	14,7
GPTM1_P16_5	+	0,49	1,04	+	heterozygous/ chimeric	181	3,94	21,8
GPTM1_P16_7	+?	0,00	0,03	-	1 bp Del	25	0,32	12,8
GPTM1_P16_8	-	0,01	0,04	+				
GPTM1_P16_9	-	0,01	0,04	+				
GPTM1_P16_10	+?	0,01	0,03	+				
GPTM1_P16_11	+?	0,01	0,03	+	heterozygous/ chimeric	182	4,48	24,6
GPTM1_P16_12	+?	0,01	0,03	-	1 bp Del	161	3,4	21,1
GPTM1_P16_13	-	0,01	0,03	+				
GPTM1_P16_14	-	0,01	0,03	+	heteroz.: complex + larger Del	237	6,11	25,8
GPTM1_P16_15	+?	0,75	1,50	+				
GPTM1_P16_16	+?	0,02	0,05	+	1 bp Del	287	7,04	24,5
GPTM1_P16_17	-	0,01	0,04	+				
GPTM1_P16_18	-	0,01	0,04	+	1 bp Del	165	3,72	22,5
GPTM1_P16_19	+?	0,01	0,04	+				
GPTM1_P16_20	-	0,01	0,03	+	complex	103	2,13	20,7
GPTM1_P23								
GPTM1_P23_1	+?	0,01	0,03	+	heterozygous/ chimeric			
GPTM1_P23_2	+?	0,01	0,03	+	bi-allelic: complex + larger Del	336	11,12	33,1
GPTM1_P23_3	+	0,98	1,68	+				
GPTM1_P23_4	+?	0,45	0,95	-	non-mutated	243	8	32,9
GPTM1_P23_6	+?	0,65	1,27	-				
GPTM1_P23_7	+	0,13	0,31	+				
GPTM1_P23_8	+?	0,01	0,04	+	complex	356	12,64	35,5
GPTM1_P23_9	+?	0,01	0,03	+	heterozygous/ chimeric	310	10,82	34,9
GPTM1_P23_10	+	1,00	1,73	-				
GPTM1_P23_11	+?	1,00	1,70	-				
GPTM1_P23_12	+	0,03	0,07	+	1 bp Del	190	4,95	26,1
GPTM1_P23_13	+	0,49	1,05	+				
GPTM1_P23_14	+	0,56	1,23	-	non-mutated	254	7,48	29,4
GPTM1_P23_16	+?	0,54	1,18	-				
GPTM1_P23_17	+	0,50	1,09	+				
GPTM1_P23_18	-	0,01	0,04	+	heterozygous/ chimeric	293	8,22	28,1
GPTM1_P23_19	+	0,45	0,95	+				
GPTM1_P23_20	+?	0,51	1,06	+		276	8,86	32,1

Table 10-6: BaMMV resistance tests in M₂ generation: Phenotyping and genotyping data for target motif 2 in 'Golden Promise' genetic background

(continued for 3 pages)

Plant	symptom assessment	ELISA Extinction E405		Cas9 PCR	Sanger Sequencing target motif 2	number of grains	grain weight per plant [g]	thousand grain weight [g]
		30'	0'					
GPTM2_P9								
GPTM2_P9_1	-	0,01	0,03	+	non-mutated	8	0,16	20,0
GPTM2_P9_2	-	0,01	0,02	+	heterozygous/ chimeric	319	9,65	30,3
GPTM2_P9_3	-	0,01	0,03	+	heterozygous/ chimeric	144	3,4	23,6
GPTM2_P9_4	-?	0,01	0,04	<i>No DNA sampling possible</i>		0	0	
GPTM2_P9_5	-	0,01	0,03	+	heterozygous/ chimeric	460	13,87	30,2
GPTM2_P9_6	+?	0,66	1,30	+	heterozygous/ chimeric	308	9,79	31,8
GPTM2_P9_7	-	0,01	0,03	+	heterozygous/ chimeric	375	11,81	31,5
GPTM2_P9_8	+?	0,01	0,04	+	non-mutated	8	0,15	18,8
GPTM2_P9_9	-	0,01	0,03	+	heterozygous/ chimeric	272	8,73	32,1
GPTM2_P9_10	-	0,01	0,04	+	heterozygous/ chimeric	89	2,7	30,3
GPTM2_P9_11	+?	0,01	0,03	+	complex	326	11,91	36,5
GPTM2_P9_12	+?	0,01	0,03	+	heterozygous/ chimeric	243	7,01	28,8
GPTM2_P9_13	-	0,02	0,04	-	non-mutated	164	4,78	29,1
GPTM2_P9_14	+?	0,01	0,03	+	heterozygous/ chimeric	286	10,33	36,1
GPTM2_P9_15	+?	0,01	0,03	+	non-mutated	280	8,63	30,8
GPTM2_P9_16	+	0,26	0,57	+	heterozygous/ chimeric	46	0,9	19,6
GPTM2_P9_17	-	0,03	0,06	+	complex	227	5,83	25,7
GPTM2_P9_18	-	0,01	0,03	+	complex	223	6,18	27,7
GPTM2_P9_19	-	0,01	0,03	-	heterozygous/ chimeric	147	4,26	29,0
GPTM2_P9_20	+?	0,01	0,03	+	heterozygous/ chimeric	141	4,28	30,4
GPTM2_P11								
GPTM2_P11_1	+?	0,54	1,10	-				
GPTM2_P11_2	+?	0,01	0,04	+	heterozygous/ chimeric	148	4,45	30,1
GPTM2_P11_3	+	0,79	1,49	+				
GPTM2_P11_4	+	0,87	1,59	+	3 bp Ins (CGT)	285	8,08	28,4
GPTM2_P11_5	+	0,77	1,46	+				
GPTM2_P11_6	-	0,01	0,03	-	1 bp Ins	238	8,8	37,0
GPTM2_P11_7	+	0,52	1,06	+				
GPTM2_P11_8	+?	0,01	0,04	+	1 bp Ins	195	5,67	29,1
GPTM2_P11_9	+	0,77	1,45	+				
GPTM2_P11_10	+?	0,67	1,31	+				
GPTM2_P11_11	-	0,22	0,47	+				
GPTM2_P11_12	-	0,01	0,03	+	heterozygous/ chimeric	279	8,08	29,0
GPTM2_P11_13	-	0,01	0,03	+	heterozygous/ chimeric	270	7,8	28,9
GPTM2_P11_14	+	0,49	1,00	+				
GPTM2_P11_15	+	0,58	1,16	+				
GPTM2_P11_16	+?	0,96	1,62	+				

10. Anhang – Supplementary Material Chapter 4: Targeted Mutagenesis of *PDIL5-1*

GPTM2_P11_17	+?	0,70	1,35	-	3 bp Ins (CGT)	344	10,1	29,4
GPTM2_P11_18	+?	0,01	0,03	-	1 bp Ins	259	8,05	31,1
GPTM2_P11_19	+	0,84	1,51	+				
GPTM2_P11_20	+	0,64	1,26	+				
GPTM2_P22								
GPTM2_P22_1	-	0,01	0,03	+	heterozygous/ chimeric	351	13,02	37,1
GPTM2_P22_2	-	0,01	0,02	+	heterozygous/ chimeric	197	6,37	32,3
GPTM2_P22_4	+?	0,01	0,02	-	21 bp Del incl. ATG	237	8,4	35,4
GPTM2_P22_5	+?	0,71	1,36	+	heterozygous/ chimeric	289	10,48	36,3
GPTM2_P22_6	-?	0,00	0,01	+	heterozygous/ chimeric	269	7,47	27,8
GPTM2_P22_7	-	0,00	0,02	+	complex: 2 bp Del 1 bp Ins	371	13,58	36,6
GPTM2_P22_9	-	0,01	0,02	+	3 bp Del	293	9,6	32,8
GPTM2_P22_10	-	0,01	0,02	+		331	10,24	30,9
GPTM2_P22_11	+?	0,54	1,09	-		253	7,11	28,1
GPTM2_P22_12	-	0,00	0,01	+	heterozygous/ chimeric	306	9,75	31,9
GPTM2_P22_13	+?	0,01	0,02	+	heterozygous/ chimeric	276	9,52	34,5
GPTM2_P22_14	-	0,01	0,02	+	heterozygous/ chimeric	409	13,3	32,5
GPTM2_P22_15	-	0,00	0,02	+	heterozygous/ chimeric	378	10,65	28,2
GPTM2_P22_16	-	0,00	0,01	-	21 bp Del incl. ATG	386	12,13	31,4
GPTM2_P22_17	-	0,01	0,02	+	heterozygous/ chimeric	382	13,19	34,5
GPTM2_P22_18	-	0,00	0,02	+	3 bp Del	307	10,09	32,9
GPTM2_P22_19	-	0,01	0,02	+	3 bp Del	286	9,7	33,9
GPTM2_P22_20	-	0,01	0,02	-		399	12,57	31,5
GPTM2_P30								
GPTM2_P30_1	+?	0,01	0,02	+		15	0,33	22,0
GPTM2_P30_2	-	0,01	0,03	+		251	6,11	24,3
GPTM2_P30_4	+?	0,51	1,03	+				
GPTM2_P30_5	+?	0,45	0,92	-		0	0	
GPTM2_P30_6	+	0,65	1,27	+		134	2,34	17,5
GPTM2_P30_7	-	0,01	0,03	-		409	10,19	24,9
GPTM2_P30_8	+?	0,50	1,01	+				
GPTM2_P30_9	+?	0,62	1,22	+				
GPTM2_P30_10	-	0,02	0,04	+	bi-allelic: 1 bp Del + 58 bp Del	379	9,23	24,4
GPTM2_P30_11	+?	0,47	0,96	+	heteroz.: non-mutated; + 6 bp Del	40	0,68	17,0
GPTM2_P30_12	-	0,57	1,14	+				
GPTM2_P30_13	-	0,41	0,84	+		133	2,93	22,0
GPTM2_P30_14	+?	0,49	0,99	+				
GPTM2_P30_16	+?	0,46	0,94	+				
GPTM2_P30_17	-	0,01	0,03	+	heterozygous/ chimeric	259	6,75	26,1
GPTM2_P30_18	-	0,01	0,02	-	non-mutated	24	0,6	25,0
GPTM2_P30_19	+?	0,01	0,02	+	bi-allelic: 1 bp Del + 58 bp Del	17	0,36	21,2
GPTM2_P30_20	+	0,52	1,04	+				
GPTM2_P50								
GPTM2_P50_1	+	0,57	1,14	-				
GPTM2_P50_2	+?	0,73	1,39	+	non-mutated	98	2,72	27,8

10. Anhang – Supplementary Material Chapter 4: Targeted Mutagenesis of *PDIL5-1*

GPTM2_P50_3	+?	0,70	1,35	+				
GPTM2_P50_4	+	0,86	1,55	-				
GPTM2_P50_5	+?	0,01	0,03	+	non-mutated	186	5,1	27,4
GPTM2_P50_6	+?	0,79	1,48	+				
GPTM2_P50_7	+?	0,64	1,25	+				
GPTM2_P50_8	+?	0,01	0,02	-	non-mutated	125	2,69	21,5
GPTM2_P50_9	+?	0,79	1,45	+				
GPTM2_P50_10	+?	0,01	0,02	+	non-mutated	251	7,75	30,9
GPTM2_P50_11	+?	0,66	1,28	+				
GPTM2_P50_12	+?	0,57	1,15	+	non-mutated	336	9,58	28,5
GPTM2_P50_13	+?	0,57	1,15	+				
GPTM2_P50_14	+?	0,01	0,02	+	non-mutated	252	6,93	27,5
GPTM2_P50_15	+?	0,57	1,11	+				
GPTM2_P50_16	+?	0,01	0,02	+	non-mutated	204	5,79	28,4
GPTM2_P50_17	+?	0,58	1,14	+				
GPTM2_P50_19	+?	0,79	1,46	+				
GPTM2_P50_20	+?	0,52	1,06	+				

Table 10-7: BaMMV resistance tests in M₂ generation: Phenotyping and genotyping data for target motif 4 in 'Golden Promise' genetic background

(continued for 3 pages)

Plant	symptom assessment	ELISA Extinction E405		Cas9 PCR	Sanger Sequencing target motif 4	number of grains	grain weight per plant [g]	thousand grain weight [g]
		30'	60'					
GPTM4_P5								
GPTM4_P5_1	-	0,01	0,02	+	heterozygous/ chimeric	197	7,31	37,1
GPTM4_P5_2	-	0,00	0,01	+				
GPTM4_P5_3	-	0,00	0,01	+	heterozygous/ chimeric	218	4,33	19,9
GPTM4_P5_4	+?	0,00	0,01	+	heterozygous/ chimeric	101	2,75	27,2
GPTM4_P5_5	+	0,68	1,35	+				
GPTM4_P5_6	+?	0,00	0,02	-	heterozygous/ chimeric	119	2,66	22,4
GPTM4_P5_7	-	0,00	0,02	+				
GPTM4_P5_8	+?	0,45	0,96	-	heterozygous/ chimeric	44	1,41	32,0
GPTM4_P5_9	+?	0,00	0,02	-	ATC (I) -> TAC (Y)	208	4,7	22,6
GPTM4_P5_10	-	0,00	0,01	+				
GPTM4_P5_11	-	0,00	0,02	-	ATC (I) -> TAC (Y)	295	10,5	35,6
GPTM4_P5_12	+?	0,00	0,01	-	ATC (I) -> TAC (Y)	313	10,85	34,7
GPTM4_P5_13	-	0,01	0,02	+				
GPTM4_P5_14	-	0,00	0,01	+	heterozygous/ chimeric	177	4,89	27,6
GPTM4_P5_15	+?	0,36	0,77	+				
GPTM4_P5_16	-	0,00	0,01	+				
GPTM4_P5_17	+?	0,00	0,02	+				
GPTM4_P5_18	+?	0,01	0,02	-	ATC (I) -> TAC (Y)	281	8,58	30,5
GPTM4_P5_19	+?	0,00	0,01	-	ATC (I) -> TAC (Y)	31	0,52	16,8
GPTM4_P5_20	-	0,00	0,02	+	2 bp Del	250	6,55	26,2

10. Anhang – Supplementary Material Chapter 4: Targeted Mutagenesis of *PDIL5-1*

GPTM4_P11								
GPTM4_P11_1	-	0,00	0,02	+				
GPTM4_P11_2	-	0,00	0,01	+	heterozygous/ chimeric	233	6,31	27,1
GPTM4_P11_3	-	0,00	0,01	+				
GPTM4_P11_4	+?	0,57	1,17	-	heterozygous/ chimeric	119	2,91	24,5
GPTM4_P11_5	+?	0,01	0,02	+				
GPTM4_P11_6	+?	0,01	0,02	+	heterozygous/ chimeric	253	4,84	19,1
GPTM4_P11_7	+?	0,00	0,01	+				
GPTM4_P11_8	+?	0,00	0,02	+	heterozygous/ chimeric	218	6,68	30,6
GPTM4_P11_9	-	0,00	0,02	+				
GPTM4_P11_10	+?	0,01	0,02	-	non-mutated	16	0,17	10,6
GPTM4_P11_12	+?	0,01	0,02	+				
GPTM4_P11_13	+?	0,02	0,05	+	heterozygous/ chimeric	349	9,04	25,9
GPTM4_P11_14	-	0,01	0,02	+				
GPTM4_P11_15	+?	0,27	0,60	+	heterozygous/ chimeric	270	7,27	26,9
GPTM4_P11_16	-	0,01	0,02	+				
GPTM4_P11_17	-	0,01	0,02	-	heterozygous/ chimeric	313	8,24	26,3
GPTM4_P11_18	-	0,01	0,02	-				
GPTM4_P11_19	+?	0,01	0,02	+	heterozygous/ chimeric	319	9,26	29,0
GPTM4_P11_20	+?	0,01	0,02	+				
GPTM4_P14								
GPTM4_P14_1	+?	0,01	0,02	+	2 bp Del	142	2,98	21,0
GPTM4_P14_2	+?	0,01	0,02	+				
GPTM4_P14_5	+?	0,01	0,02	+	heterozygous/ chimeric	212	6,46	30,5
GPTM4_P14_6	+?	0,65	1,32	+				
GPTM4_P14_7	+?	0,01	0,02	+	1 bp Ins	222	6,26	28,2
GPTM4_P14_8	+?	0,05	0,12	+	heterozygous/ chimeric	144	2,37	16,5
GPTM4_P14_10	+?	0,01	0,02	+	heterozygous/ chimeric	112	3,75	33,5
GPTM4_P14_11	(+)	0,00	0,02	+				
GPTM4_P14_12	+?	0,01	0,02	+	heterozygous/ chimeric	149	4,68	31,4
GPTM4_P14_13	+?	0,01	0,03	+				
GPTM4_P14_14	+?	0,01	0,03	-	2 bp Del	264	7,21	27,3
GPTM4_P14_15	+	0,01	0,02	+				
GPTM4_P14_16	+	0,55	1,16	+	heterozygous/ chimeric	171	4,71	27,5
GPTM4_P14_17	+?	0,01	0,02	+				
GPTM4_P14_18	+?	0,01	0,02	+	1 bp Del	159	4,68	29,4
GPTM4_P14_19	+?	0,00	0,01	+				
GPTM4_P21								
GPTM4_P21_1	+?	0,00	0,01	+	heterozygous/ chimeric	269	8,1	30,1
GPTM4_P21_3	+?	0,00	0,01	+	heterozygous/ chimeric	193	3,87	20,1
GPTM4_P21_4	+?	0,01	0,02	+				
GPTM4_P21_7	+?	0,00	0,02	+	heterozygous/ chimeric	182	5,18	28,5
GPTM4_P21_8	+?	0,00	0,01	+	1 bp Ins	188	4,73	25,2
GPTM4_P21_10	+?	0,00	0,01	+	1 bp Ins	219	5,92	27,0
GPTM4_P21_11	+	0,45	1,00	+				

10. Anhang – Supplementary Material Chapter 4: Targeted Mutagenesis of *PDIL5-1*

GPTM4_P21_12	+	0,67	1,39	+	heterozygous/ chimeric	173	5,02	29,0
GPTM4_P21_13	+	0,63	1,31	+				
GPTM4_P21_16	+?	0,01	0,03	-	1 bp Ins	220	5,3	24,1
GPTM4_P21_18	+?	0,02	0,05	+	heterozygous/ chimeric	239	7,03	29,4
GPTM4_P21_19	+?	0,03	0,06	+				

Table 10-8: BaMMV resistance tests in M₂ generation: Phenotyping data of wild-type and control plants (continued for 3 pages)

Plant	symptom assessment	ELISA Extinction		Cas9 PCR	Sanger Sequencing of target motifs	number of grains	grain weight per plant [g]	thousand grain weight [g]
		30'	60'					
Golden Promise								
GP_1	+	1,43	1,80	-	wt			
GP_2	+	1,02	1,61	-	wt			
GP_3	+	0,30	0,62	-	wt			
GP_4	-	0,01	0,02	-	wt	208	7	33,7
GP_5	-	0,00	0,02	-	wt	297	9,1	30,6
GP_6	+?	0,68	1,31			271	7,5	27,7
GP_7	+	0,91	1,61			276	8,9	32,2
GP_8	+	0,69	1,32			241	8,5	35,3
GP_9	+?	0,72	1,45			201	5,5	27,4
GP_10	+?	1,12	1,79			153	3,7	24,2
GP_11	(+)	0,01	0,02			230	8	34,8
Igri								
Igri_1	+	0,63	1,12			228	10,7	46,9
Igri_2	+	0,74	1,26			163	7,9	48,5
Igri-3	+	0,39	0,68					
Igri-4	+	0,16	0,28					
Igri-5	+	0,79	1,40					
Igri-6	+	0,39	0,68					
Igri-7	+	0,57	1,00					
Igri-8	+	0,6085	1,35	-	wt	311	14,78	47,5
Igri-9	+	0,5605	1,28	-	wt	197	10,28	52,2
Igri-10	-	0,0195	0,04	-	wt	178	8,18	46,0
Igri-11	uninfected			-	wt	142	6,9	48,6
Igri-12	uninfected			-	wt	256	12,3	48,0
Igri-13	uninfected			-	wt	270	11,9	44,1
Internal ELISA Controls								
Inoculation Experiment 1								
Maris Otter 1	+	1,11	1,68					
Maris Otter 2	+	1,09	1,67					
Maris Otter 3	+	1,17	1,68					
Maris Otter 4	+	1,31	1,75					
Negative Control		0,01	0,03					
Negative Control		0,01	0,03					
Buffer		-0,01	0,00					
Buffer		-0,01	0,00					
Positive Control		1,54	1,77					
Positive Control		1,50	1,77					
Inoculation Experiment 2								
Maris Otter 1	+	0,53	1,04					

10. Anhang – Supplementary Material Chapter 4: Targeted Mutagenesis of *PDIL5-1*

Maris Otter 2	+	0,63	1,21
Maris Otter 3	+	0,45	0,89
Maris Otter 4	+	0,63	1,22
Maris Otter 5	+	0,97	1,60
Negative Control		0,01	0,04
Negative Control		0,01	0,04
Buffer		0,00	0,01
Buffer		0,00	0,00
Positive Control		0,62	1,23
Positive Control		0,64	1,24
Inoculation Experiment 3			
Maris Otter 1	+	0,53	1,04
Maris Otter 2	+	0,63	1,21
Maris Otter 3	+	0,45	0,89
Maris Otter 4	+	0,63	1,22
Maris Otter 5	+	0,97	1,60
Negative Control		0,01	0,04
Negative Control		0,01	0,04
Buffer		0,00	0,01
Buffer		0,00	0,00
Positive Control		0,62	1,23
Positive Control		0,64	1,24
Inoculation Experiment 4			
Maris Otter 1	+	1,00	1,64
Maris Otter 2	+	1,03	1,68
Maris Otter 3	+	0,71	1,35
Maris Otter 4	+	0,95	1,63
Maris Otter 5	+	0,72	1,37
Maris Otter 6	+	0,94	1,59
Negative Control		0,02	0,04
Negative Control		0,02	0,05
Buffer		0,01	0,02
Buffer		0,01	0,03
Positive Control		0,85	1,54
Positive Control		0,83	1,53
Inoculation Experiment 5			
Maris Otter 1	+	0,95	1,67
Maris Otter 2	+	1,02	1,72
Maris Otter 3	+?	0,75	1,49
Maris Otter 4	+	0,63	1,32
Maris Otter 5	+	1,03	1,74
Negative Control		0,01	0,03
Negative Control		0,01	0,03
Buffer		0,00	0,00
Buffer		0,00	0,01
Positive Control		0,87	1,62
Positive Control		0,85	1,61

Table 10-9: BaYMV resistance tests in M2 generation: Phenotyping and genotyping data for selected plants of target motifs 2 and 4 in 'Igr1' and 'Golden Promise' genetic background (continued for 3 pages)

Plant	symptom assessment	ELISA Extinction E405		Cas9 PCR	Sanger Sequencing target motif
		30'	60'		
IG4TM2_P6					
target motif 2					
IG4TM2_P6_20	-	0,01	0,02	+	chimeric
IG4TM2_P6_21	-	0,01	0,02	+	chimeric
IG4TM2_P6_22	-	0,01	0,02	+	58 bp Del.
IG4TM2_P6_23	-	0,01	0,02	-	58 bp Del.
IG4TM2_P6_24	-	0,02	0,03	+	chimeric
IG4TM2_P6_25	-	0,01	0,03	-	heterozygous/ chimeric
IG4TM2_P6_26	-	0,01	0,02	+	chimeric
IG4TM2_P6_27	-	0,02	0,03	+	58 bp Del.
IG4TM2_P6_28	-	0,02	0,03	+	58 bp Del.
IG4TM2_P6_29	-	0,02	0,03	+	chimeric
IG4TM2_P6_30	-	0,01	0,03	+	chimeric
IG4TM2_P6_31	-	0,01	0,03	+	heterozygous/ chimeric
IG4TM2_P6_32	-	0,01	0,03	+	chimeric
IG4TM2_P6_33	-	0,01	0,02	+	chimeric
IG4TM2_P6_34	-	0,02	0,03	+	n.a.
IG4TM2_P6_35	-	0,02	0,03	+	n.a.
IG4TM2_P6_36	-	0,02	0,03	+	58 bp Del.
IG4TM2_P6_37	-	0,02	0,03	+	58 bp Del.
IG4TM2_P6_38	-	0,02	0,03	+	58 bp Del.
IG4TM2_P6_39	-	0,02	0,03	+	58 bp Del.
IG4TM2_P6_40	-	0,02	0,03	+	chimeric/ heterozygous
IG4TM2_P6_41	-	0,02	0,03	-	58 bp Del.
IG4TM2_P6_42	-	0,02	0,03	+	chimeric
IG4TM2_P6_43	-	0,02	0,03	+	n.a.
IG6TM2_P2					
IG6TM2_P2_41	-	0,02	0,03	+	22 bp Del.
IG6TM2_P2_42	-	0,02	0,03	+	22 bp Del.
IG6TM2_P2_43	-	0,02	0,03	+	22 bp Del.
IG6TM2_P2_44	-	0,02	0,03	+	22 bp Del.
IG6TM2_P2_45	-	0,02	0,03	+	22 bp Del.
IG6TM2_P2_46	-	0,02	0,03	+	22 bp Del.
IG6TM2_P2_47	-	0,02	0,03	+	22 bp Del.
IG6TM2_P2_48	-	0,02	0,03	+	22 bp Del.
IG6TM2_P2_51	-	0,02	0,03	+	22 bp Del.
IG6TM2_P2_53	-	0,02	0,03	+	22 bp Del.
IG6TM2_P2_54	-	0,02	0,03	+	22 bp Del.
IG6TM2_P2_58	-	0,01	0,02	+	22 bp Del.
IG6TM2_P2_63	-	0,02	0,03	+	22 bp Del.
GPTM2_P11					

10. Anhang – Supplementary Material Chapter 4: Targeted Mutagenesis of *PDIL5-1*

GPTM2_P11_21	-	0,01	0,02	+	1 bp Ins
GPTM2_P11_22	-	0,02	0,02	-	1 bp Ins
GPTM2_P11_23	-	0,02	0,03	-	1 bp Ins
GPTM2_P11_24	-	0,01	0,02	+	heterozygous/ chimeric
GPTM2_P11_25	-	0,01	0,02	+	heterozygous/ chimeric
GPTM2_P11_26	-	0,01	0,01	+	1 bp Ins.
GPTM2_P11_27	-	0,01	0,01	+	heterozygous/ chimeric
GPTM2_P11_28	-	0,01	0,02	+	heterozygous/ chimeric
GPTM2_P11_29	-	0,01	0,02	+	3 bp Ins. (CGT)
GPTM2_P11_30	-	0,01	0,02	+	heterozygous/ chimeric
GPTM2_P11_31	-	0,01	0,02	+	heterozygous/ chimeric
GPTM2_P11_32	-	0,01	0,02	+	3 bp Ins (CGT)
GPTM2_P11_33	-	0,01	0,02	+	3 bp Ins (CGT)
GPTM2_P11_34	-	0,01	0,02	+	3 bp Ins (CGT)
GPTM2_P11_35	-	0,02	0,03	+	1 bp Ins.
GPTM2_P11_36	-	0,02	0,03	+	3 bp Ins (CGT)
GPTM2_P11_37	-	0,02	0,02	+	heterozygous/ chimeric
GPTM2_P11_38	-	0,01	0,02	+	heterozygous/ chimeric
GPTM2_P11_39	-	0,01	0,02	+	heterozygous/ chimeric
GPTM2_P11_40	-	0,01	0,02	+	1 bp Ins.
GPTM2_P11_41	-	0,02	0,03	+	1 bp Ins.
GPTM2_P11_42	-	0,02	0,02	+	heterozygous/ chimeric
GPTM2_P11_43	-	0,02	0,03	+	heterozygous/ chimeric
GPTM2_P11_44	-	0,01	0,02	+	heterozygous/ chimeric
GPTM4_P5					target motif 4
GPTM4_P5_21	-	0,01	0,02	+	heterozygous/ chimeric
GPTM4_P5_22	-	0,01	0,02	-	ATC (I) -> TAC (Y)
GPTM4_P5_23	-	0,02	0,03	+	heterozygous/ chimeric
GPTM4_P5_24	-	0,01	0,02	+	heterozygous/ chimeric
GPTM4_P5_25	-	0,01	0,02	+	heterozygous/ chimeric
GPTM4_P5_26	-	0,01	0,02	+	heterozygous/ chimeric
GPTM4_P5_27	-	0,01	0,02	+	heterozygous/ chimeric
GPTM4_P5_28	-	0,01	0,02	+	heterozygous/ chimeric
GPTM4_P5_29	-	0,01	0,02	+	heterozygous/ chimeric
GPTM4_P5_30	-	0,01	0,02	-	ATC (I) -> TAC (Y)
GPTM4_P5_31	-	0,01	0,01	-	ATC (I) -> TAC (Y)
GPTM4_P5_32	-	0,01	0,01	+	heterozygous/ chimeric
GPTM4_P5_33	-	0,01	0,01	+	heterozygous/ chimeric
GPTM4_P5_34	-	0,01	0,02	+	n.a.
GPTM4_P5_35	-	0,01	0,02	+	heterozygous/ chimeric
GPTM4_P5_36	-	0,00	0,01	+	heterozygous/ chimeric
GPTM4_P5_37	-	0,00	0,01	-	ATC (I) -> TAC (Y)
GPTM4_P5_38	-	0,01	0,01	+	heterozygous/ chimeric
GPTM4_P5_39	-	0,00	0,01	+	heterozygous substitution
GPTM4_P5_40	-	0,00	0,01	+	heterozygous/ chimeric

10. Anhang – Supplementary Material Chapter 4: Targeted Mutagenesis of *PDIL5-1*

GPTM4_P5_41	-	0,01	0,01	+	n.a.
GPTM4_P5_42	-	0,00	0,01	+	n.a.
GPTM4_P5_43	-	0,01	0,01	+	heterozygous/ chimeric
GPTM4_P5_44	-	0,01	0,01	+	heterozygous/ chimeric

Statistics

Igri: Thousand Grain Weight:

summary Igri TGW data

genotype	TGW
Igri_wild_type: 8	Minimum: 28.20
IGTM2_heterozgous: 16	1st Quantil.: 39.25
IGTM2_homozygous: 33	Median: 46.10
IGTM2_un-mutated: 9	Mean: 44.59
	3rd Quantil.: 49.65
	Maximum: 55.10

ANOVA

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Squares	F value	Pr(>F)
genotype	3	108.9	36.31	0.914	0.44
Residuals	62	2464.2	39.75		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**'
0.01 '*' 0.05

Post Hoc Test

Tukey multiple comparisons of means
95% family-wise confidence level

\$genotype

	difference	lower	upper	p adj
IGTM2_heteroz-Igri	-2.625000	-9.832208	4.582208	0.7716122
IGTM2_homoz-Igri	-3.946212	-10.505495	2.613071	0.3926761
IGTM2_unmu-Igri	-3.836111	-11.923804	4.251581	0.5964242
IGTM2_homoz-IGTM2_heteroz	-1.321212	-6.391674	3.749250	0.9013235
IGTM2_unmu-IGTM2_heteroz	-1.211111	-8.146250	5.724028	0.9672027
IGTM2_unmu-IGTM2_homoz	0.110101	-6.149013	6.369215	0.9999636

Igri: Grain Number per Plant

summary Igri Grain Number data

genotype	grain_number
Igri_wild_type: 8	Minimum.: 22.0
IGTM2_heterozgous: 16	1st Quantil: 88.0
IGTM2_homozygous: 33	Median: 168.5
IGTM2_un-mutated: 9	Mean : 156.0
	3rd Quantil: 214.8
	Maximum: 311.0

ANOVA

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Squares	F value	Pr(>F)	
genotype	3	38217	12739	1.906	0.138	
Residuals	62	414484	6685			

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**'
0.01 '*' 0.05

Post Hoc Test

Tukey multiple comparisons of
means
95% family-wise confidence
level

\$genotype

	difference	lower	upper	p adj
IGTM2_heteroz-Igri	-73.25000	-166.72159	20.22159	0.1747197
IGTM2_homoz-Igri	-74.12500	-159.19353	10.94353	0.1089812
IGTM2_unmu-Igri	-53.90278	-158.79353	50.98797	0.5309521
IGTM2_homoz-IGTM2_heteroz	-0.87500	-66.63474	64.88474	0.9999842
IGTM2_unmu-IGTM2_heteroz	19.34722	-70.59586	109.29030	0.9412339
IGTM2_unmu-IGTM2_homoz	20.22222	-60.95336	101.39780	0.9124434

Golden Promise: Thousand Grain Weight:

summary Golden Promise TGW data

genotype	TGW
GPTM2_heterozygous: 28	Minimum: 10.60
GPTM4_heterozygous: 24	1st Quantil: 25.40
GPTM1_heterozygous: 21	Median: 28.70
GP_un-mutated: 17	Mean: 28.07
GPTM2_homozygous: 14	3rd Quantil: 31.50
GPTM1_homozygous: 12	Maximum: 37.10
GPTM4_homozygous_I79Y: 5	
GPTM4_homozygous_KO: 8	
GP_wild-type: 8	

ANOVA

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Squares	F value	Pr(>F)	
genotype	8	511	63.82	2.527	0.0138	*
Residuals	128	3233	25.26			

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05

Post Hoc Test

Tukey multiple comparisons of means
95% family-wise confidence level

\$genotype

	difference	lower	upper	p adj
GP_unmu-Golden_Promise	-4.64338235	-11.4425231	2.155758	0.4412824
GPTM1_heteroz-Golden_Promise	-3.78035714	-10.3690284	2.808314	0.6751627
GPTM1_homoz-Golden_Promise	-4.44583333	-11.6840714	2.792405	0.5888274
GPTM2_heteroz-Golden_Promise	-1.25535714	-7.6127745	5.102060	0.9994487
GPTM2_homoz-Golden_Promise	1.25535714	-5.7730322	8.283746	0.9997379
GPTM4_heteroz-Golden_Promise	-3.56666667	-10.0407436	2.907410	0.7216781
GPTM4_homoz_I79Y-Golden_Promise	-2.69750000	-11.7380564	6.343056	0.9900487
GPTM4_homoz_KO-Golden_Promise	-4.68750000	-12.6165925	3.241593	0.6384477
GPTM1_heteroz-GP_unmu	0.86302521	-4.3107931	6.036843	0.9998430
GPTM1_homoz-GP_unmu	0.19754902	-5.7815727	6.176671	1.0000000
GPTM2_heteroz-GP_unmu	3.38802521	-1.4878913	8.263942	0.4167760
GPTM2_homoz-GP_unmu	5.89873950	0.1754482	11.622031	0.0379682
GPTM4_heteroz-GP_unmu	1.07671569	-3.9503589	6.103790	0.9990026
GPTM4_homoz_I79Y-GP_unmu	1.94588235	-6.1219220	10.013687	0.9976699
GPTM4_homoz_KO-GP_unmu	-0.04411765	-6.8432584	6.755023	1.0000000

10. Anhang – Supplementary Material Chapter 4: Targeted Mutagenesis of *PDIL5-1*

GPTM1_homoz-GPTM1_heteroz	-0.66547619	-6.4041320	5.073180	0.9999903
GPTM2_heteroz-GPTM1_heteroz	2.52500000	-2.0528637	7.102864	0.7203829
GPTM2_homoz-GPTM1_heteroz	5.03571429	-0.4358794	10.507308	0.0973746
GPTM4_heteroz-GPTM1_heteroz	0.21369048	-4.5248486	4.952230	1.0000000
GPTM4_homoz_I79Y-GPTM1_heteroz	1.08285714	-6.8083875	8.974102	0.9999645
GPTM4_homoz_KO-GPTM1_heteroz	-0.90714286	-7.4958141	5.681528	0.9999635
GPTM2_heteroz-GPTM1_homoz	3.19047619	-2.2811175	8.662070	0.6555948
GPTM2_homoz-GPTM1_homoz	5.70119048	-0.5373862	11.939767	0.1024650
GPTM4_heteroz-GPTM1_homoz	0.87916667	-4.7275484	6.485882	0.9999016
GPTM4_homoz_I79Y-GPTM1_homoz	1.74833333	-6.6928303	10.189497	0.9992182
GPTM4_homoz_KO-GPTM1_homoz	-0.24166667	-7.4799047	6.996571	1.0000000
GPTM2_homoz-GPTM2_heteroz	2.51071429	-2.6800952	7.701524	0.8411449
GPTM4_heteroz-GPTM2_heteroz	-2.31130952	-6.7226494	2.100030	0.7731949
GPTM4_homoz_I79Y-GPTM2_heteroz	-1.44214286	-9.1413576	6.257072	0.9996266
GPTM4_homoz_KO-GPTM2_heteroz	-3.43214286	-9.7895602	2.925274	0.7432892
GPTM4_heteroz-GPTM2_homoz	-4.82202381	-10.1550736	0.511026	0.1104717
GPTM4_homoz_I79Y-GPTM2_homoz	-3.95285714	-12.2147824	4.309068	0.8490812
GPTM4_homoz_KO-GPTM2_homoz	-5.94285714	-12.9712465	1.085532	0.1699539
GPTM4_homoz_I79Y P-GPTM4_heteroz	0.86916667	-6.9266543	8.664988	0.9999929
GPTM4_homoz_KO-GPTM4_heteroz	-1.12083333	-7.5949103	5.353244	0.9997924
GPTM4_homoz_KO-GPTM4_homoz_I79Y	-1.99000000	-11.0305564	7.050556	0.9987850

Golden Promise: Grain Number per Plant

summary Golden Promise Grain Number data

genotype	grain_number
GPTM2_heterozygous: 28	Minimum: 8.0
GPTM4_heterozygous: 24	1st Quantil: 165.0
GPTM1_heterozygous: 21	Median: 237.0
GP_un-mutated: 17	Mean: 225.9
GPTM2_homozygous: 14	3rd Quantil: 287.0
GPTM1_homozygous: 12	Maximum: 460.0
GPTM4_homozygous_I79Y: 5	
GPTM4_homozygous_KO: 8	
GP_wild-type: 8	

ANOVA

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Squares	F value	Pr(>F)	
genotype	8	156434	19554	2.448	0.0169	*
Residuals	128	1022417	7988			

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05

10. Anhang – Supplementary Material Chapter 4: Targeted Mutagenesis of *PDIL5-1*

Post Hoc Test

Tukey multiple comparisons of means

95% family-wise confidence level

\$genotype

	difference	lower	upper	p adj
GP_unmu-Golden_Promise	-71.272059	-192.189263	49.645145	0.6421735
GPTM1_heteroz-Golden_Promise	-4.005952	-121.180127	113.168222	1.0000000
GPTM1_homoz-Golden_Promise	1.041667	-127.684527	129.767860	1.0000000
GPTM2_heteroz-Golden_Promise	18.196429	-94.865083	131.257940	0.9998802
GPTM2_homoz-Golden_Promise	49.446429	-75.547775	174.440632	0.9438434
GPTM4_heteroz-Golden_Promise	-35.708333	-150.844541	79.427874	0.9871949
GPTM4_homoz_I79Y-Golden_Promise	-9.025000	-169.803964	151.753964	1.0000000
GPTM4_homoz_KO-Golden_Promise	-26.625000	-167.637480	114.387480	0.9996038
GPTM1_heteroz-GP_unmu	67.266106	-24.746056	159.278268	0.3458999
GPTM1_homoz-GP_unmu	72.313725	-34.020105	178.647556	0.4472662
GPTM2_heteroz-GP_unmu	89.468487	2.754267	176.182708	0.0375855
GPTM2_homoz-GP_unmu	120.718487	18.934394	222.502581	0.0081366
GPTM4_heteroz-GP_unmu	35.563725	-53.838719	124.966170	0.9420634
GPTM4_homoz_I79Y-GP_unmu	62.247059	-81.232299	205.726416	0.9073127
GPTM4_homoz_KO-GP_unmu	44.647059	-76.270145	165.564263	0.9622632
GPTM1_homoz-GPTM1_heteroz	5.047619	-97.009721	107.104959	1.0000000
GPTM2_heteroz-GPTM1_heteroz	22.202381	-59.211212	103.615974	0.9945464
GPTM2_homoz-GPTM1_heteroz	53.452381	-43.855475	150.760237	0.7248525
GPTM4_heteroz-GPTM1_heteroz	-31.702381	-115.973456	52.568694	0.9578969
GPTM4_homoz_I79Y-GPTM1_heteroz	-5.019048	-145.358433	135.320338	1.0000000
GPTM4_homoz_KO-GPTM1_heteroz	-22.619048	-139.793222	94.555127	0.9995335
GPTM2_heteroz-GPTM1_homoz	17.154762	-80.153094	114.462618	0.9997622
GPTM2_homoz-GPTM1_homoz	48.404762	-62.543264	159.352788	0.9045616
GPTM4_heteroz-GPTM1_homoz	-36.750000	-136.460881	62.960881	0.9626661
GPTM4_homoz_I79Y-GPTM1_homoz	-10.066667	-160.185915	140.052582	0.9999999
GPTM4_homoz_KO-GPTM1_homoz	-27.666667	-156.392860	101.059527	0.9989773
GPTM2_homoz-GPTM2_heteroz	31.250000	-61.064337	123.564337	0.9776960
GPTM4_heteroz-GPTM2_heteroz	-53.904762	-132.356863	24.547339	0.4326521
GPTM4_homoz_I79Y-GPTM2_heteroz	-27.221429	-164.145719	109.702861	0.9994206
GPTM4_homoz_KO-GPTM2_heteroz	-44.821429	-157.882940	68.240083	0.9431661
GPTM4_heteroz-GPTM2_homoz	-85.154762	-179.998728	9.689204	0.1159758
GPTM4_homoz_I79Y-GPTM2_homoz	-58.471429	-205.403068	88.460211	0.9419358
GPTM4_homoz_KO-GPTM2_homoz	-76.071429	-201.065632	48.922775	0.6009930
GPTM4_homoz_I79Y-GPTM4_heteroz	26.683333	-111.959020	165.325687	0.9995436
GPTM4_homoz_KO-GPTM4_heteroz	9.083333	-106.052874	124.219541	0.9999995
GPTM4_homoz_KO-GPTM4_homoz_I79Y	-17.600000	-178.378964	143.178964	0.9999938

10.3. Supplementary Material Chapter 5: Base Editing of Bymovirus Susceptibility factor *EIF4E* in Winter Barley

10.3.1. S1: *HvEIF4E* coding Sequence and Target Motifs

*EIF4E*_wild-type_cds

M A E D T E T R P A S A G A E E R E E G E I A
ATGGCGGAGGACACGGAGACGAGGCCCGCGTCGGCGGGCGCGGAGGAGGGAGGGGGAGATCGCG

D D G D G S A A A A A G R V S A H P L E N A W
GACGACGGAGACGGGTCCGCGGGCGGGCGGCCGGGCGCGTCAGCGCCCACCCTCTGGAGAACGCCTGG

Target motif CDA1

T F W F D N P Q G K S R A V A W G S T I H P I
ACCTTCTGGTTCGACAACCCGACGGGCAAGTCCCGGGCGGTGGCCTGGGGGAGCACCATCCACCCCATC

H T F S T V E D F W S L Y N N I H H P S K L N
CACACCTTCTCCACCGTCGAGGACTTCTGGAGCCTTTACAACAATATTCATCACCCCTAGCAAGTTGAAT

V G A D F H C F K D K I E P K W E D P I C A N
GTTGGAGCCGACTTCCATTGCTTCAAGGATAAGATTGAGCCAAAATGGGAAGACCCCATTTGTGCCAAT

Target motif ADA2 CDA3

G G K W T I S C G K G K S D T F W L H T L L A
GGCGGTAAATGGACCATCAGTTGTGGCAAAGGGAAATCTGACACATTTTGGTTGCATACTTTGCTGGCA

Tar-

L I G E Q F D F G D E I C G A V V S V R K N Q
TTGATTGGTGAACAATTGCACTTTGGTGATGAAATTTGCGGAGCAGTCGTCAGCGTGCGTAAGAACCAG

get motif CDA4

E R V A I W T K N A A N E T A Q I S I G K Q W
GAAAGAGTAGCTATCTGGACTAAAAATGCTGCCAATGAAACTGCTCAGATAAGCATCGGTAAGCAGTGG

Target motif ADA5

K E F L D Y K D S I G F V V H E D A K R S D K
AAGGAGTTTCTGGACTACAAGGACTCCATTGGATTTCGTCGTTTCATGAGGATGCTAAGAGGTCCGACAAA

G A K N R Y T V *
GGCGCCAAGAACCGCTACACGGTTTGA

10.3.2. Table S1: Oligonucleotide Sequences

Table 10-10: Oligonucleotide sequences of primers and gRNAs

Name	5'→3' sequence
Primer	
TM_CDA1_f_NGS	GACGACGGAGACGGGTC
TM_CDA1_r_NGS	GATGGGGTGGATGGTGCTC
TM_ADA2_CDA3_f_NGS	CATCACCTAGCAAGTTGAATG
TM_ADA2_CDA3_r_NGS	GTATGCAACCAAAATGTGTCAG
TM_CDA4_f_NGS	GTTGCTGGCATTGATTGGTG
TM_CDA4_r_NGS	GAATACATACCTGAGCAGTTTC
TM_ADA5_f_NGS	CAGCATGTATTTGTTTCTAAGC
TM_ADA5_r_NGS	CCCAGCGTATCGGTGATAGC
TM_CDA1_f_Sanger	CTTGGTGTGTCTACTACTACTAG
TM_CDA1_r_Sanger	GAAGGTAGGAAACCCTGGCG
TM_ADA2_CDA3_CDA4_f_Sanger	GTCTTCAGCAGGTTATTTGC
TM_ADA2_CDA3_CDA4_r_Sanger	GTTAAGGGTGCTGCATACATC
TM_ADA5_f_Sanger	GTACTCCACTGGGTGGCAAG
TM_ADA5_r_Sanger	GCAATTCACAGCAACACATG
cas9_f	TTTAGCCCTGCCTTCATACG
cas9_r	TTAATCATGTGGGCCAGAGC
hpt_f	CACGATCGGCTCTAGATCGG
hpt_r	CGGGAGATGCAATAGGTCAG
gRNA oligos	
EIF4E_CDA1_fw	TGGC AGTCCCGGGCGGTGGCCTGG
EIF4E_CDA1_rv	AAAC CCAGGCCACCGCCCGGACT
EIF4E_ADA2_fw	TGGC GGTAATGGACCATCAGTTG
EIF4E_ADA2_rv	AAAC CAACTGATGGTCCATTTACC
EIF4E_CDA3_fw	TGGC GGACCATCAGTTGTGGCAAA
EIF4E_CDA3_rv	AAAC TTTGCCACAACCTGATGGTCC
EIF4E_CDA4_fw	TGGC ACCAGGAAAGAGTAGCTATC
EIF4E_CDA4_rv	AAAC GATAGCTACTCTTTCCTGGT
EIF4E_ADA5_fw	TGGC ACTGGACTACAAGGACTCCAT
EIF4E_ADA5_rv	AAAC ATGGAGTCCTTGTAGTCCAGT

10. Anhang – Supplementary Material Chapter 5: Base Editing of *EIF4E*

BRP44_1_P1_22	+	+	wt	Ser + Arg
BRP44_1_P1_23	+	+	heterozygous TT/CC + CGG	Phe/Ser + Arg
BRP44_1_P1_24	+	+	heterozygous TCC/T + CGG	Ser/Ser + Arg
BPR49/1_P1			M1: 18 % mutated NGS reads	
BPR49_1_P1_1	+	+	homozygous TTC + CGG	Phe + Arg
BPR49_1_P1_2	+	+	homozygous TTC + CGG	Phe + Arg
BPR49_1_P1_3	+	+	homozygous TTC + CGG	Phe + Arg
BPR49_1_P1_4	+	+	homozygous TTC + CGG	Phe + Arg
BPR49_1_P1_5	+	+	homozygous TTC + CGG	Phe + Arg
BPR49_1_P1_6	+	+	homozygous TTC + CGG	Phe + Arg
BPR49_1_P1_7	+	+	homozygous TTC + CGG	Phe + Arg
BPR49_1_P1_8	+	+	homozygous TTC + CGG	Phe + Arg
BPR49_1_P1_9	+	+	homozygous TTC + CGG	Phe + Arg
BPR49_1_P1_10	+	+	homozygous TTC + CGG	Phe + Arg
BPR49_1_P1_11	+	+	homozygous TTC + CGG	Phe + Arg
BPR49_1_P1_12	+	+	homozygous TTC + CGG	Phe + Arg
BPR49_1_P1_13	+	+	homozygous TTC + CGG	Phe + Arg
BPR49_1_P1_14	+	+	homozygous TTC + CGG	Phe + Arg
BPR49_1_P1_15	+	+	homozygous TTC + CGG	Phe + Arg
BPR49_1_P1_16	+	+	homozygous TTC + CGG	Phe + Arg
BPR49_1_P1_17	+	+	homozygous TTC + CGG	Phe + Arg
BPR49_1_P1_18	-	-	-	died
BPR49_1_P1_19	+	+	homozygous TTC + CGG	Phe + Arg
BPR49_1_P1_20	+	+	heterozygous TTC + C/TGG	Ser + Arg/ Trp
BPR49_1_P1_21	+	+	homozygous TTC + CGG	Phe + Arg
BPR49_1_P1_22	-	-	-	died
BPR49_1_P1_23	+	+	homozygous TTC + CGG	Phe + Arg
BPR49_1_P1_24	+	+	homozygous TTC + CGG	Phe + Arg
BPR49/1_P3			M1: 56 % mutated NGS reads	
BPR49_1_P3_1	+	+	heterozygous TTC + C/TGG	Phe + Arg/ Trp
BPR49_1_P3_2	+	+	homozygous TTC + CGG	Phe + Arg
BPR49_1_P3_3	+	+	homozygous TTC + CGG	Phe + Arg
BPR49_1_P3_4	+	+	homozygous TTC + CGG	Phe + Arg
BPR49_1_P3_5	+	+	InDel heterozygous	
BPR49_1_P3_6	+	+	homozygous TTC + CGG	Phe + Arg
BPR49_1_P3_7	+	+	homozygous TTC + CGG	Phe + Arg
BPR49_1_P3_8	+	+	sequencing failed	
BPR49_1_P3_9	+	+	heterozygous TTC/T + CGG	Phe/Phe + Arg
BPR49_1_P3_10	+	+	homozygous TTC + CGG	Phe + Arg
BPR49_1_P3_11	+	+	homozygous TTC + CGG	Phe + Arg
BPR49_1_P3_12	+	+	homozygous TTC + CGG	Phe + Arg
BPR49_1_P3_13	-	+	homozygous TTC + CGG	Phe + Arg
BPR49_1_P3_14	+	+	homozygous TTC + CGG	Phe + Arg
BPR49_1_P3_15	+	+	homozygous TTC + CGG	Phe + Arg
BPR49_1_P3_16	+	+	heterozygous TTC + CGG + GCG + GTG + GC/TC	Phe + Arg + Ala + Val + Ala/Val

10. Anhang – Supplementary Material Chapter 5: Base Editing of *EIF4E*

BPR43_2_P6_15	+	+	wt	Lys
BPR43_2_P6_16	+	+	wt	Lys
BPR43_2_P6_17	+	+	wt	Lys
BPR43_2_P6_18	+	+	wt	Lys
BPR43_2_P6_19	+	+	wt	Lys
BPR43_2_P6_20	+	+	wt	Lys
BPR43_2_P6_21	+	+	wt	Lys
BPR43_2_P6_22	+	-	wt	Lys
BPR43_2_P6_23	+	+	wt	Lys
BPR43_2_P6_24	+	+	wt	Lys
BPR43/2_P9 M1: 16 % mutated NGS reads				
BPR43_2_P9_1	+	+	wt	Lys
BPR43_2_P9_2	+	+	wt	Lys
BPR43_2_P9_3	+	+	wt	Lys
BPR43_2_P9_4	+	+	wt	Lys
BPR43_2_P9_5	+	+	wt	Lys
BPR43_2_P9_6	+	+	wt	Lys
BPR43_2_P9_7	+	+	wt	Lys
BPR43_2_P9_8	+	+	wt	Lys
BPR43_2_P9_9	+	+	wt	Lys
BPR43_2_P9_10	+	+	wt	Lys
BPR43_2_P9_11	+	+	wt	Lys
BPR43_2_P9_12	+	+	wt	Lys
BPR43_2_P9_13	+	+	wt	Lys
BPR43_2_P9_14	+	+	wt	Lys
BPR43_2_P9_15	+	+	wt	Lys
BPR43_2_P9_16	+	+	wt	Lys
BPR43_2_P9_17	+	+	wt	Lys
BPR43_2_P9_18	+	+	wt	Lys
BPR43_2_P9_19	+	+	wt	Lys
BPR43_2_P9_20	+	+	wt	Lys
BPR43_2_P9_21	+	+	wt	Lys
BPR43_2_P9_22	-	-		died
BPR43_2_P9_23	+	+	wt	Lys
BPR43_2_P9_24	+	+	wt	Lys
BPR43/2_P14 M1: 8 % mutated NGS reads				
BPR43_2_P14_1	+	+	wt	Lys
BPR43_2_P14_2	+	+	wt	Lys
BPR43_2_P14_3	+	+	wt	Lys
BPR43_2_P14_4	+	+	wt	Lys
BPR43_2_P14_5	+	+	wt	Lys
BPR43_2_P14_6	+	+	wt	Lys
BPR43_2_P14_7	+	+	wt	Lys
BPR43_2_P14_8	+	+	wt	Lys
BPR43_2_P14_9	+	+	wt	Lys

10. Anhang – Supplementary Material Chapter 5: Base Editing of *EIF4E*

BPR43_2_P14_10	+	+	wt	Lys
BPR43_2_P14_11	+	+	wt	Lys
BPR43_2_P14_12	+	+	sequencing failed	Lys
BPR43_2_P14_13	+	+	wt	Lys
BPR43_2_P14_14	+	+	wt	Lys
BPR43_2_P14_15	+	+	wt	Lys
BPR43_2_P14_16	+	+	wt	Lys
BPR43_2_P14_17	+	+	wt	Lys
BPR43_2_P14_18	+	+	wt	Lys
BPR43_2_P14_19	+	+	wt	Lys
BPR43_2_P14_20	+	+	wt	Lys
BPR43_2_P14_21	+	+	wt	Lys
BPR43_2_P14_22	+	+	wt	Lys
BPR43_2_P14_23	+	+	wt	Lys
BPR43_2_P14_24	+	-	wt	Lys
BPR47/2_P1 M1: 7 % mutated NGS reads				
BPR47_2_P1_1	+	-	wt	Lys
BPR47_2_P1_2	+	+	wt	Lys
BPR47_2_P1_3	+	+	wt	Lys
BPR47_2_P1_4	+	+	wt	Lys
BPR47_2_P1_5	+	+	wt	Lys
BPR47_2_P1_6	+	+	wt	Lys
BPR47_2_P1_7	+	+	wt	Lys
BPR47_2_P1_8	+	+	wt	Lys
BPR47_2_P1_9	+	+	wt	Lys
BPR47_2_P1_10	+	+	wt	Lys
BPR47_2_P1_11	-	-	-	died
BPR47_2_P1_12	+	+	wt	Lys
BPR47_2_P1_13	+	+	wt	Lys
BPR47_2_P1_14	+	+	wt	Lys
BPR47_2_P1_15	+	+	wt	Lys
BPR47_2_P1_16	+	+	wt	Lys
BPR47_2_P1_17	+	+	wt	Lys
BPR47_2_P1_18	+	+	wt	Lys
BPR47_2_P1_19	+	+	wt	Lys
BPR47_2_P1_20	+	+	wt	Lys
BPR47_2_P1_21	+	+	wt	Lys
BPR47_2_P1_22	+	+	wt	Lys
BPR47_2_P1_23	-	-	wt	Lys
BPR47_2_P1_24	+	+	wt	Lys
lgri wild-type control				
lgri_wt_1	-	-	wt	Lys
lgri_wt_2	-	-	wt	Lys
lgri_wt_3	-	-	wt	Lys
lgri_wt_4	-	-	wt	Lys

10. Anhang – Supplementary Material Chapter 5: Base Editing of *EIF4E*

BPR42_3_P4_3	+	+	homozygous AAC + GAG	Asn + Glu
BPR42_3_P4_4	+	+	homozygous AAC + GAG	Asn + Glu
BPR42_3_P4_5	+	+	homozygous AAC + GAG	Asn + Glu
BPR42_3_P4_6	+	+	heterozygous AAC/T + GAG	Asn/ Asn + Glu
BPR42_3_P4_7	+	+	heterozygous AAC + C/TAG	Asn + Gln/*
BPR42_3_P4_8	-	-	homozygous AAC + GAG	Asn + Gln
BPR42_3_P4_9	-	-	-	died
BPR42_3_P4_10	-	-	-	died
BPR42_3_P4_11	-	-	-	died
BPR42_3_P4_12	+	+	heterozygous AAC/T + TAG	Asn/Asn + *
BPR46_P2 M1: 43 % mutated NGS reads				
BPR46_P2_1	+	+	heterozygous AAC + C/GAG	Asn + Gln/ Glu
BPR46_P2_2	+	+	heterozygous AAC + C/TAG	Asn + Gln/*
BPR46_P2_3	+	+	heterozygous InDel	
BPR46_P2_4	+	+	heterozygous AAC + C/TAG	Asn + Gln/*
BPR46_P2_5	+	+	heterozygous AAC + C/GAG	
BPR46_P2_6	+	+	heterozygous InDel	
BPR46_P2_7	+	-	heterozygous AAC + C/TAG	Asn + Gln/*
BPR46_P2_8	+	+	heterozygous AAC/T + C/TAG	Asn/Asn + Gln/*
BPR46_P2_9	+	-	heterozygous AAC + C/TAG	Asn + Gln/*
BPR46_P2_10	+	-	heterozygous AAC/G + C/TAG	Asn/Lys + Gln/*
BPR46_P2_11	+	-	heterozygous AAC + C/TAG	Asn + Gln/*
BPR46_P2_12	+	+	homozygous AAC + TAG	Asn + *
BPR46_P2_13	+	+	heterozygous AAC + C/TAG	Asn + Gln/*
BPR46_P2_14	+	+	heterozygous AAT + T/GAG	Asn + */ Glu
BPR46_P2_15	+	+	heterozygous AAC + C/TAG	Asn + Gln/*
BPR46_P2_16	+	+	chimeric AAC/T + C/TAG	Asn + Gln/*
BPR46_P2_17	-	-	-	died
BPR46_P2_18	+	+	chimeric AAC + C/TAG	Asn + Gln/*
BPR46_P2_19	+	+	homozygous AAC + TAG	Asn + *
BPR46_P2_20	+	+	heterozygous AAC + C/GAG	Asn + Gln/ Glu
BPR46_P2_21	+	+	chimeric AAC + C/TAG	Asn + Gln/*
BPR46_P2_22	+	+	heterozygous InDel	
BPR46_P2_23	+	+	chimeric AAC + C/TAG	Asn + Gln/*
BPR46_P2_24	+	+	heterozygous InDel	
BPR46_P3 M1: 44 % mutated NGS reads				
BPR_46_P3_1	+	+	heterozygous AAC/T + TAG	Asn/Asn + *
BPR_46_P3_2	+	+	heterozygous InDel	
BPR_46_P3_3	+	+	heterozygous InDel	
BPR_46_P3_4	+	+	heterozygous AAC/T + TAG	Asn/Asn + *
BPR_46_P3_5	-	-	-	died
BPR_46_P3_6	+	+	homozygous -8 bp	
BPR_46_P3_7	+	+	heterozygous AAC/G + GAG	Asn/Lys + Glu
BPR_46_P3_8	+	+	heterozygous AAC + T/GAG	Asn + */ Glu
BPR_46_P3_9	-	-	-	died

10. Anhang – Supplementary Material Chapter 5: Base Editing of *EIF4E*

BPR_46_P3_10	+	+	heterozygous AAC + T/GAG	Asn + <i>*</i> / <i>Glu</i>
BPR_46_P3_11	+	+	homozygous AAC + TAG	Asn + <i>*</i>
BPR_46_P3_12	+	-	homozygous AAC + GAG	Asn + <i>Glu</i>
BPR_46_P3_13	+	+	heterozygous AAC + T/GAG	Asn + <i>*</i> / <i>Glu</i>
BPR_46_P3_14	-	+	homozygous AAC + TAG	Asn + <i>*</i>
BPR_46_P3_15	+	+	chimeric AAC/T + T/GAG	Asn/Asn + <i>*</i> / <i>Glu</i>
BPR_46_P3_16	+	+	heterozygous AAC/G + TAG	Asn/ <i>Lys</i> + <i>*</i>
BPR_46_P3_17	-	-	heterozygous AAC/G + TAG	Asn/ <i>Lys</i> + <i>*</i>
BPR_46_P3_18	+	+	homozygous AAC + TAG	Asn + <i>*</i>
BPR_46_P3_19	+	+	heterozygous InDel	
BPR_46_P3_20	+	+	homozygous AAC + TAG	Asn + <i>*</i>
BPR_46_P3_21	+	+	heterozygous AAC + T/GAG	Asn + <i>*</i> / <i>Glu</i>
BPR_46_P3_22	-	-	-	died
BPR_46_P3_23	+	+	heterozygous AAC/T + GAG	Asn/Asn + <i>Glu</i>
BPR_46_P3_24	+	+	homozygous AAC + TAG	Asn + <i>*</i>
BPR46_P5 M1: 50 % mutated NGS reads				
BPR_46_P5_1	-	-	heterozygous AAC/T + G/TAG	Asn/ Asn + <i>Glu</i> / <i>*</i>
BPR_46_P5_2	+	+	heterozygous AAC + T/GAG	Asn + <i>*</i> / <i>Glu</i>
BPR_46_P5_3	+	+	homozygous AAC + GAG	Asn + <i>Glu</i>
BPR_46_P5_4	+	+	heterozygous AAC/T + T/GAG	Asn/Asn + <i>*</i> / <i>Glu</i>
BPR_46_P5_5	+	+	heterozygous AAC + T/GAG	Asn + <i>*</i> / <i>Glu</i>
BPR_46_P5_6	+	-	heterozygous AAC + T/GAG	Asn + <i>*</i> / <i>Glu</i>
BPR_46_P5_7	+	+	heterozygous AAC/T + T/GAG	Asn/Asn + <i>*</i> / <i>Glu</i>
BPR_46_P5_8	+	+	heterozygous InDel	
BPR_46_P5_9	+	+	heterozygous AAC + T/GAG	Asn + <i>*</i> / <i>Glu</i>
BPR_46_P5_10	+	+	heterozygous AAC/T + TAG	Asn/Asn + <i>*</i>
BPR_46_P5_11	+	+	homozygous AAC + TAG	Asn + <i>*</i>
BPR_46_P5_12	+	+	homozygous AAC + TAG	Asn + <i>*</i>
lgri wild-type control				
lgri_wt_1	-	-	wt	Asn + Gln
lgri_wt_2	-	-	wt	Asn + Gln
lgri_wt_3	-	-	wt	Asn + Gln
lgri_wt_4	-	-	wt	Asn + Gln
lgri_wt_5	-	-	wt	Asn + Gln
lgri_wt_6	-	-	wt	Asn + Gln
lgri_wt_7	-	-	wt	Asn + Gln
lgri_wt_8	-	-	wt	Asn + Gln
lgri_wt_9	-	-	wt	Asn + Gln
lgri_wt_10	-	-	wt	Asn + Gln
lgri_wt_11	-	-	wt	Asn + Gln
lgri_wt_12	-	-	wt	Asn + Gln

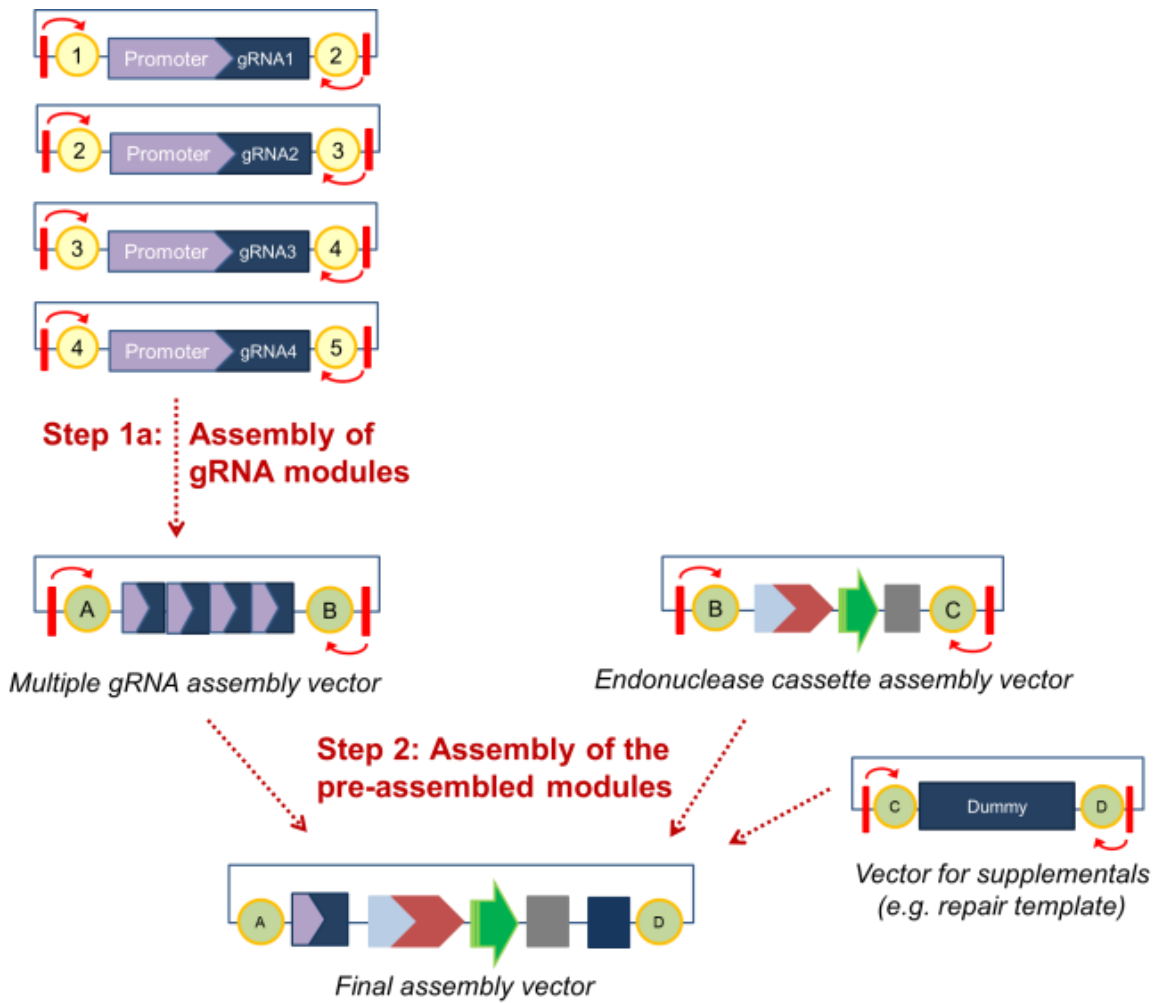
10. Anhang – Supplementary Material Chapter 5: Base Editing of *EIF4E*

BPR52_P3_13	+	+	wt	Asp
BPR52_P3_14	-	+	wt	Asp
BPR52_P3_15	+	+	wt	Asp
BPR52_P3_16	+	(+)	wt	Asp
BPR52_P3_17	+	-	wt	Asp
BPR52_P3_18	+	+	wt	Asp
BPR52_P3_19	+	+	wt	Asp
BPR52_P3_20	+	+	wt	Asp
BPR52_P3_21	-	-	wt	Asp
BPR52_P3_22	-	+	wt	Asp
BPR52_P3_23	+	+	wt	Asp
BPR52_P3_24	-	-	wt	Asp
BPR53_P5 M1: 3 % mutated NGS reads				
BPR53_P5_1	+	-	wt	Asp
BPR53_P5_2	+	-	wt	Asp
BPR53_P5_3	+	-	wt	Asp
BPR53_P5_4	+	-	wt	Asp
BPR53_P5_5	+	-	wt	Asp
BPR53_P5_6	+	-	wt	Asp
BPR53_P5_7	+	-	wt	Asp
BPR53_P5_8	+	-	wt	Asp
BPR53_P5_9	+	-	wt	Asp
BPR53_P5_10	+	-	wt	died
BPR53_P5_11	+	-	wt	Asp
BPR53_P5_12	+	-	wt	Asp
BPR53_P5_13	+	-	wt	Asp
BPR53_P5_14	+	-	wt	Asp
BPR53_P5_15	+	-	wt	Asp
BPR53_P5_16	+	-	wt	Asp
BPR53_P5_17	-	-	wt	Asp
BPR53_P5_18	-	-	wt	died
BPR53_P5_19	-	-	wt	Asp
BPR53_P5_20	-	-	wt	Asp
BPR53_P5_21	-	-	wt	Asp
BPR53_P5_22	-	-	wt	Asp
BPR53_P5_23	-	-	wt	Asp
BPR53_P5_24	-	-	wt	Asp
BPR63_P2 M1: 5 % mutated NGS reads				
BPR63_P2_1	+	+	wt	Asp
BPR63_P2_2	-	-	wt	Asp
BPR63_P2_3	+	+	wt	Asp
BPR63_P2_4	+	-	wt	Asp
BPR63_P2_5	+	+	wt	Asp
BPR63_P2_6	+	+	wt	Asp
BPR63_P2_7	+	+	wt	Asp

10. Anhang – Supplementary Material Chapter 5: Base Editing of *EIF4E*

BPR63_P2_8	(+)	-	wt	died
BPR63_P2_9	+	+	wt	Asp
BPR63_P2_10	+	+	wt	Asp
BPR63_P2_11	(+)	-	wt	Asp
BPR63_P2_12	+	+	wt	Asp
BPR63_P2_13	-	-	wt	Asp
BPR63_P2_14	-	-	wt	Asp
BPR63_P2_15	-	-	wt	Asp
BPR63_P2_16	+	-	wt	Asp
BPR63_P2_17	-	-	wt	Asp
BPR63_P2_18	+	+	wt	Asp
BPR63_P2_19	+	+	wt	Asp
BPR63_P2_20	-	-	wt	Asp
BPR63_P2_21	-	-	wt	Asp
BPR63_P2_22	-	-	wt	Asp
BPR63_P2_23	+	-	wt	Asp
BPR63_P2_24	-	-	wt	died
lgri wild-type control				
lgri_wt_1	-	-	wt	Asp
lgri_wt_2	-	-	wt	Asp
lgri_wt_3	-	-	wt	Asp
lgri_wt_4	-	-	wt	Asp
lgri_wt_5	-	-	wt	Asp
lgri_wt_6	-	-	wt	Asp
lgri_wt_7	-	-	wt	Asp
lgri_wt_8	-	-	wt	Asp
lgri_wt_9	-	-	wt	Asp
lgri_wt_10	-	-	wt	Asp
lgri_wt_11	-	-	wt	Asp
lgri_wt_12	-	-	wt	Asp

10.3.4. Standard Protocol for Base Editing with the CasCADE modular Vector System



Materials

- LB medium (liquid and solid) with 100 mg/l Ampicillin (referred to as LB + Amp) and 100 mg/l Spectinomycin (LB + Spec)
- NEB enzymes (for cloning): BsaI, Esp3I, T4 DNA ligase
- Restriction enzymes for test digests: e.g. EcoRV
- E. coli strain like e.g. XL1B or DH5 α (optional: specific strain for ccdB selection, e.g. DH10B)
- Optional: IPTG + xGal for Blue/White selection
- Plasmid DNA Mini Prep Kit
- Gel Purification Kit
- Agarose gel electrophoresis
- sterile bench
- PCR cyclor
- Primers:

IK70 fw	GCTCACATGTTCTTTCCTGCG
IK71 rev	CACCTGACGTCTAAGAAACC

Before starting:

- Set up a cloning plan with names of newly created vectors and how these are to be implemented in the CASCADE system.
- Create your vectors *in silico*. Identify and avoid (or be at least aware of) any Esp3I and BsaI cleavage sites in your target-specific gRNA sequences and to find appropriate restriction enzymes for test digests.

1. Completion of gRNA modules with target motif-specific sequences

I. Backbone digestion for monocots (pIK1-pIK4, OsU3-Promoter)

Digestion with BsaI	→ ~1h at 37°C
DNA	500 ng
Cut Smart	2.5 µl
BsaI	1 µl
Nuc.free water	to 25 µl

Run a gel electrophoresis. Two bands will appear, the bigger one is needed for further cloning.

→ Cut out fragments: pIK1 - pIK4 at 2484 bp

II. Insert

- Create DNA oligos with your target motif-specific sequence (Fwd and Rev) and order them like standard primers with specific overhangs
- For sticky ends, add overhangs to the oligo sequence as follows:
 - o Fwd-oligo, monocots: 5'-TGGC-3' (pIK1 - pIK4)
 - o Rev-oligo: 5'-AAAC-3' for all modules available
- Dilute oligos 1:10 (final concentration 10 µM) → Combine each 5 µl of Fwd- and Rev-Oligo and do a hybridization of both by denaturation and slow cooling as follows:
- Cyclor program for hybridization of oligos:

95°C for 5 min	
Ramp to 85°C	1 °C/s
Ramp to 25 °C	0.1 °C/s
10 °C	∞

gRNA modules	
with OsU3 promoter (barley, maize)	pIK1 (Position1) pIK2 (Position2) pIK3 (Position3) pIK4 (Position4)

III. Cloning

- Ligation:

Vector (digested, gel purified)	20 ng
Insert (hybridized oligos)	1.5 µl
T4 Ligase Buffer	1 µl
T4 DNA Ligase	0.5 µl
didest H ₂ O	to 10 µl

→ incubation 20-30 min at room temperature

- Heat shock transformation into *E. coli*: add 5 µl of ligated plasmid to competent cells, 30 min incubation on ice → 45 seconds heat shock at 42 °C → shortly on ice → add 500 µl SOC medium → 1h at 37 °C, shaking → on LB + Amp plate o/n at 37 °C
- For Blue/White selection, plate on LB + Amp + IPTG + xGal
(**Attention:** B/W selection does not work with pSH325 and pSH326)

IV. Analysis

- Colony PCR with primers IK70 + IK71
(GoTaq polymerase, annealing temperature: 50 °C, positive: 630 bp, negative: 1100 bp)
Attention: This colony PCR does not work with pSH325 and pSH326. Using these ones, colony PCR with the forward oligo and primer SH10_r will give a 571 bp band for positive colonies and no band for negative colonies.
- Take 3 colonies into liquid culture (LB + Amp) o/n at 37 °C, shaking
- MiniPrep following the kit's protocol
- Sanger sequencing with primer IK71 or SH10_r (only for pSH325 and pSH326 backbone)

1a) Assembly of gRNA modules/ Golden Gate reaction #1 [10 µl reaction]

Reaction:

- 75 ng of each gRNA module vector
- 15 ng of destination vector (gRNA assembly vector, according to the number of gRNAs to be combined)
- 0.5 µl Esp3I (BsmBI) (NEB)
- 0.5 µl T4 DNA ligase (NEB)
- 1.0 µl 10x Cut Smart buffer
- 0.5 µl ATP (10 mM/ NEB)
- ddH₂O up to 10 µl total reaction volume

Attention:

Molecule ratios are crucial for successful Golden Gate reactions. Therefore, stick carefully to the given DNA amounts.

Run thermocycler (GoldenGate_BsmB1):

37 °C for 5 min	} 10x
22 °C for 10 min	
37 °C for 30 min	
75 °C for 15 min	
4 °C	∞

Heat shock transformation into E. coli: use 4-5 µl of Golden Gate reaction

30' ice → 45" 42 °C → ice → add 500 µl SOC → 1 h at 37 °C, shaking → on LB + Spec plate o/n at 37 °C

Optional: The gRNA assembly vector contains a *ccdB* cassette. Only when the assembly works properly, growth under selection should be possible (works with non-resistant E. coli strains only, e.g. DH10B). However, selection for *ccdB* activity is not necessary in the standard procedure.

Colonies can be analyzed via colony PCR using the primer pair: IK70 + reverse oligo of the last gRNA, amplicon size differs between 500 bp (1 gRNA) to 1900 bp (4 gRNAs).

- Take 3 colonies into liquid culture (LB + Spec) o/n at 37 °C
- MiniPrep
- Sanger sequencing with primer IK70; for assemblies of more than two gRNAs, use IK71 in addition

gRNA assembly vectors for 1 to 4 gRNAs	pIK19 (4-gRNA assembly) pIK61 (3-gRNA assembly) pIK60 (2-gRNA assembly) pIK89 (1-gRNA assembly)
--	--

2) Assembly of pre-assembled modules/ Golden Gate reaction #3 [10 µl reaction]

Reaction:

- 75ng of each module vector
- 15 ng of destination vector
- 0.5 µl BsaI (NEB)
- 0.5 µl T4 DNA ligase (NEB)
- 1.0 µl 10x Cut Smart buffer
- 0.5 µl ATP (10 mM)
- ddH₂O up to 10 µl total reaction volume

Hint:

Molecule ratios are crucial for successful Golden Gate reactions. Therefore, stick carefully to the given DNA amounts.

Run thermocycler (GoldenGate BsaI)

37 °C for 5 min	} 10x
22 °C for 10 min	
37 °C for 30 min	
75 °C for 15 min	
4 °C	∞

Transformation into *E. coli*: take 4-5 µl of Golden Gate reaction

30' ice → 45" 42 °C → ice → add 500 µl SOC → 1h at 37 °C → on LB + Amp plate o/n at 37 °C

Optional: The final assembly vector contains a ccdB cassette. Only when the assembly works properly, growth should be possible (works with non-resistant *E. coli* strains only, like DH10B). Selection for ccdB activity is not necessary in the standard procedure.

Plasmids can be analyzed in a test digestion using EcoRV (Eco32I) which usually gives you several bands depending on your specific plasmid.

Optional: Sequencing of plasmids with IK70, the forward oligo of the last gRNA and/or with IK71 (if more than 2 gRNA modules were used).

Auxiliary (necessary for final cloning step)	Unit	pIK155 (dummy with multiple cloning site)
Pre-assembled expression units for monocots	endonuclease	pME41 (ZmUbi-full-nCas9/CDA1-doubleTerminator) pSH273 (ZmUbi-full-nCas9/ADA-doubleTerminator)
Assembly destination vectors		pIK48 (inverted SfiI sites)

10.4. Anhang zu Kapitel 7: Erfahrungen aus der Wissenschaftskommunikation

Linksammlung zu 7.1 und 7.2 (in der Reihenfolge ihrer Nennung)

Website Progressive Agrarwende: <https://progressive-agrarwende.org/>

Website Öko-Progressives Netzwerk e.V.: <https://oekoprog.org/>

Twitter-Profil „@ForscherRobert“: <https://twitter.com/ForscherRobert>

erforschtCRISPR-YouTube-Video „Wenn die Gerste Grippe hat“: <https://kurzelinks.de/Gerste-Grippe>

transgen.de-YouTube-Video „Was macht ihr da eigentlich im Labor? Junge Pflanzenforschung in Deutschland“: <https://kurzelinks.de/transgen-junge-forscher>

bioökonomie.de-YouTube-Video „DIE BIOPIONIERE | Der Gerstenkönner – Robert Hoffie will die Ernährung der Menschheit sichern“: <https://kurzelinks.de/Gerstenkoenner>

Tweet der Grünen Sachsen-Anhalt zum Besuch am IPK: <https://kurzelinks.de/GrueneLSA-ForscherRobert>

#FactoryWisskomm Bericht: <https://kurzelinks.de/FactoryWisskomm-Ergebnisse>

#FactoryWisskomm Handlungsperspektiven: <https://kurzelinks.de/FactoryWisskomm-Handlungsperspektiven>

SWR2-Bericht „Die Gen-Schere verändert die Pflanzenzucht“: <https://kurzelinks.de/SWR2-Genschere>

Live-Interview Deutschlandfunk Kultur zur Ausstellung „Was essen wir morgen“ im Deutschen Hygiene-Museum Dresden: <https://kurzelinks.de/DKultur-Interview-Essen-morgen>

Interview Deutschlandfunk zur Studie der EU-Kommission zum Gentechnikrecht: <https://kurzelinks.de/DLF-Interview-EU-Studie>

Mitteldeutsche Zeitung, Portrait: <https://kurzelinks.de/Streiter-Gen-Gerste>

Leibniz-Magazin, Portrait: <https://kurzelinks.de/Leibniz-ForscherRobert>

ZEITonline, Reportage: <https://kurzelinks.de/ZEIT-Gerste-Gentechnik>

W wie Wissen: <https://kurzelinks.de/WwieWissen-Genschere>

heute-journal up:date: <https://kurzelinks.de/heute-journal-Gentechnik-Klima>

MaiThinkX Folge 10: Gentechnik: <https://kurzelinks.de/MaiThinkX-Gentechnik>

Ask Mai Anything zu Folge 10: <https://kurzelinks.de/AMA-Gentechnik>

Danksagung

Die Doktorandenzeit ist ein besonderer, intensiver und lehrreicher Lebensabschnitt. Er ist geprägt von der konzentrierten Arbeit am eigenen Forschungsthema, aber genauso vom Kennenlernen, der Zusammenarbeit und dem Austausch mit vielen unterschiedlichen Menschen. An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich in dieser prägenden Zeit begleitet haben.

Mein Dank gilt dabei besonders Jochen Kumlehn, der mir die Chance gegeben hat, in seiner Arbeitsgruppe mein Promotionsthema zu bearbeiten. Jochen stand mir über die gesamte Zeit hilfreich zur Seite und hat mich auch über die eigentliche Forschung hinaus bei meinen Wisskomm-Aktivitäten immer unterstützt und gefördert.

Ich bedanke mich bei allen Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppe Pflanzliche Reproduktionsbiologie für das kollegiale und freundschaftliche Miteinander, die zahlreichen Aktivitäten, auch nach Feierabend, und den fachlichen und privaten Austausch in allen Lebenslagen. Besonders zu nennen sind hier Sindy Chamas, Krishna Mohan Pathi, Diaa El-Din Daghma und Pooja Satpathy für die tolle Gemeinschaft im Büro 1.13 sowie Ingrid Otto, Carola Bollmann, Sabine Sommerfeld und Claudia Baumann für die praktische Unterstützung bei den Experimenten und insbesondere der Pflanzentransformation.

Die Pflanzenforschung wäre nichts ohne die gewissenhafte und zuverlässige Arbeit von Gärtnerinnen und Gärtnern. Deshalb möchte ich mich bei Enk Geyer und seinem Team, hier insbesondere bei Kerstin Jacobs für die Pflege meiner Pflanzen bedanken.

Wie eingangs erläutert, ist Forschung Teamarbeit. Die hier vorgestellten Arbeiten fanden im Rahmen des BMBF-finanzierten Projektes „IdeMoDeResBar“ statt und ich danke allen Kolleginnen und Kollegen aus dem Projektkonsortium für die gute Zusammenarbeit über zwei Förderperioden. Ganz besonders sind dabei Dragan Perovic und Antje Habekuß vom Julius Kühn-Institut in Quedlinburg zu nennen, die sich fachkundig um die Virusresistenztests mit meinen Pflanzen gekümmert haben.

Alle der bisher genannten haben maßgeblich dazu beigetragen, dass die vorliegende Dissertation zustande gekommen ist. Für die Betreuung dieser Arbeit von Seiten der Leibniz Universität Hannover und für ihre Begutachtung möchte ich mich in aller Form bei Prof. Jens Boch und bei Prof. Edgar Maiß bedanken, sowie bei Prof. Traud Winkelmann für den Vorsitz der Promotionskommission.

Parallel zu dieser Arbeit konnte ich über die Forschung hinaus durch die Wissenschaftskommunikation ein verzweigtes Netzwerk aufbauen, das immer wieder auch in meine tägliche Arbeit zurückgespiegelt hat. Ganz besonders möchte ich mich hier bei meinen Mitstreiterinnen und Mitstreitern vom Öko-Progressiven Netzwerk e.V. bedanken. Ohne euch und unseren regelmäßigen, lehrreichen, vielschichtigen und humorvollen Austausch, hätte ich viele gute Wisskomm-Erfahrungen nicht machen können.

Diese Arbeit wäre nicht möglich gewesen ohne die vielfältige Unterstützung im Privaten von meinen Freunden und meiner Familie. Von ganzem Herzen bedanke ich mich bei meinen Eltern und Großeltern, die nicht nur mein frühes Interesse an Pflanzen geweckt, sondern mich auch liebevoll und mit ganzer Kraft auf dem gesamten Weg bis hierher begleitet und unterstützt haben. Meine tief empfundene Dankbarkeit gegenüber einem ganz besonderen Menschen kann ich kaum in Worte fassen. Wir haben uns im Labor kennengelernt, sind Kollegen geworden, Freunde, haben uns verliebt und geheiratet. Ich bin überzeugt, wir beide hätten unsere Dissertationen so nicht abschließen können ohne die beständige gegenseitige Unterstützung, ohne die Ruhe und Sicherheit, die wir füreinander schaffen, ohne den gemeinsamen Ausgleich zum Job im Privaten und ohne die produktive Zusammenarbeit im Institut. Danke für alles, liebe Iris.

Lebenslauf

Angaben zur Person

Name: Robert Eric Hoffie
Geboren am: 11. Juli 1991
Geboren in: Aschersleben
Kontakt: E-Mail: hoffier@ipk-gatersleben.de
Staatsangehörigkeit: deutsch

Berufliche Tätigkeiten

seit 11/2016 Wissenschaftlicher Mitarbeiter (Doktorand) am Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Nutzpflanzenforschung (IPK) Gatersleben, Arbeitsgruppe: Pflanzliche Reproduktionsbiologie; Forschungsthema: Etablierung von Virusresistenzen in Gerste mittels Genomeditierung

Ausbildung:

10/2016 Master of Science in Pflanzenbiotechnologie (Note: 1,4)
Leibniz Universität Hannover
Masterarbeit: „Charakterisierung von Histon-Lysin-Methyltransferasen in *Zea mays* mittels „Genome Editing““, praktischer Teil bei der KWS SAAT SE (Einbeck) (Note: 1,0)

10/2014 - 10/2016 Studium im Fach M. Sc. Pflanzenbiotechnologie
Leibniz Universität Hannover

09/2014 Bachelor of Science in Pflanzenbiotechnologie (Note 1,8)
Leibniz Universität Hannover
Bachelorarbeit: „Analysen zur epigenetischen Regulation photosynthetischer Gene in *Zea mays*“ (Note 1,3)

10/2011- 09/2014 Studium im Fach B. Sc. Pflanzenbiotechnologie
Leibniz Universität Hannover

06/2010 Abitur am Gymnasium Egelndorf (Note 1,7)

Kenntnisse

Sprachen
Deutsch Muttersprache
Englisch fließend

IT-Kenntnisse

MS Office	sehr gut
UGENE	sehr gut
Citavi	gut
R	Grundkenntnisse

Besondere Qualifikationen

10/2014 – 01/2015 Aktualisierung 02/2022	Fortbildungslehrgang nach § 15 Abs.2 Satz 1 Nr. 3 GenTSV „Gentechnische Sicherheit“
seit 10/2014	Pflanzenschutz-Sachkundenachweis gemäß §§ 9, 23 PflSchG
seit 08/2008	Führerschein Klasse B

Preise und Auszeichnungen

08/2018	Posterpreis, International Association of Plant Biotechnology Congress, Dublin
02/2020	Erster Preis für Wissenschaftskommunikation der Sektion Pflanzenphysiologie und Molekularbiologie der Deutschen Botanischen Gesellschaft

Wissenschaftskommunikation

Seit 01/2017	Twitter-Kanal @ForscherRobert (ca. 4700 Follower, Stand 07/2022): Mikro-Blogging über Pflanzenzüchtung, Pflanzenforschung, Gentechnik, Landwirtschaft und öffentliche Diskussionen zu diesen Themen
Seit 02/2017	Zahlreiche Vorträge, Führungen, öffentliche Diskussionsveranstaltungen, Interviews mit verschiedenen Medien (Zeitung, Radio, TV, online) zusätzlich zur Forschungsarbeit im Bereich Genomeditierung an Nutzpflanzen

Ehrenamtliches Engagement und Mitgliedschaften

seit 09/2021	Mitglied im Vorstand der Gesellschaft für Pflanzenbiotechnologie
seit 02/2019	Mitbegründer der Initiative „Progressive Agrarwende“ und 2. Vorsitzender des Öko-Progressiven Netzwerk e.V.
01/2017 – 11/2019	Mitglied des PhD Student Board am IPK Gatersleben
04/2012 – 08/2016	Mitglied der Fachschaft Gartenbauwissenschaften und Pflanzenbiotechnologie, Uni Hannover (ab 2013 als gewählter Schriftführer), währenddessen Mitglied mehrerer Hochschulgremien

Sonstige Mitgliedschaften: Verband Biologie, Biowissenschaften & Biomedizin Deutschland (VBIO), Deutsche Botanische Gesellschaft, Gesellschaft für Pflanzenzüchtung, Gewerkschaft Erziehung und Wissenschaft, Grenzdenkmalverein Hötensleben, Freiwillige Feuerwehr Gatersleben

Wissenschaftliche Publikationen

ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-1013-6027>

Hoffie R.E., Perovic D., Habekuß A., Ordon F., Kumlehn J., Novel Resistance to the Bymovirus BaMMV established by Targeted Mutagenesis of the PDIL5-1 Susceptibility Gene in Barley. *Plant Biotechnology Journal*, **2023**, 21(2): 331-341. <https://doi.org/10.1111/pbi.13948> Online publication ahead of print October 2022.

Hoffie R.E., Otto I., Perovic D., Budhagatapalli N., Habekuß A., Ordon F., Kumlehn J., Targeted Knockout of Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E Confers Bymovirus Resistance in Winter Barley. *Frontiers in Genome Editing*, **2021**, 3: 784233. <https://doi.org/10.3389/fgeed.2021.784233>

Hisano H., **Hoffie R.E.**, Abe F., Munemori H., Matsuura T., Endo M., Mikami M., Nakamura S., Kumlehn J., Sato K., Regulation of Germination by Targeted Mutagenesis of Grain Dormancy Genes in Barley. *Plant Biotechnology Journal*, **2022**, 20(1): 37-46. <https://doi.org/10.1111/pbi.13692> Online publication ahead of print September 2021

Hisano H., Abe F., **Hoffie R.E.**, Kumlehn J., Targeted genome modifications in cereal crops. *Breeding Science*, **2021**, 71: 405-416. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.21019>

Hoffie R.E., Otto I., Hisano H., Kumlehn J., Site-Directed Mutagenesis in Barley Using RNA-Guided Cas Endonucleases During Microspore-Derived Generation of Doubled Haploids. In: Segui-Simarro J.M. (eds) Doubled Haploid Technology. *Methods in Molecular Biology*, **2021**, Vol 2287/1: 199-214. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1315-3_9

Beier S., Ulpinnis C., Schwalbe M., Münch T., **Hoffie R.**, Koeppel I., Hertig C., Budhagatapalli N., Hiekel S., Pathi K.M., Hensel G., Grosse M., Chamas S., Gerasimova S., Kumlehn J., Scholz U., Schmutz T., *Kmasker Plants* – a Tool for assessing complex Sequence Space in Plant Species. *The Plant Journal*, **2020**, 102: 631-642. <https://doi.org/10.1111/tpj.14645>

Koeppel I., Hertig C., **Hoffie R.**, Kumlehn J., Cas Endonuclease Technology—A Quantum Leap in the Advancement of Barley and Wheat Genetic Engineering. *International Journal of Molecular Sciences* **2019**, 20: 2647. <https://doi.org/10.3390/ijms20112647>

Gerasimova S.V., Korotkova A.M., Hertig C., Hiekel S., **Hoffie R.**, Budhagatapalli N., Otto I., Hensel G., Shumny V.K., Kochetov A.V., Kumlehn J., Khlestkina E.K., Targeted Genome Modification in Protoplasts of a highly regenerable Siberian Barley Cultivar using RNA-guided Cas9 Endonuclease. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. **2018**; 22(8): 1033-1039. <https://doi.org/10.18699/VJ18.447>