



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

TUM School of Life Sciences

Lehrstuhl für Pflanzenzüchtung

Erstellung einer hochauflösenden Karte für das dominante Verzweigungsgen *Ddw1* im Winterroggen (*Secale cereale* L.)

Eva-Maria Braun

Vollständiger Abdruck der von der TUM School of Life Sciences der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Ralph Hückelhoven

Prüfende/-r der Dissertation: 1. Prof. Dr. Chris-Carolin Schön
2. apl. Prof. Dr. Volker Mohler

Die Dissertation wurde am 26.11.2020 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die TUM School of Life Sciences am 10.06.2021 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	V
Summary	VII
Liste der Abkürzungen	IX
Abbildungsverzeichnis	XI
Tabellenverzeichnis	XII
Veröffentlichungen aus dieser Doktorarbeit	XIII
1. EINLEITUNG	1
1.1. Herkunft und Eigenschaften von Roggen	1
1.2. Züchterische Anpassung der Wuchshöhe bei Getreide	1
1.2.1. Gibberelline und deren Einfluss auf das Pflanzenwachstum	3
1.2.2. Kurzstrohgene in Getreide	6
1.3. Das <i>Dominant dwarfing gene Ddw1</i> im Winterroggen	7
1.4. Genomische Ressourcen zur Markerentwicklung im Roggen	9
1.4.1. Vergleichende Kartierung im Roggen	9
1.4.2. Roggen-spezifische Sequenzressourcen	9
1.5. Ziele der vorliegenden Arbeit	10
2. MATERIAL UND METHODEN	14
2.1. Pflanzenmaterial	14
2.1.1. <i>R1620 x R347/1</i> Kartierungspopulation für <i>Ddw1</i>	14
2.1.2. Markerressourcen zur Selektion des Pflanzenmaterials	15
2.1.3. Rekombinante Inzuchtlinien (<i>L2039-N x DH</i>)	15
2.1.4. Weizen-Roggen-Additionslinien	17
2.1.5. Bestimmung von Polymorphismen in Genen der GA-Biosynthese und des GA-Signallings (Kandidatengenansatz)	17
2.2. Analyse der Wuchshöhe in der Kartierungspopulation	17
2.2.1. Phänotypische Datenerhebung	17
2.2.2. Phänotypische Datenanalyse	18
2.3. Markerentwicklung für die Kartierung von <i>Ddw1</i>	18
2.3.1. Transkript-basierte Markerentwicklung	19
2.3.2. Positions-basierte Markerentwicklung	23
2.4. Molekulare Analysen	24
2.4.1. Extraktion der genomischen DNA	24
2.4.2. PCR- basierte Markeranalyse	25
2.5. Genetische Kopplungsanalyse	27
2.5.1. Genetische Kartierung in der <i>Ddw1</i> -Kartierungspopulation <i>R1620 x R347/1</i>	27

2.5.2.	Erstellung der hochauflösenden Karte für <i>Ddw1</i>	27
3.	ERGEBNISSE	28
3.1.	Analyse der Wuchshöhe der Kartierungspopulation für <i>Ddw1</i>	28
3.1.1.	Spaltungsdaten des dominant-rezessiv vererbten <i>Ddw1</i> -Gens	28
3.1.2.	Effekt von <i>Ddw1</i> auf Wuchshöhe und Tausendkorngewicht	29
3.1.3.	Validierung der Wuchshöhe in der Nachkommenschaft	29
3.2.	Charakterisierung von Chromosomenregionen durch Lokalisation von differentiellen Contigs aus dem NIB-Transkriptom	35
3.2.1.	Vergleichende Analyse eines Intervalls auf Chromosom 4R	35
3.2.2.	Vergleichende Analyse im Bereich des <i>Ddw1</i> -Gens auf Chromosom 5R	37
3.3.	Transkriptprofil in kurz- und langstrohigem Roggen	42
3.4.	Kandidatengenansatz für Gibberellin-Gene im Roggen	53
3.4.1.	Erstellung einer Übersicht und Kartierung von Gibberellin-Genen im Roggen	53
3.4.2.	Sequenzanalyse und phylogenetische Analysen der Gibberellinene im Roggen	57
3.5.	Feinkartierung von <i>Ddw1</i> im Winterroggen	65
3.5.1.	Markerentwicklung für <i>Ddw1</i>	65
3.5.2.	Feinkartierung von <i>Ddw1</i> in der <i>R1620</i> x <i>R347/1</i> F _{4:5} Population	67
3.5.3.	Kollinearität des <i>Ddw1</i> Locus zu <i>Triticum urartu</i> , <i>Aegilops tauschii</i> , <i>Triticum dicoccoides</i> und Weizen.....	67
3.5.4.	Der <i>Ddw1</i> Locus in der hochdichten Karte des Roggen-genoms.....	75
3.6.	Hochauflösende Kartierung des <i>Ddw1</i> Locus im Winterroggen	75
3.6.1.	Markeranreicherung für <i>Ddw1</i> über vergleichende Genkartierung im Weizen.....	76
3.6.2.	Hochauflösende Karte des <i>Ddw1</i> -Locus in der <i>R1620</i> x <i>R347/1</i> F _{5:6} -Population.....	78
4.	DISKUSSION	82
4.1.	Analyse der Wuchshöhe des Dominant dwarfing gene <i>Ddw1</i>	82
4.2.	Erstellung eines Transkriptprofils für <i>Ddw1</i>	83
4.2.1.	Vergleich der Expression in verschiedenen Organen der Roggenpflanze	83
4.2.2.	Abbildung der Transkriptdaten im Roggen-genom	84
4.2.3.	Interpretation der differentiellen Genanalyse in Bezug auf Zwergwuchs.....	86
4.3.	Strategien zur Feinkartierung des Dominant dwarfing gene <i>Ddw1</i>	89
4.3.1.	Markerentwicklung durch Mapping-by-Sequencing und vergleichende Kartierung.....	89
4.3.2.	Identifizierung einer GA2-Oxidase im Roggen	92
4.3.3.	Potential des Kandidatengenansatzes für Gibberellinene im Roggen.....	93
4.4.	Hochauflösende Kartierung von <i>Ddw1</i>	94
4.5.	Schlussfolgerung	96
5.	LITERATURVERZEICHNIS	97
6.	ANHANG	109

6.1. Abbildungen	109
6.2. Tabellen	114
7. DANKSAGUNG	138
8. LEBENSLAUF	139

Zusammenfassung

Reduzierte Wuchshöhe trägt zur Produktivitätssteigerung von Getreide durch reduzierte Lagerneigung und erhöhten Kornertrag bei. Winterroggen (*Secale cereale* L.) ist im Vergleich zu Weizen und Gerste die Getreideart mit dem größten Anteil an oberirdischer Biomasse im Verhältnis zum Kornertrag. Das Gibberellin (GA)-sensitive *Dominant dwarfing gene 1 (Ddw1)* Gen aus einer Pflanzengenetischen Ressource (PGR) könnte zur Reduktion der Wuchshöhe in Winterroggen-Elitelinien verwendet werden. Um dies züchterisch zu erreichen, ist die Markeranreicherung auf dem langen Arm von Chromosom 5R von zentraler Bedeutung.

Das Hauptziel dieser Arbeit war die Feinkartierung und die Erstellung einer hochauflösenden Karte von *Ddw1* im Roggen. Dazu wurde eine biparentale Population verwendet, die aus einer Kreuzung der kurzstrohigen Mutante *R1620* mit dem normalstrohigen Wildtyp *R347/1* erstellt wurde. Neue Marker wurden durch die Kombination der *bulk-segregant*-Analyse und Massensequenzierung von cDNA identifiziert. Um polymorphe Transkripte in der Zielregion von *Ddw1* zu finden, wurden homologe Sequenzen in den Sequenzressourcen von Roggen und verwandter Gräsergenome gesucht. Die Suche nach differentiell exprimierten Transkripten ergänzte die Identifizierung von Kandidatensequenzen. Außerdem wurde ein Kandidatengenansatz für mögliche Roggen-Orthologe bekannter Gene des GA-Biosynthesewegs und der GA-Signaltransduktion durchgeführt. Linienfamilien der F₄- und F₅-Generationen der Kartierungspopulation wurden mit neuen PCR-RFLP Markern genotypisiert. Linienfamilien der F_{4;5}- und F_{5;6}-Generationen sowie F_{6;7}-Genotypen wurden einjährig in einer Umwelt phänotypisiert.

Das Spaltungsverhältnis der Kartierungspopulation wies für Wuchshöhe auf ein einzelnes dominantes Gen hin. Die Datenanalyse der Wuchshöhe und des Tausendkorngewichts (TKG) zeigte, dass das dominante Allel den Effekt des rezessiven Allels maskiert, *Ddw1* jedoch nicht vollständig dominant wirkt. In dieser Studie wurden 36,13 Mbp exprimierte Roggengensequenzen erzeugt, die in 113547 Contigs mit durchschnittlicher Länge von 318 bp angeordnet wurden. Insgesamt konnten 10730 Contigs bekannten Sequenzen von Roggen zugeordnet werden. Die Untersuchung der genomweiten Expressionsprofile für *Ddw1* lieferte Hinweise, dass die größte Variation zwischen den Genotypen bei den Koleoptilen, den Ähren und bei den Halmen zu Beginn der Blüte besteht. Zwischen dem Halbzweig und dem normalstrohigen Genotyp wurden im Halm 186 differentiell exprimierte Transkripte identifiziert. Die Annotation und Analyse der Genontologien (GO) zeigte, dass GO aus den Bereichen Makromolekülmetabolismus, Hormonreaktionen, Wachstum und Entwicklung überrepräsentiert waren.

Die *Ddw1*-Region konnte mit neuen Markern angereichert werden, wodurch codominante Marker für die Selektion auf das homozygote Kurzstroh-Allel verfügbar wurden. In der hochdichten Karte *Lo7 x Lo225*¹ des Roggens wurde mit Ankermarkern das *Ddw1*-Intervall identifiziert. So konnten fünf Marker aus dem 600k-Array¹ entwickelt werden und in die genetische Karte von *Ddw1* integriert werden. Ebenso wurden zur Markerentwicklung homologe Gene in mit Roggen eng verwandten Genomen (*Aegilops tauschii*, *Triticum urartu*, *Triticum dicoccoides* und *Triticum aestivum* L.) identifiziert. Die am engsten gekoppelten *Ddw1*-Marker wurden in der zu Chromosom 5RL syntänen Genomregion 4L der Triticeae lokalisiert. In *Triticum dicoccoides* und *Triticum aestivum* konnten homologe Gene auf dem langen Arm der Chromosomen 4B und 5A identifiziert werden, in *Aegilops tauschii* auf Chromosom 4D und in *Triticum urartu* auf Chromosom 4A. Insgesamt wurden im Roggen 29 neu etablierte Marker am distalen Ende des Chromosoms 5R in einem 27,2 cM großen Bereich kartiert. Das Zielintervall wurde distal durch *MACE3* und proximal durch *Sc5R14198* auf insgesamt 0,4 cM eingengt. Durch die Feinkartierung wurde der mit *Ddw1* co-segregierende Marker *MACE4* identifiziert. Er repräsentiert ein im Halm der Kurzstroh-Mutante überexprimiertes Transkript der GA2-Oxidase und wurde benannt als *ScGA12ox12*.

ScGA2ox12 existiert in der *Lo7*-Roggensequenz, ist dort aber nicht chromosomal lokalisiert. Im *Ddw1*-Intervall von *Triticum aestivum*, *Aegilops tauschii* und *Triticum urartu* befindet sich dagegen ein kartiertes homologes Gen von *ScGA2ox12*. Bei der hochauflösenden Kartierung wurden drei Markerrekombinationen zwischen *MACE3* und *Ddw1* und vier zwischen *MACE4* und *Ddw1* beobachtet. Aufgrund von Rekombinationen zwischen *MACE4* und *Ddw1* wird *ScGA2ox12* jedoch als Kandidatengen für *Ddw1* ausgeschlossen. Da *MACE3* und *MACE4* ähnliche aber divergente Sequenzen haben und *ScGA2ox12a* bzw. *ScGA2ox12b* zugeordnet werden konnten, wurde die Hypothese aufgestellt, dass mindestens zwei paraloge Gene von *ScGA2ox12* am *Ddw1*-Locus existieren. Die in dieser Studie erstellte hochauflösende Karte weist drei zu *Ddw1* proximale und 42 distale Rekombinationen auf. Damit lässt sich durch den proximalen Marker *MACE3* und den distalen Marker *c15679* ein 35,3 kb langes Intervall in der Karte *Lo7 x Lo225* bestimmen.

Insgesamt konnte in dieser Arbeit ein großer Fortschritt hinsichtlich der Erkenntnisse über ein züchterisch interessantes Gen erreicht werden. Nach der bereits publizierten Feinkartierung² legt die Erstellung einer hochauflösenden Karte des *Ddw1*-Locus den Grundstein für eine zukünftige Isolierung des Gens im Roggen genom.

¹ Bauer et al. (2017)

² Braun et al. (2019)

Summary

Reduced height contributes to the increase of cereal productivity by reduced lodging and increased grain yield. Compared to wheat and barley, winter rye (*Secale cereale* L.) is the cereal species with the highest proportion of above-ground biomass in relation to grain yield. The gibberellin-sensitive *Dominant dwarfing gene 1 (Ddw1)* originating from a plant genetic resource could be used for reducing the height in winter rye elite lines. For achieving this aim by breeding, the marker enrichment on the long arm of chromosome 5R is a central aspect.

The main objective of this work was the high-resolution mapping of *Ddw1* in winter rye. For this, a biparental population was used, which was created by crossing the short straw mutant *R1620* with the normal straw wild type *R347/1*. New markers were identified using a method that combines bulk segregant analysis and mass sequencing of cDNA. For identifying polymorphic transcripts in the target region of *Ddw1*, the rye genome reference sequence and related grass genomes were searched for homologous sequences. The identification of candidate sequences was replenished by the search for differentially expressed transcripts. Moreover, a candidate gene approach was conducted to summarise potential rye orthologs of known genes of the GA biosynthesis and GA signal transduction pathway. Line families of the F_{4:5} and F_{5:6} generations of the mapping population were genotyped with novel PCR-RFLP markers. Line families of the F_{4:5} and F_{5:6} generations as well as the recombinant F_{6:7} genotypes were phenotyped in one environment.

With respect to plant height, the segregation ratio of the mapping population indicated a single dominant gene. Analysis of plant height and thousand grain weight (TGW) demonstrated that the dominant allele masks the effect of the recessive allele and that *Ddw1* has an incomplete dominant effect. In this study, 36.13 Mbp expressed rye sequences were generated, arranged in 113547 contigs with an average length of 318 bp. A total of 10730 contigs were assigned to known sequences of rye. The investigation of genome-wide expression profiles for *Ddw1* indicated that the highest variation between the genotypes exists in the coleoptiles, the ears and the culms at the beginning of flowering. Between the semi-dwarf and the normal growth genotype 186 differentially expressed transcripts were identified in the culm. Annotation and analysis of gene ontologies (GO) showed that GO of the categories macromolecular metabolism, hormone responses, growth and development were overrepresented.

The *Ddw1* region was enriched with new markers concurrently enabling the identification of codominant markers for the selection of the homozygous semi-dwarf allele. By using anchor markers, the *Ddw1* interval was identified in the high-density map *Lo7 x Lo225*¹ of rye. Five markers could be developed from the 600k array¹ and were integrated in the genetic map of *Ddw1*. Additionally,

homologous genes were identified in genomes closely related to rye (*Aegilops tauschii*, *Triticum urartu*, *Triticum dicoccoides* and *Triticum aestivum* L.) for marker development. Markers most closely linked to *Ddw1* were anchored in the genome region 4L of the Triticeae species, which is syntenic to rye chromosome 5RL. Homologous genes could be identified on the long arms of 4B and 5A in both *Triticum dicoccoides* and *Triticum aestivum*, on chromosome 4D in *Aegilops tauschii* and on chromosome 4A in *Triticum urartu*. In total 29 newly established markers were mapped on the distal end of chromosome 5R in a 27.2 cM large region. The target interval was narrowed down distally by *MACE3* and proximally by *Sc5R14198* to 0.4 cM. As a result of fine mapping the marker *MACE4* co-segregating with *Ddw1* was identified. It represents a GA2oxidase overexpressed in the semi-dwarf mutant culm and was named *ScGA2ox12*.

ScGA2ox12 is present in the *Lo7* rye sequence but has not been assigned to a physical rye chromosome. However, the chromosomes in wheat, *Aegilops tauschii*, *Triticum aestivum* and *Triticum urartu* carry the *Ddw1* interval possess a homologous gene of *ScGA2ox12*. By high-resolution mapping three recombinations between *MACE3* and *Ddw1* and four between *MACE4* and *Ddw1* were observed. However, *ScGA2ox12* can be excluded as a candidate gene for *Ddw1* because of recombination events between *MACE4* and *Ddw1*. As *MACE3* and *MACE4* representing *ScGA2ox12a* and *ScGA2ox12b*, respectively, have similar but divergent sequences, it was hypothesized that at least two paralogous genes of *ScGA2ox12* exist at the *Ddw1* locus. The high-resolution map established in this study contains three proximal and 42 distal recombinations to *Ddw1*. Thus, a 35.3 kb long interval can be determined in the map *Lo7* × *Lo225* using the proximal marker *MACE3* and the distal marker *c15679*.

In this study a fundamental progress in mapping of a gene which is very interesting for breeding was achieved. After publication of the fine mapping², the establishment of a high-resolution map of the *Ddw1* locus lays the foundations for a future isolation of the gene in the rye genome.

Liste der Abkürzungen

ARMS	<i>amplification-refractory mutation system</i>
BBCH	Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt und Chemische Industrie
BSA	Bovines Serumalbumin
bp	Basenpaar
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CAPS	<i>cleaved amplified polymorphic sequence</i> : gespaltene amplifizierte polymorphe Sequenz
Chr	Chromosom
cM	centiMorgan
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DEG	Differentiell exprimierte Gene
Ddw	<i>Dominant dwarfing gene</i> : Dominantes Verzweigungsgen
DH	Doppelt Haploide
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Deoxynucleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EP	Einzelpflanze
EST	<i>expressed sequence tag</i> : exprimierte sequenzmarkierte Stelle
F _x	Filialgeneration
FC	<i>fold change</i>
GA	Gibberellin
Gbp	Gigabasenpaar
GO	Gen-Ontologie
kb	Kilobasenpaare
LOD	<i>logarithm of the odds</i>
LIR	<i>Leucin repeat</i> : LRI Leucin-Heptadenmuster
M	Molgewicht
MACE	<i>massive analysis of cDNA ends</i> : Massensequenzierung von cDNA Enden
MAS	<i>marker-assisted selection</i> : markergestützte Selektion
Mb	Megabasenpaare
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NIB	<i>near-isogenic bulks</i> : nah-isogene Bulks
NIL	nah-isogene Linie
NGS	<i>next-generation sequencing</i> : Sequenziertechnologien der nächsten Generation
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> : Polymerasekettenreaktion
QTL	<i>quantitative trait locus</i>
RCBD	<i>randomized complete block design</i> : vollständig randomisiertes Blockdesign
RFLP	<i>restriction fragment length polymorphism</i> : Restriktionslängenpolymorphismus
RIL	Rekombinante Inzuchtlinien
RLE	Relative Log Expression
rlog	regularisierte logarithmische Transformation

RNA	Ribonukleinsäure
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i> : Einzelnukleotid-Polymorphismus
SRA	<i>Sequence Read Archive</i>
STS	<i>sequence-tagged site</i> : sequenzmarkierte Stelle
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TKG	Tausendkorngewicht
UTR	<i>untranslated region</i> : untranslatierter Bereich
WCA	<i>whole-chromosome-arms</i>
WGS	<i>whole-genome shotgun</i> : Schrotschuss-Methode
W-R-ADL	Weizen-Roggen-Additionslinie

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Der Biosyntheseweg der Gibberelline (GAs) (aus Achard und Genschik 2009).	4
Abbildung 2 Schema des Gibberellin (GA)-Signalübertragungsweges in Pflanzen (aus Achard und Genschik 2009).	5
Abbildung 3 Häufigkeitsverteilung in der für das <i>Ddw1</i> Gen spaltenden F _{5:6} Population (N=3929) für das Merkmal Wuchshöhe.....	28
Abbildung 4 Vergleich der Wuchshöhe zwischen den drei phänotypischen Klassen in der <i>R1620 x R347/1</i> F _{5:6} Population gestützt auf der Genotypisierung mit flankierenden <i>Ddw1</i> -Markern.	32
Abbildung 5 Vergleich des TKG zwischen den drei phänotypischen Klassen in der für <i>Ddw1</i> spaltenden <i>R1620 x R347/1</i> F _{5:6} Population.....	33
Abbildung 6 Wiederholung der Phänotypisierung der Wuchshöhe bei Nachkommen rekombinanter F _{5:6} Individuen und Validierung ihrer Einteilung in drei phänotypische Klassen.....	34
Abbildung 7 Häufigkeitsverteilung der Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP) abgebildet entlang der hochdichten Karte <i>Lo7 x Lo225</i> des Roggens	41
Abbildung 8 Hauptkomponentenanalyse der Expressionsdaten der normal- und kurzstrohigen nah-isogenen Bulks (NIB) in verschiedenen Organen des Roggens (modifiziert nach Braun et al. 2019). ..	42
Abbildung 9 Heatmap von 171 differentiell in normal- und kurzstrohigen NIB exprimierten Genen nach z-Transformation der relativen Veränderung der Genexpression und hierarchischer Clusteranalyse (modifiziert aus Braun et al. 2019)..	43
Abbildung 10 Kacheldiagramm der signifikant ($p < 0,05$) überrepräsentierten Genontologien, die biologische Prozesse beschreiben, innerhalb der differentiell exprimierten Roggentranskripte.	46
Abbildung 11 Kacheldiagramm der signifikant ($p < 0,05$) überrepräsentierten Genontologien der Kategorie molekulare Funktion innerhalb der differentiell exprimierten Roggentranskripte.....	47
Abbildung 12 Kartierung (in cM) von Genen der Gibberellinbiosynthese (<i>ScCPS1</i> , <i>ScCPS2</i> , <i>ScKS5</i> , <i>ScKAO</i> , <i>ScGA2ox6</i> , <i>ScGA2ox9</i> , <i>ScGA2ox12a</i> , <i>ScGA2ox12b</i>) und Gibberellinsignaltransduktion (<i>ScEL1</i> , <i>ScEL2</i> , <i>ScD1</i> , <i>ScGIDL2</i> , <i>ScGIDL6</i> , <i>ScSPY</i>) in der Roggen RIL-Population <i>L2039-N x DH</i> (adaptiert von Schwefel 2015, publiziert in Braun et al. 2019).....	54
Abbildung 13 Genstruktur der putativen Gene <i>ScGIDL2</i> , <i>ScSLR1</i> und <i>ScGA13ox1</i>	57
Abbildung 14 Phylogenetische Beziehungen der GA2oxidase Aminosäuresequenzen von Roggen (<i>Secale cereale</i> , Sc), Brotweizen (<i>Triticum aestivum</i> , Ta), Gerste (<i>Hordeum vulgare</i> , Hv), <i>Aegilops tauschii</i> (Aet), <i>Triticum urartu</i> (Tu), <i>Brachypodium distachyon</i> (Bd), Reis (<i>Oryza sativa</i> , Os) und <i>Arabidopsis thaliana</i> (At) (aus Braun et al. 2019)	60
Abbildung 15 Kartierung von <i>Ddw1</i> auf Chromosom 5RL in <i>R1620 x R347/1</i> (linke Karte) und der Zielbereich in der hochdichten Karte <i>Lo7 x Lo225</i> ^a des Roggen-genoms (rechte Karte)..	69
Abbildung 16 Vergleichende Kartierung von <i>Ddw1</i> im Roggen, <i>Triticum dicoccoides</i> , <i>Triticum urartu</i> und <i>Aegilops tauschii</i>	72
Abbildung 17 Vergleichende Kartierung von <i>Ddw1</i> im Roggen und <i>Rht12</i> im Weizen (aus Braun et al. 2019).....	74
Abbildung 18 Hochauflösende Karte des Gens <i>Ddw1</i> auf Chromosom 5R im Roggen.	79
Abbildung 19 Hochauflösende Karte des <i>Ddw1</i> Locus auf Chromosom 5R im Roggen und dessen orthologe Bereiche im Weizen.....	81

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Kurzstrohgene in Getreide mit Angabe ihrer Herkunft, Funktion, Reaktion auf Gibberelline (GA), chromosomaler Lokalisierung, Vererbung und ihrer bekannten syntänen Position im Roggen (modifiziert nach Milach und Federizzi 2001).	12
Tabelle 2 Populationen, <i>Ddw1</i> - oder Wuchshöhe QTL-Marker und deren genetische Kopplung (in cM) zu <i>Ddw1</i> (falls bekannt) in früheren Kartierungsstudien in Roggen (<i>Secale cereale</i> L.) und Triticale (<i>x Triticosecale</i> Wittmack).	13
Tabelle 3 Einsatz von molekularen Markern zum (A) Aufbau der Kartierungspopulation zur Feinkartierung von <i>Ddw1</i> , (B) Erstellung der NIB und Aufbau der hochauflösenden Population, (C) Selektion rekombinanter Genotypen in der hochauflösenden Kartierungspopulation, (D) phänotypischen Charakterisierung von <i>Ddw1</i> Genotypen und (E) hochauflösenden Kartierung von <i>Ddw1</i>	16
Tabelle 4 Gewebe mit Entwicklungsstadium für cDNA-Sequenzanalyse von Near-Isogenic Bulks (NIB).	19
Tabelle 5 Mittelwerte und Signifikanz der Wuchshöhe und Tausendkorngewicht von <i>Ddw1</i> Genotypen aus F _{5;6} Linienfamilien	30
Tabelle 6 Ergebnisse des Tukey-Tests zum Mittelwertsvergleich der Wuchshöhe und des Tausendkorngewichts zwischen den <i>Ddw1</i> Genotypen in den F _{5;6} Linienfamilien.	31
Tabelle 7 Zusammenfassung der aus der Transkriptomsequenzierung der <i>Ddw1</i> nah-isogenen Bulks (NIB) entwickelten und in Weizen-Roggen-Additionslinien und in der Population <i>L2039-N x DH</i> kartierten Marker.	38
Tabelle 8 Liste der selektierten GO-Termini (molekulare Funktion (MF), biologischer Prozess (BP)) der Transkripte, die auf 5R lokalisiert und differentiell zwischen dem normal- und kurzstrohigen <i>Ddw1</i> Genotyp exprimiert sind.	48
Tabelle 9 Übersicht über die kartierten Roggen-„GA-Gene“ (Schwefel (2015), Braun et al. (2019)....	55
Tabelle 10 GA2oxidase-Gene im Roggen (Auszug aus Braun et al. 2019)	59
Tabelle 11 Sequenzabgleich (blastN) der resequenzierten Marker gegen die GA-Kandidatengene im Roggen.	61
Tabelle 12 Markerpositionen in den Roggen GA-Genen und Genstruktur der vorhergesagten Roggen GA-Gene <i>ScGIDL2</i> , <i>ScSLR1</i> und <i>ScGA13ox1</i>	64
Tabelle 13 Vergleichende Kartierung der <i>Ddw1</i> Marker in <i>Aegilops tauschii</i> , <i>Triticum urartu</i> , Emmer (<i>Triticum dicoccoides</i>) und Weizen (<i>Triticum aestivum</i>)	70
Tabelle 14 Zielintervall für das Dominante Kurzstrohgen <i>Ddw1</i> in der hochdichten Karte <i>Lo7 x Lo225</i> des Roggens.	75

Veröffentlichungen aus dieser Doktorarbeit

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden vorab veröffentlicht:

Publikation:

Braun E-M, Tsvetkova N, Rotter B, Siekmann D, Schwefel K, Krezdorn N, Plieske J, Winter P, Melz G, Voylovkov AV and Hackauf B (2019).

Gene Expression Profiling and Fine Mapping Identifies a Gibberellin 2-Oxidase Gene Co-segregating With the Dominant Dwarfing Gene *Ddw1* in Rye (*Secale cereale* L.).

Front. Plant Sci. 10:857. doi: 10.3389/fpls.2019.00857

Die Publikation ist unter der folgenden Adresse verfügbar:

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2019.00857/full>

Beitrag der Doktoratskandidatin: Fertigstellung der Transkriptprofile, Analyse der Gene des Gibberellinbiosynthese und -Gibberellinsignalübertragungswegs im Roggen und Durchführung der phylogenetischen Analyse der GA Gene, Durchführung der Genotypisierung, und Beitrag zur Interpretation der Ergebnisse sowie dem Verfassen des Manuskripts.

Tagungsbeitrag (Poster):

Braun E-M, Rotter B, Musmann D, Krezdorn K, Winter P, Wehling P, Schön CC, Hackauf B (2015).

Approaching the gibberellin sensitive dwarfing gene *Ddw1* in winter rye (*Secale cereale* L.) EUCARPIA Rye Breeding Conference, Wrocław, Polen, 24.-26.Juni 2015

1. EINLEITUNG

1.1. Herkunft und Eigenschaften von Roggen

Roggen (*Secale cereale* L.) gehört zu dem Stamm der Triticeae innerhalb der Unterfamilie der Süßgräser (Pooideae) (Kilian et al. 2009). Mit geschätzten 7,9 Gb hat der Roggen das größte Genom aller diploiden Getreidearten (Bartos et al. 2008). Roggen ist nah verwandt mit Gerste (*Hordeum vulgare* L.) und Weizen (*Triticum aestivum* L.) und stammt von einem gemeinsamen Vorfahren der Triticeae ab. Er diversifizierte sich vor etwa $4 \pm 0,5$ Millionen (Mio.) Jahren von der Gerste und vor etwa $8,9 \pm 0,9$ Mio. Jahren vom Weizen (Middleton et al. 2014). Das Roggengenom weist durch diese Verwandtschaft Syntänie zu Gerste und Weizen auf, obwohl auch eine Reihe chromosomaler Rearrangements stattfanden (Devos et al. 1993; Martis et al. 2013). Seinen Ursprung hat die Gattung *Secale* im fruchtbaren Halbmond des Nahen Ostens, wo er als Beikraut in Getreide zu finden war und darüber weiterverbreitet wurde. Um 3000 - 4000 v. Chr. erfolgte der erste Anbau von Roggen in der Region des Kaspischen Meeres und um 500 v. Chr. brachten ihn slavische Völker nach Westeuropa (Behre 1992; Sencer und Hawkes 2008). Heute zählen Russland, Weißrussland, Polen, Deutschland und die Ukraine zu den Hauptanbauländern von Roggen, wobei die Winterform überwiegt (Geiger und Miedaner 2009). Im Jahr 2018, waren Russland mit 956095 ha, Polen mit 893962 ha und Deutschland mit 523000 ha die Länder mit der größten Anbaufläche von Roggen (FAOSTAT 2018). Im Wirtschaftsjahr 2017/2018 wurden 57,5 % der Ernte für Futtermittel, 24,6 % für Nahrungsmittel und 17,9 % für die Industrie verwendet (BMEL 2018).

Roggen ist sehr tolerant gegenüber Trockenheit, Frost, Salz und Aluminium. Er zeigt sich auch unter schwierigen klimatischen Bedingungen und auf Standorten mit leichten Böden als sehr produktiv (Mugwira et al. 1976; Bishnoi und Pancholy 1980; Limin und Fowler 1987). Züchterische Beachtung finden Kornertrag, Korngewicht, Kurzstrohigkeit, Lagerresistenz und Auswinterungshärte (Geiger und Miedaner 2009). Roggen ist ein Fremdbefruchter mit einem diploiden Genom dessen haploider Satz aus sieben Chromosomen besteht. Ein weiteres Merkmal des Roggens ist ein gametophytisches Selbstinkompatibilitätssystem (Lundqvist 1956). Die Entdeckung des Pampa (P)-Cytoplasmas in einer argentinischen Roggenpopulation, das männliche Sterilität garantiert (Geiger und Schnell 1970), legte die Grundlage zur Hybridzüchtung in dieser Kulturart. Die Voraussetzungen wurden durch die Identifizierung von Restorerenen vervollständigt (Wricke 1969).

1.2. Züchterische Anpassung der Wuchshöhe bei Getreide

Die Hybridzüchtung hat bei Roggen zu einem signifikantem Züchtungsfortschritt geführt (Laidig et al. 2017). Um die Ertragsstabilität von Roggen weiter zu verbessern, bietet sich die Möglichkeit, eine

Steigerung des Ernteindex über eine züchterische Reduktion der Wuchshöhe anzustreben. Die Reduktion der Wuchshöhe hat sich bereits bei anderen Getreidearten als erfolgreiche Züchtungsstrategie bewährt, um Lagerresistenz und eine Steigerung des Ernteindex zu erreichen (Hedden 2003). Die Steigerung des Ernteindex entsteht durch das veränderte Verhältnis zwischen pflanzlicher Biomasse und Kornertrag (Hedden 2003). Im Roggen sind Kurzstrohigkeit und Lagerstabilität zentrale Zuchtziele (Geiger und Miedaner 2009). Dennoch war der Zuchtfortschritt für die Lagerresistenz während der letzten drei Jahrzehnte marginal (Laidig et al. 2017). Zur Bekämpfung von Lager bei Getreide wurden bereits seit den 1950er Jahren chemische Wachstumsregler eingesetzt (Hedden und Sponsel 2015). Eine Alternative zur chemischen Behandlung stellte die Introgression von Kurzstrohgenen (engl. *Dwarf genes*) dar (Hedden und Sponsel 2015). Kurzstrohgene ermöglichten die Züchtung von Getreidesorten, die die Wuchshöhe um etwa 20 % reduzierten und gleichzeitig für signifikante Zuwächse bei der Ährenfertilität und beim Ertrag sorgten (Milach und Federizzi 2001). Bislang wurde in Studien im Reis (Cao et al. 2001), Weizen (Cui et al. 2011), Gerste (Kicherer et al. 2000) und Roggen (Miedaner et al. 2011; Miedaner et al. 2012; Masojc et al. 2017) belegt, dass Wuchshöhe (WH) ein quantitatives Merkmal ist, das durch ein komplexes Netzwerk von quantitativen Loci (*Quantitative Trait Locus*, QTL) kontrolliert wird. In einigen Studien wurde ermittelt, dass die Heritabilität (h^2) der WH in Triticale (*x Triticosecale* Wittmack) und Roggen bei über 0,9 liegt (Gowda et al. 2011; Miedaner et al. 2011; Miedaner et al. 2012; Alheit et al. 2014). Als Heritabilität wird der Anteil der phänotypischen Varianz bei Individuen einer Population definiert, der durch erbliche genetische Effekte begründet ist (Piepho und Möhring 2007). Dies wird durch die Formel $h^2 = \frac{\sigma_g^2}{\sigma_p^2}$ dargestellt, wobei σ_g^2 für die genetische Varianz und σ_p^2 für die phänotypische Varianz steht (Piepho und Möhring 2007). Die Handhabung vieler einzelner kleiner Loci stellt eine züchterische Herausforderung dar. Die Bestimmung einzelner rezessiv oder dominant vererbter Kurzstrohgene ermöglicht durch gezielte Introgression von Kurzstrohgenen in Elitezuchtmaterial das Längenwachstum genetisch zu steuern (Hedden und Sponsel 2015). In diesem Zusammenhang sind Pflanzengenetische Ressourcen (PGR) von Bedeutung. Diese definieren sich als das komplette Pflanzenmaterial, das für die Züchtung genutzt werden kann (Becker 2011). Die Leistung von Kulturpflanzen für landwirtschaftlich relevante Merkmale ist optimiert auf das Anbauggebiet, in dem sie kultiviert werden. Im Gegensatz dazu sind PGR nicht zwangsläufig an die geographische Region der Verwendung angepasst. Das führt dazu, dass die Nutzung von PGR für die Züchtung Herausforderungen mit sich bringt. Diese bestehen vor allem darin, dass beim Vorhandensein unerwünschter Allele oder Pleiotropie die Leistung einer Kultursorte beim Einbringen der Allele in der Leistung möglicherweise geschmälert wird (Hausmann et al. 2004). Zudem kann sich bei einem

Fremdbefruchter wie Roggen bei einer Rückkreuzung mit PGR eine starke Inzuchtdepression einstellen, die den wahren Effekt eines fokussierten Merkmalgens maskiert (Hausmann et al. 2004).

1.2.1. Gibberelline und deren Einfluss auf das Pflanzenwachstum

Bei der Identifizierung von Faktoren, die Zwergwuchs verursachen, standen die Gibberellinbiosynthese und deren Signalübertragung, aber auch die Brassinosteroidbiosynthese im Fokus der Aufmerksamkeit (Busov et al. 2008). Bei Gibberellinen (GA) handelt es sich um eine Familie tetrazyklischer Diterpene. Diese bilden eine Gruppe endogener Wachstumsregulatoren. Sie spielen eine bedeutende Rolle bei Keimung, Längenwachstum und der Übergangsphase zur Blüte (Achard und Genschik 2009). Dabei beinträchtigen Mutationen in einigen Genen der Biosynthese und dem regulatorischen Netzwerk die Entwicklung von Pflanzen. Diese macht sich beispielsweise durch eine gehemmte bis unterdrückte Keimung bemerkbar (Achard und Genschik 2009). Ein Mangel an GA oder eine gehinderte Weitergabe eines GA-induzierten Signals resultiert in reduziertem Längenwachstum. Ein Überschuss hat ein überhöhtes Längenwachstum zur Folge (Busov et al. 2008). Eine Mutation in GA-Genen geht gleichfalls mit einer verspäteten Blüte einher (Achard und Genschik 2009). Inzwischen ist bekannt, dass GAs auch bei oxidativen Stressantworten und bei der Reaktion auf abiotische Signale wie Licht, Kälte, Trockenheit oder Salzgehalt eine Rolle als Mediator zukommt (Hedden und Thomas 2012). Natürlich vorkommende Mutationen, die zu einer Reduktion des Längenwachstums führen, wurden in einer Reihe von Pflanzenarten entdeckt (Hedden und Sponsel 2015). Anhand von GA-Mangelmutanten in *Arabidopsis thaliana*, Erbsen und Mais, die gleichzeitig Zwergwuchs aufwiesen, konnte der GA-Syntheseweg in höheren Pflanzen aufgeklärt werden.

Die biosynthetischen Enzyme und die Zwischenmetabolite der GA-Biosynthese, sowie die bioaktiven GA sind bekannt (**Abbildung 1** (aus Achard und Genschik 2009)). Die GA-Biosynthese wird durch drei Enzymklassen katalysiert und findet in drei Zellkompartimenten der Pflanze statt: Die Terpenzyklen *ent*-Copalyl Diphosphat Synthase (CPS) und *ent*-Kaurensynthase (KS) aus der Familie der Terpensynthasen überführen im Plastid das Ausgangssubstrat Geranylgeranyldiphosphat (GGDP) in *ent*-Kauren (Pearce et al. 2015). Die nachfolgenden Schritte werden im Endoplasmatischen Retikulum durch die Cytochrom P450-Monooxygenasen (CYPs), *ent*-Kaurenoxidase (KO) und *ent*-Kaurensäureoxidase (KAO) katalysiert. Die letzten Schritte, die zur Synthese von bioaktiven GA₁, GA₄ und GA₇ führen, werden im Cytosol durch die 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen (2-ODD), GA20-Oxidase (GA20OX) und GA3-oxidasen (GA3OX) katalysiert. Die GA13-Oxidase (GA13OX) setzt das Substrat GA₁₂ in GA₅₃ um, das wie GA₁₂, Vorläufer bioaktiver GAs ist. Der katabole Prozess wird von der GA2-Oxidase (GA2OX) katalysiert (Pearce et al. 2015). Ferner werden die bioaktiven GA durch Epoxidation von CYP7141D deaktiviert (Achard und Genschik 2009). Auch die Gruppe der *Elongated*

uppermost internode (EUI)-Gene sind CYPs (Hedden und Sponsel 2015). Darüber hinaus führt Methylierung zur Deaktivierung der bioaktiven GA. Sie erfolgt durch die SABATH-Methyltransferasen GAMT1 und GAMT2 (Achard und Genschik 2009).

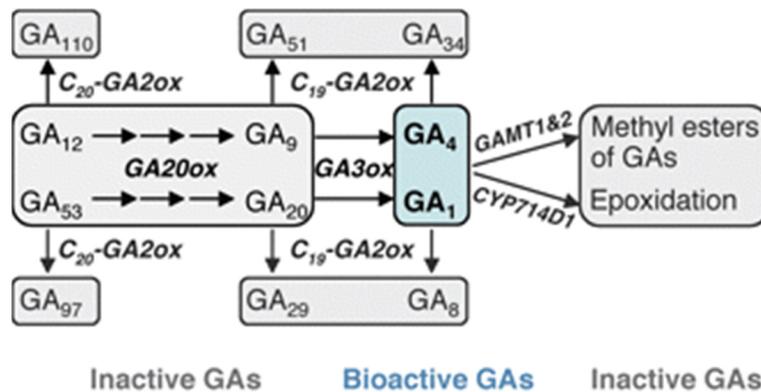


Abbildung 1 Der Biosyntheseweg der Gibberelline (GAs) (aus Achard und Genschik 2009). Die an der Synthese beteiligten Enzyme (GA20-Oxidasen, GA3-Oxidasen) und die Enzyme zur Deaktivierung der GAs (GA2-Oxidasen, GAMT1&2 [SABATH-Methyltransferasen] und CYP714D1 [P450-Monooxygenasen]) sind in kursiver Schrift dargestellt. Die Zwischenmetabolite sind grau hinterlegt und die bioaktiven Gibberelline blau hervorgehoben.

Der GA-Signaltransduktionsweg wurde bislang teilweise anhand von *Arabidopsis thaliana* und Reis aufgedeckt (Hedden und Sponsel 2015). **Abbildung 2** (aus Achard und Genschik 2009) stellt die zentralen Elemente des Signalübertragungsweges von GA und den Regulationsmechanismus dar. Bioaktive GA werden von einem GA-Rezeptor wahrgenommen. In Reis wird der Rezeptor von dem Gen *gibberellin insensitive dwarf1 (gid1)* kodiert. In *Arabidopsis thaliana* gibt es drei orthologe *gid1*-Gene (Schwechheimer 2012). Nach der Bindung der Gibberelline am Rezeptor interagieren diese mit den DELLA-Proteinen (DELLA), die hierbei als negative Regulatoren der GA-induzierten Antwort fungieren (Schwechheimer 2012). Bei Abwesenheit bioaktiver GA unterdrücken DELLA GA-abhängige Prozesse. In Anwesenheit von GA werden DELLA mittels Bindung an den GID-Rezeptor inaktiviert und ermöglichen alle GA-abhängigen Prozesse (Schwechheimer 2012). Der GID1-GA-DELLA-Komplex wird ubiquitiniert und im 26S-Proteasom mittels der spezifischen SCF E3 Ubiquitin Ligase SCF^{GID2/SLY1} abgebaut. F-Box-Proteine bilden die Untereinheit des SCF E3 Ubiquitin-Komplexes (Schwechheimer 2012). In Reis fungiert dabei das F-Box-Protein GID2 und in *Arabidopsis thaliana* wird diese Funktion von SLEEPY (SCF^{SLY1}) oder SNEEZY (SCF^{SNE}) übernommen (Schwechheimer 2012). Eine alternative Deaktivierung von DELLA erfolgt bei Abwesenheit der F-Box-Proteine über einen Proteolyse-unabhängigen Weg (Achard und Genschik 2009).

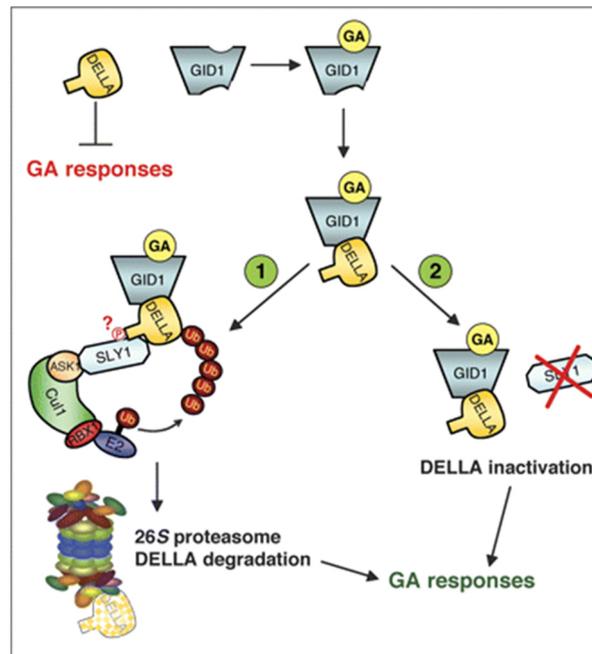


Abbildung 2 Schema des Gibberellin (GA)-Signalübertragungsweges in Pflanzen (aus Achard und Genschik 2009). Nach Bindung von GA am GA-Rezeptor *GID1* interagiert dieser mit den DELLA-Repressoren und (1) induziert deren Ubiquitinierung und Abbau durch die E3-Ubiquitin-Ligasen SCF^{SLY1} oder SCF^{GID2} . Der DELLA-Abbau erfolgt im 26S-Proteasom. (2) Die Deaktivierung von DELLA kann ebenso unabhängig von SCF Komplexes und ohne Proteolyse erfolgen.

Neben den GA-Rezeptoren, DELLA und F-Box-Proteinen sind eine Reihe weiterer Gene an der Signalübertragung beteiligt. DELLAs werden durch verschiedene Interaktionen reguliert. Der GA-Signalregulator *SPINDLY (SPY)* in *Arabidopsis thaliana* hat möglicherweise einen negativen Einfluss auf die Aktivität der DELLA (Gomi und Matsuoka 2003). Über den GA-Signalregulator *EARLY FLOWERING1 (EL1)* in Reis ist bekannt, dass er über Phosphorylierung der DELLA-Proteine negative Auswirkung auf die GA-Signalwirkung hat (Dai und Xue 2010). Das GA-insensitive Reisgen *dwarfing gene D1* ist ein GA-Signal verstärkender Regulator (Gomi und Matsuoka 2003). Der GA-gesteuerte Transkriptionsfaktor *GAMYB* spielt eine Rolle bei der Aktivierung der Expression der α -Amylase im Aleuron und bei der Entwicklung der Antheren. Die Hemmung des Transkriptionsfaktor *GAMYB* erfolgt von einer mit *GAMYB*-assoziierten Proteinkinase (*KINASE-ASSOCIATED WITH GAMYB; KGM*) (Gomi und Matsuoka 2003). Der Transkriptionsfaktor *REPRESSION OF SHOOT GROWTH (RSG)* wurde in Tabak als positiver Regulator der GA-Biosynthese eingestuft (Gomi und Matsuoka 2003).

Gemäß dem vorher beschriebenen Model der Wirkweise der DELLA, hemmen diese das Wachstum, wohingegen GA das Pflanzenwachstum durch die Aufhebung der DELLA-bedingten

Wachstumshemmung fördern (Achard und Genschik 2009). Mutanten in Arabidopsis, die eine Mutation in der GA-Biosynthese (z.B. ent-kauren synthetase A; *ga1*), im GA-Rezeptor (z.B. *gid1a*, *gid1b*, *gid1c*) oder in der E3-Ubiquitin Ligasefunktion (z.B. *sly1*) besitzen, oder wie die *gai1 gain-of-function* Mutante im DELLA-Protein, haben die Fähigkeit verloren DELLA abzubauen und werden damit teilweise oder komplett GA-insensitiv (Schwechheimer 2014). Durch die Einbindung in regulatorische Netzwerke haben die verschiedenen Mutationen Einfluss auf die Expression von *upstream*- und *downstream*-lokalisierten Gene und auf die Konzentration der kodierten Proteine. Mutanten, die durch Ausfall der Biosynthese oder der Signalübertragung geringe Konzentration bioaktiver GA aufweisen, haben einen hohen Gehalt an biosynthetischen GA-Genen wie GA20-Oxidasen und GA3-Oxidasen (Achard und Genschik 2009). Dahingegen exprimieren diese Mutanten Proteine zum Abbau der bioaktiven GA, wie GA2-Oxidasen, auf niedrigem Niveau. Entsprechend wird die umgekehrte Situation in Mutanten mit erhöhtem GA-Gehalt oder erhöhter GA-Signalwirkung beobachtet (Achard und Genschik 2009). Diese Beobachtung spiegelt sich in der Einteilung in GA-sensitive und insensitive Gene wider (Börner et al. 1996). GA-sensitive Mutanten, auch Mangelmutanten genannt, reagieren auf eine exogene Gabe bioaktiver GA. Die Reaktion wird durch die Wiederherstellung eines normallangen Wuchstypes sichtbar. GA-insensitive Mutanten zeigen keine bis eine geringfügige Reaktion nach einer Behandlung mit bioaktiven GA (Börner et al. 1996). Phänotypisch betrachtet weisen GA-sensitive und -insensitive Mutanten Zwergwuchs auf und sind nicht unterscheidbar (Davière und Achard 2013). GA-insensitive Mutanten mit Defekten in DELLA-Genen wurden in zahlreichen Pflanzenarten gefunden. Beispiele sind *Arabidopsis thaliana* (*repressor of ga1–3* [*rga*], *gibberellic-acid insensitive* [*gai*]), Gerste (*slender1* [*sln1*]), Mais (*Dwarf8* [*D8*]), Weizen (*Reduced height* [*Rht*]), und Reis (*slr1*) (Davière und Achard 2013). Die GA-insensitiven Mutanten werden in zwei Kategorien eingeteilt. Zu den partiell-dominanten *gain-of-function*-Mutationen zählen die Mutationen in Arabidopsis, Mais, Gerste und Weizen. Die rezessiven *loss-of-function*-Mutationen, wie in Gerste und Reis, führen über kontinuierlich aktive GA-Reaktionen zu gesteigertem Wachstum (Gomi und Matsuoka 2003). Seit der Entdeckung, dass GA als endogene Wachstumsregulatoren in Pflanzen fungieren, haben Landwirte und Gärtner versucht ihr Potential zur Züchtung ertragreicherer Sorten zu nutzen (Schwechheimer 2014). Daraus resultierten inzwischen mehr als tausend zwergwüchsiger Sorten bei unterschiedlichen Pflanzenarten (Milach und Federizzi 2001).

1.2.2. Kurzstrogene in Getreide

Kurzstrogene wurden sowohl in den landwirtschaftlich genutzten Gräserarten Roggen, Gerste, Hafer (*Avena sativa* L.), Weizen, Mais (*Zea mays* L.), Sorghum (*Sorghum bicolor* L.) und Reis, als auch in Kolbenhirse (*Setaria italica* Beauv.) identifiziert (Milach und Federizzi 2001). Bislang wurde nur eine

geringe Anzahl der bekannten Gene in großem Stil zur züchterischen Bearbeitung von Getreidearten verwendet. **Tabelle 1** fasst die Herkunft, genetische und physiologische Eigenschaften dieser am häufigsten verwendeten Kurzstrohgene in Getreide zusammen (adaptiert aus Milach und Federizzi 2001). Bei Getreide gibt es GA-sensitive und -insensitive Kurzstrohgene (Börner et al. 1996). Weltweit am häufigsten wurden die GA-insensitiven Mutanten der *Reduced height* Gene *Rht1* (synonym *Rht-B1b*) und *Rht2* (*Rht-D1b*) aus ‚Norin10‘ im Weizen und das *semi-dwarf-1* (*sd1*) Gen aus ‚Dee-geo-woo-gen‘ im Reis zur Züchtung von Halbzwerge verwendet (Milach und Federizzi 2001). Darüber hinaus wurden in der Weizenzüchtung *Rht8* und *Rht9* (Milach und Federizzi 2001), sowie *Rht24* häufig eingesetzt (Tian et al. 2017). Bei Hafer beschränkt sich die Nutzung auf die GA-sensitiven Gene *Dw6* und *Dw7* (Milach und Federizzi 2001). Die Strategie zur Züchtung kurzstrohiger Sorten wurde ebenso in Gerste verfolgt und basiert auf der Einkreuzung des Halbzwergegens *denso* (*sdw1*) (Laurie et al. 2006) und *Gpert* aus der Sorte ‚Golden Promise‘ (Milach und Federizzi 2001). *Denso* ist ein orthologes Gen des GA-sensitiven und rezessiven Gens *sd1* in Reis (Jia et al. 2009). Sowohl *denso* als auch *sd1* kodieren eine defekte GA20-Oxidase (**Abbildung 1**) (Monna et al. 2002; Sasaki et al. 2002; Spielmeyer et al. 2002; Jia et al. 2009). Auch von den Kurzstrohallelen *Rht-B1b* und *Rht-D1b* im Weizen ist die Genfunktion bekannt. Sie kodieren ein DELLA-Protein (**Abbildung 2**), wobei die *gain-of-function*-Mutationen eine GA-Insensitivität bewirken (Peng et al. 1999). Das trifft auch auf die Mutation in den orthologen DELLA-Proteinen *slender1* (*SLN1*) bei Gerste (Chandler et al. 2002) und *slender* (*SLR1*) bei Reis (Ikeda et al. 2001) zu.

1.3. Das *Dominant dwarfing gene Ddw1* im Winterroggen

Im Roggen sind mehrere GA-sensitive und -insensitive Kurzstrohgene bekannt. Die Mehrheit wird rezessiv vererbt (Börner et al. 1996). Das bekannteste dominant-vererbte Gen ist das GA-sensitive Gen *Dominant dwarf 1* (*Ddw1*) (Kobyljanski 1972; Börner und Melz 1988). *Ddw1* wurde unter dem Namen ‚EM1‘ in einer Sammlung genetischer Ressourcen am Vavilov-Institut in St. Petersburg erhalten. Zunächst wurde es als *Humilus* (*Hl*) und später als *Ddw1* (Melz 1989) bezeichnet. *Ddw1* befindet sich auf dem langen Arm des Roggenchromosoms 5R (Bezeichnung als 5RL) (Korzun et al. 1996). Das GA-sensitive Gen *Rht12* ist vermutlich homöolog zu *Ddw1* (Korzun et al. 1997). Dieses wurde auf dem langen Arm von Chromosom 5A kartiert (Sutka und Kovács 1987; Korzun et al. 1997; Sun et al. 2019). Im Roggen sind neben *Ddw1* drei weitere dominante, GA-sensitive Gene identifiziert worden: *Ddw2* (Melz 1989) auf Chromosom 7R, *Ddw3* auf dem langen Arm von Chromosom 1R (Chandler et al. 2002) sowie *Ddw4* in der Region des Zentromers auf Chromosom 3R (Kantarek et al. 2018).

Züchterisch wurde *Ddw1* bislang zur Verbesserung der Wuchshöheneigenschaften von Populationssorten in Kanada (McLeod et al. 2000), Osteuropa (Torop et al. 2003) und Skandinavien (Tenhola-Roininen und Tanhuanpää 2010) verwendet. Zudem existieren experimentelle Nachweise, dass durch *Ddw1* Ertragszuwächse in Triticale erzielt werden konnten (Wolski und Gryka 1996; Banaszak 2010). Geiger und Miedaner postulierten hingegen, dass kurzstrohige Roggensorten insbesondere in durch Stress geprägten Umwelten kein hohes Ertragsniveau erreichen können (Geiger und Miedaner 2009; Miedaner et al. 2011; Miedaner et al. 2012). Diese Behauptung wurde damit begründet, dass normalstrohiger Roggen im Gegensatz zu Weizen eine andere Assimilatspeicherung und ein anderes Verteilungsmuster aufweist. So dient beim Roggen der Halm als Hauptassimilationsorgan (Nalborczyk et al. 1981) und der Großteil der Assimilate wird im Halm gespeichert (King et al. 1967). Neuere Ergebnisse zeigen, dass in kurzstrohigen *Ddw1*-Genotypen, anders als in ihren normalstrohigen Äquivalenten, die Versorgung der Ähre mit Assimilaten vor allem über das Fahnenblatt (F) sowie über das Blatt unter dem Fahnenblatt (F-1) erfolgt (Kobyljanski und Babudzhina 2007). Für Getreidearten vom C3-Typ ist zudem bekannt, dass die Photosyntheseleistung der Ähre ebenfalls einen bedeutenden Beitrag zur Bildung des Kornertrages leistet (Tambussi et al. 2007). Ferner wurde für *Ddw1*, neben der reduzierten Wuchshöhe, eine verspätete Blüte und ein verringertes Tausendkorngewicht (TKG) beobachtet (Börner et al. 2000). Es ist nicht geklärt, ob es sich hierbei um einen pleiotropen Effekt handelt oder um eine Kopplung unerwünschter Eigenschaften aus der genetischen Ressource (Börner et al. 2000).

Tabelle 2 gibt Übersicht über die in früheren Kartierungsstudien verwendeten Marker und Populationen. In der ersten Studie zur genetischen Kartierung von *Ddw1* wurde das Gen in der Population *R1620 x R347/1* in einem 17,1 cM großen Intervall auf dem äußerst distalen Ende des langen Arms von Chromosom 5R kartiert (5RL) (Korzun et al. 1996). In einer QTL-Studie für Chromosom 5R wurden in der gleichen Population ähnliche Markerabstände ermittelt (Börner et al. 2000). Tenhola-Roininen und Tanhuanpää (2010) kartierten *Ddw1* in einem 43,2 cM QTL-Intervall, wobei der am engsten gekoppelte Marker 13 cM vom QTL entfernt war. In Triticale wurde ein QTL für Wuchshöhe und Biomasse in einem 7,9 cM großen Intervall auf Chromosom 5R identifiziert, wobei der große Wuchshöhe-QTL mit *Ddw1* verknüpft wurde (Alheit et al. 2014; Liu et al. 2014; Würschum et al. 2014a; Würschum et al. 2014b). In einer QTL-Studie in der Roggenpopulation *Lo115 x Lo117* wurde *Ddw1* einem kleineren Wuchshöhe-QTL in einem 7,3 cM großen Segment auf Chromosom 5RL zugewiesen (Miedaner et al. 2012). Durch die Studien von Kalih et al. (2014), Hackauf et al. (2017b) und Miedaner et al. (2018) wurde offenkundig, dass die Kartenposition von *Ddw1* in den Publikationen von Miedaner et al. (2012) und Alheit et al. (2014) durch Invertierung der Karte auf dem kurzen Arm von Chromosom 5R (5RS) angegeben wurde. Um das Gen für die Hybridzüchtung zu erschließen und die Selektion

heterozygoter und homozygoter Genotypen zu ermöglichen, sind molekulare Marker notwendig, da eine Unterscheidung der Allelkonstitution phänotypisch nicht gewährleistet werden kann.

1.4. Genomische Ressourcen zur Markerentwicklung im Roggen

1.4.1. Vergleichende Kartierung im Roggen

In den Triticeaearten Gerste, Brotweizen, *Aegilops tauschii* und *Triticum urartu* wurden genomische Sequenzen bereits vor fast zehn Jahren verfügbar (Mayer et al. 2011, 2014; Jia et al. 2013; Ling et al. 2013). Für Roggen wurde 2017 erste umfassende Sequenzinformation für das gesamte Genom veröffentlicht (Martis et al. 2013; Bauer et al. 2017). Aufgrund der syntänen Beziehungen innerhalb der Triticeae stellen die genomischen Sequenzen der Selbstbefruchter Gerste und Brotweizen (Middleton et al. 2014), die diploiden Genome der Vorfahren des Weizen *Triticum urartu* und *Aegilops tauschii* (A- bzw. D-Genom) und das tetraploide Genom von Wildemmer (*Triticum dicoccoides*, AABB-Genom) wichtige Ressourcen für die Kartierung von Genen im Roggen dar (Jia et al. 2013; Ling et al. 2013; Avni et al. 2017; Luo et al. 2017; Mascher et al. 2017; Appels et al. 2018). Zuvor wurden die vollständig sequenzierten Genome von *Brachypodium distachyon* und Reis zu Hilfe genommen, um Merkmalsgene für die Hybridzüchtung genetisch zu kartieren (Hackauf et al. 2009). Durch vergleichende Kartierung gelang es unter anderem den Selbstinkompatibilitäts-Locus Z auf Chromosom 2RL zu kartieren (Hackauf und Wehling 2005) und Marker für das Restorergergen *Rfp1* auf Chromosom 4RL zu entwickeln (Hackauf et al. 2012). Mit der Zunahme an Sequenzressourcen für das Gerstengenom (Ariyadasa et al. 2014), stellte auch dieses Genom eine bedeutende Orientierungshilfe zur Kartierung im Roggen dar (Hackauf et al. 2017a). Die kollinearen Beziehungen auf Makroebene zwischen Roggen und Gerste sind bereits bekannt (Devos et al. 1993; Martis et al. 2013).

1.4.2. Roggen-spezifische Sequenzressourcen

Eine der ersten öffentlich verfügbaren Roggen-spezifischen Sequenzressourcen war eine Bibliothek aus exprimierten sequenzmarkierten Stellen (*expressed sequence tags*, ESTs). Nach der Assemblierung von 115400 Contigs wurden 5234 SNPs identifiziert und die Daten zur Erstellung eines 5k-Genotypisierungsarrays verwendet (Haseneyer et al. 2011). Weitere Sequenzinformation wurde durch Hochdurchsatzsequenzierung der sieben Chromosomen generiert (Martis et al. 2013). Durch die Integration der Sequenzen mit einer neu erstellten hochdichten Transkriptkarte (Martis et al. 2013) und einem Syntänie-basierten Vergleich mit den Grasgenommodellen *Brachypodium distachyon*, Reis und *Sorghum bicolor* konnte eine virtuelle lineare Anordnung der Genmodelle simuliert werden (Martis et al. 2013). In der Arbeit von Martis et al. (2013) wurden auch die syntänen Beziehungen zwischen Roggen und Gerste detailliert beschrieben. Seit 2017 steht erstmals eine Sequenz zur

Verfügung, die durch die Sequenzierung und *de novo* Assemblierung einer Roggeninzuchtlinie mit Hilfe einer Schrotschuss-Methode (*whole-genome shotgun*, WGS) erstellt wurde (Bauer et al. 2017). Insgesamt wurden 2,80 Gbp abgebildet, die circa 35 % des kodierenden Roggengenoms entsprechen. Durch Homologie-basierte Vorhersage wurden auf Grundlage der Roggengenomsequenz 27784 Genmodelle prognostiziert. Zudem wurde ein SNP-Array mit 600843 Markern entwickelt und das virtuelle Genomzippermodell von Martis et al. (2013) aktualisiert.

1.5. Ziele der vorliegenden Arbeit

Im Roggen gibt es trotz vergangener Kartierungsarbeiten (Korzun et al. 1996; Tenhola-Roininen und Tanhuanpää 2010) bislang keine eng gekoppelten Marker für das Dominante Kurzstrohgen (*Dominant dwarfing gene*) *Ddw1*. Die Größe des Roggengenoms und sein großer Anteil repetitiver Sequenzen (Bauer et al. 2017) erschwerte die Markerentwicklung für Merkmalsgene im Roggen. Trotz der inzwischen zur Verfügung stehenden genomischen Sequenzressourcen, einem virtuellen linearen Model zur Anordnung der Gene sowie einer hochdichten Karte (Martis et al. 2013, Bauer et al. 2017) bleibt das Segment auf dem langen Arm von Chromosom 5R, in dem *Ddw1* lokalisiert ist, ein Bereich in dem die Kartierung immer noch durch eine zu geringe Auflösung erschwert wird. Abgesehen von den bekannten makro-kollinearen Beziehungen, konnte die Beschaffenheit dieses Bereiches nicht weiter analysiert werden, da die Struktur dieser Region auf eine netzartige Evolution schließen lässt (Martis et al. 2013). Das übergeordnete Ziel der vorliegenden Dissertation war die Feinkartierung und Erstellung einer hochauflösenden Karte für den *Ddw1*-Locus im Roggen. Die Ziele im Einzelnen waren:

- I. Analyse der Wuchshöhe in einer für *Ddw1* spaltenden bi-parentalen Population
- II. Erstellung von Genexpressionsprofilen für Mischproben definierter *Ddw1*-Genotypen durch Massensequenzierung von cDNA (*massive analysis of cDNA ends*, MACE) zum Zweck der Markerentwicklung
- III. Identifikation von differentiell exprimierten Transkripten zwischen den normalstrohigen Genotypen und den Halbzwergetypen im Transkriptdatensatz
- IV. Beschreibung orthologer Bereiche von *Ddw1* in den Genomen von *Aegilops tauschii*, *Triticum urartu*, Brotweizen und Wildemmer, um die Information zur vergleichenden Kartierung zu nutzen
- V. Genetische Kartierung neuer Marker in einer für das *Ddw1* Gen spaltenden Population, um das Selektionsintervall zu reduzieren
- VI. Abbildung des *Ddw1*-Zielintervalls in der hochdichten Karte des Roggenreferenzgenoms und Nutzung der Information des Genotypisierungsarray zur Markerentwicklung

- VII. Zusammenstellung von Roggengenmodellen für die Kartierung von Genen der GA-Biosynthese und Signaltransduktion als möglichen *Ddw1* Kandidaten.
- VIII. Identifizierung von Rekombinationen mit neuen Markern in einer hochauflösenden für *Ddw1* spaltenden Population.

Tabelle 1 Kurzstrohgene in Getreide mit Angabe ihrer Herkunft, Funktion, Reaktion auf Gibberelline (GA), chromosomaler Lokalisierung, Vererbung und ihrer bekanntesten syntänen Position im Roggen (modifiziert nach Milach und Federizzi 2001).

Gen	Spezies	Herkunft	Funktion	Reaktion auf GA	Chromosom ¹	Vererbung	Syntäne Position in Roggen	Referenz
Dw6	<i>Avena sativa</i> L.	OT207		sensitiv	18D	dominant		Milach et al. 1997
Dw7	<i>Avena sativa</i> L.	NC2469-3		sensitiv	19A	partiell dominant		Milach et al. 1997
denso (sdw1)	<i>Hordeum vulgare</i> L.	Triumph	GA20ox	sensitiv	3HL	rezessiv	7RS	Laurie et al. 2006, Jia et al. 2009
Gpert	<i>Hordeum vulgare</i> L.	Golden Promise		sensitiv	5HS	rezessiv		Thomas et al. 1984
sd-1	<i>Oryza sativa</i> L.	Dee-geo-woon-gen	GA20ox	insensitiv	R1	rezessiv	7RS	Cho et al. 1994, Spielmeier et al. 2002
Ddw1	<i>Secale cereale</i> L.	EM1		sensitiv	5RL	dominant		Korzun et al. 1996
Rht-B1	<i>Triticum aestivum</i> L.	Norin 10	DELLA	insensitiv	4BS	partiell dominant	4RS	Peng et al. 1999
Rht-D1	<i>Triticum aestivum</i> L.	Norin 10	DELLA	insensitiv	4DS	partiell dominant	4RS	Peng et al. 1999
Rht8	<i>Triticum aestivum</i> L.	Mara, Sava		sensitiv	2DS	rezessiv		Worland et al. 1998
Rht9	<i>Triticum aestivum</i> L.	Mara		sensitiv	7BS	rezessiv		Law et al. 1978
Rht12	<i>Triticum aestivum</i> L.	Karcag522		sensitiv	5AL	dominant	5RL	Korzun et al. 1997
Rht14	<i>Triticum aestivum</i> L.	Castelporziano		sensitiv	6AS	partiell dominant		Haque et al. 2011
Rht18	<i>Triticum aestivum</i> L.	Akakomugi		sensitiv	6AS	dominant		Haque et al. 2011
Rht24	<i>Triticum aestivum</i> L.	Jingdong 8/Aikang 58		sensitiv	6A			Tian et al. 2017

¹ Die Chromosomenarme werden durch die Buchstaben S (kurz) und L (lang) angegeben. Die Genome werden durch Buchstaben symbolisiert: Gerste (H), Hafer (A, C, D), Reis (R), Roggen (R), Weizen (A, B, D).

Tabelle 2 Populationen, *Ddw1*- oder Wuchshöhe-QTL-Marker und deren genetische Kopplung (in cM) zu *Ddw1* (falls bekannt) in früheren Kartierungsstudien in Roggen (*Secale cereale* L.) und Triticale (x *Triticosecale* Wittmack).

Population	Chromosom	Marker	Markertyp	Markerkopplung (cM)	Referenz
<i>R1620 x R347/1</i>	5RL	<i>Xwg199</i> und <i>Hp</i> <i>β-amy-R1</i>	RFLP Isozym	5,6 11,5	Korzun et al. 1996
<i>R1620 x R347/1</i>	5RL	<i>Xwg199</i> <i>β-amy-R1</i>	RFLP Isozym	5,9 12,7	Börner et al. 2000
		<i>WMS6</i>	Mikrosatellit	30,2	
,Voima' (DH) x ,EM1' (DH)	5RL	<i>REMS1218</i> , SNP- <i>REMS1218</i>	Mikrosatellit, SNP	13	Tenhola-Roininen und Tanhuanpää 2010
		<i>BAMY</i>	SNP	36,6	
<i>EAW78 (HeTI17-06 x Pigmei)</i>	5R	<i>rPt-508266</i> <i>rPt-509721</i> <i>rPt-399681</i> <i>rPt-507664</i>	DART	5,6 1 1,9 2,4	Alheit et al. 2014, Busemeyer et al. 2013, Khalil et al. 2014
<i>Lo115 x Lo117</i>	5R	<i>rPt-399681</i> <i>rPt-507664</i>	DART		Miedaner et al. 2012

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Pflanzenmaterial

Zur Kartierung des dominanten Verzweigungsgens *Ddw1* wurde eine biparentale Population verwendet. Um neue polymorphe Marker für die Region zu erhalten, wurden neue Sequenzressourcen mittels einer Methode, die die *bulk-segregant*-Analyse und die Massensequenzierung von cDNA kombiniert, erstellt.

2.1.1. *R1620 x R347/1* Kartierungspopulation für *Ddw1*

Aufbau der Kartierungspopulation

Abbildung A 1 liefert eine schematische Übersicht über die Entwicklung der in dieser Studie verwendeten *Ddw1*-Kartierungspopulation, die einer Kreuzung der langen Linie *R1620* mit unbehaarter Blattkeimscheide und der kurzen behaarten Linie *R347/1* entstammt. Diese Kreuzung wurde von Korzun et al. (1996) erstellt. Die daraus entstehende Kartierungspopulation stammt von einer F_1 -Pflanze ab, die für die Merkmale Wuchshöhe und Behaarung der Blattkeimscheide heterozygot war. Davon wurden 140 F_2 -Körner geerntet und zur Kartierung von *Ddw1* verwendet (Korzun et al. 1996). Durch zweimalige Selbstung wurde am Julius Kühn-Institut eine $F_{3:4}$ -Population ($N = 44$) erstellt (**Abbildung A 1**). In dieser Population wurden elf am *Ddw1*-Locus heterozygote F_4 -Individuen selektiert. Diese wurden durch Selbstung zu elf $F_{4:5}$ -Linienfamilien mit unterschiedlicher Anzahl an Individuen fortgeführt. Als Linienfamilie (abgekürzt als $F_{k:n}$: Geht auf Generation k zurück und wurde bis zur Generation n vermehrt) wird eine Individuengruppe bezeichnet, die auf eine gemeinsame Ausgangspflanze einer definierten Generation zurückgeht. Für die Feinkartierung wurden 697 Pflanzen aus neun $F_{4:5}$ -Linienfamilien verwendet. Zwei Linienfamilien wurden aufgrund zu geringer Individuenanzahl ($N = 4$ bzw. $N = 6$) ausgeschlossen. Zum Aufbau der hochauflösenden Kartierungspopulation ($N = 3929$) wurden aus einer $F_{4:5}$ -Linienfamilie 36 im *Ddw1*-Zielbereich heterozygote F_5 -Einzelpflanzen ausgewählt und geselbstet. Nach Genotypisierung der $F_{5:6}$ -Population, wurden 298 rekombinante Genotypen, 13 für *Ddw1* homozygot kurze und 13 homozygot normalstrohige Kontrollgenotypen bis zur $F_{6:7}$ -Generation durch Selbstung fortgeführt. Zur Beschreibung des Phänotyps (Wuchshöhe (WH), Tausendkorngewicht (TKG)) in der hochauflösenden Population wurden 28 $F_{5:6}$ -Familien mit ≥ 80 Individuen verwendet (Teil B in **Abbildung A 1**).

Erstellung des Near-Isogenic Bulk-Material

Durch markergestützte Selektion (MAS) wurden zwei am *Ddw1*-Locus homozygote $F_{4:5}$ -Genotypen aus einer der neun Linienfamilien ausgewählt, um pro Genotyp eine $F_{5:6}$ -Linienfamilie mit 24 Pflanzen

durch Selbstung zu erstellen. Um nah-isogene Bulks (NIB) mit 96 Individuen pro Genotyp für die Hochdurchsatzsequenzierung zu erstellen, wurden aus allen 24 $F_{5:6}$ -Einzelpflanzen (EP) je vier $F_{6:7}$ -Nachkommen durch Selbstung erzeugt (Teil A in **Abbildung A 1**).

2.1.2. Markerressourcen zur Selektion des Pflanzenmaterials

Der Aufbau der Kartierungspopulation und die Bildung der NIB wurden durch molekulare Marker unterstützt. In **Tabelle 3** werden alle eingesetzten Marker zusammengefasst. **Abbildung A 1** skizziert, neben den phänotypischen, auch die Marker-gestützten Selektionsschritte. Um eine biparentale $F_{4:5}$ - bzw. $F_{5:6}$ -Kartierungspopulation aufzubauen, wurden in der $F_{3:4}$ -Population ($N = 44$) mit *Ddw1* gekoppelte Marker, der proximale Marker *tcos4366* und der distale Marker *tcos1137* verwendet, die ein 10,5 cM Intervall bildeten. Damit erfolgte die Selektion von elf am *Ddw1*-Locus heterozygoter F_4 Individuen, die dem Aufbau der $F_{4:5}$ -Kartierungspopulation dienten. Zum Aufbau von homozygoten NIB mit Hilfe neuer *Ddw1*-Marker (**Tabelle 3**), die ein 27,1 cM großes Intervall abdeckten, wurden zwei am *Ddw1*-Locus homozygote $F_{4:5}$ -Genotypen aus einer der Linienfamilien ausgewählt. Zum Aufbau der hochauflösenden Kartierungspopulation ($N = 3929$) wurden mit diesen Markern aus einer $F_{4:5}$ -Linienfamilie 36 im *Ddw1*-Zielbereich heterozygote F_5 -Einzelpflanzen selektiert. Zur Detektion rekombinanter Genotypen wurde die $F_{5:6}$ -Population mit dem proximalen Marker *c26102*, dem distalen Marker *c28517* und dem am engsten gekoppelten Marker *MACE3* genotypisiert. Zur Beschreibung des Phänotyps (WH, TKG) wurden die Individuen aus den $F_{5:6}$ -Familien anhand der Marker *c26102* und *c30002* ausgewählt.

2.1.3. Rekombinante Inzuchtlinien (*L2039-N x DH*)

Die Population rekombinanter Inzuchtlinien (RIL) entstammt aus der Kreuzung *L2039-N x DH* (Martis et al. 2013) und wurde zur genetischen Kartierung neuer Marker verwendet. Die Population besteht aus 100 Pflanzen und wurde am Julius Kühn-Institut in Groß Lüsewitz entwickelt. Sie entstammt einer Kreuzung zwischen der Elite-Inzuchtlinie *L2039* ohne Restorereigenschaften (-N) als Saaterter und einer doppelhaploiden (DH) rekombinanten Linie als Pollenelter. Die RIL Population *L2039-N x DH* ($N=100$) wurde sowohl mit DArT-Markern (Stein et al. 2001), als auch mit einem 15k Infinium SNP-Array, der aus einem 90k iSELECT SNP-Chip (Wang et al. 2014) entwickelt wurde, genotypisiert. Der 15k SNP-Array ist eine Entwicklung der Firma TraitGenetics GmbH (<http://www.traitgenetics.com>). Diese führte ebenso die Genotypisierung der Population *L2039-N x DH* durch.

Tabelle 3 Einsatz von molekularen Markern zum (A) Aufbau der Kartierungspopulation zur Feinkartierung von *Ddw1*, (B) Erstellung der NIB und Aufbau der hochauflösenden Population, (C) Selektion rekombinanter Genotypen in der hochauflösenden Kartierungspopulation, (D) phänotypischen Charakterisierung von *Ddw1* Genotypen und (E) hochauflösenden Kartierung von *Ddw1*. Die blaue Füllung kennzeichnet die Einsatzbereiche der Marker.

A	B	C	D	E	Marker	Vererbung	Markerkopplung in cM	Referenz
					<i>tcos4366</i>	codominant	1,5	Akhunov et al. 2010
					<i>tcos1137</i>	codominant	16,1	Akhunov et al. 2010
					<i>c26102</i>	codominant	0,8	Braun et al. 2019
					<i>c28517</i>	codominant	3,3	Braun et al. 2019
					<i>c27051</i>	codominant	4,1	Braun et al. 2019
					<i>c30002</i>	codominant	4,3	Braun et al. 2019
					<i>c20754</i>	codominant	10,5	Braun et al. 2019
					<i>tcos3110</i>	codominant	15,6	Akhunov et al. 2010
					<i>c26078</i>	codominant	16,5	Braun et al. 2019
					<i>c855</i>	codominant	25,8	Braun et al. 2019
					<i>MACE3</i>	dominant-rezessiv	0,2	Braun et al. 2019
					<i>dMACE3</i>	codominant	0,1	Braun et al. 2019
					<i>MACE1</i>	dominant-rezessiv	0,5	Braun et al. 2019
					<i>MACE2</i>	dominant-rezessiv	2,9	Braun et al. 2019
					<i>MACE4</i>	dominant-rezessiv	0,03	Braun et al. 2019
					<i>SC5R14198</i>	dominant-rezessiv	0,2	Braun et al. 2019
					<i>c15679</i>	codominant	0,7	Braun et al. 2019
					<i>c3251_c109325</i>	dominant-rezessiv		Diese Studie
					<i>dMACE3_2</i>	dominant-rezessiv		Diese Studie

2.1.4. Weizen-Roggen-Additionslinien

Disome Weizen-Roggen-Additionslinien wurden für die chromosomale Zuordnung neuer Marker eingesetzt. Sie wurden von Steve Reader (Department of Crop Genetics, John Innes Centre, Norwich, GB) zur Verfügung gestellt (Hackauf und Wehling 2005). In diesen Experimenten wurden ebenso die Roggensorte 'Imperial' und der Weizen 'Chinese Spring' verwendet.

2.1.5. Bestimmung von Polymorphismen in Genen der GA-Biosynthese und des GA-Signallings (Kandidatengenansatz)

Für die Sanger-Sequenzierung einzelner Marker der Gibberellinbiosynthese und Gibberellinsignaltransduktionsgene wurden zehn Roggeninzuchtlinien mit den Bezeichnungen *11/1662*, *11/1667*, *11/1730*, *11/1731*, *11/1732*, *11/1733*, *11/1739*, *11/1743*, *11/1744*, *11/1755* verwendet. Außerdem wurden zwei selbstfertile Eliteinzuchtlinien (*HYB201*, *HYB202*) aus dem 'Carsten'-Genpool, die von der Firma HYBRO Saatzucht GmbH & Co. KG erstellt wurden, eingesetzt. Zur Sequenzierung von *MACE3* wurden zusätzlich die *Ddw1* NIB *12/1148* (normalstrohiger Genotyp) und *12/1149* (kurzstrohiger Genotyp) verwendet.

2.2. Analyse der Wuchshöhe in der Kartierungspopulation

2.2.1. Phänotypische Datenerhebung

Die Phänotypisierung der Kartierungspopulation (N = 3929) wurde in Groß Lüsewitz durchgeführt. Für die Anzucht wurden die Körner in Petrischalen auf mit 0,2 % Kaliumnitrat (KNO₃)-Lösung getränktes Filterpapier gelegt und 24 h bei Raumtemperatur angekeimt. Danach wurden die Körner für 48 h bei 4°C in einer Kühlkammer vernalisiert. Nach der Vernalisierung wurden die Samen zurück in Raumtemperatur gebracht. Sobald sich Koleoptile entwickelten, wurden die Keimlinge direkt in Erde gegeben (96-er Multitopfplatten) und für acht Wochen im Gewächshaus vernalisiert. Um die Pflanzen an die Freilandbedingungen zu konditionieren, wurden sie nach diesen acht Wochen unter einen regensicheren Unterstand gestellt. Die fünf Monate alten Pflanzen wurden per Hand ins Feld nach dem Schema eines vollständig randomisierten Blockdesigns (RCBD) gepflanzt. Es wurden zwei Wiederholungen mit je acht Individuen angelegt. Eine Parzelle war 1,5 m lang und 1,2 m breit. Der Pflanzabstand zwischen den Reihen betrug 20 cm, sodass pro Parzelle acht Linien geprüft werden konnten. Um das Wachstum der Pflanzen zu unterstützen, wurden sie in den ersten Monaten zusätzlich bewässert und Unkraut wurde im zweiten Monat mechanisch beseitigt. Die für *MACE3* rekombinanten Genotypen, sowie die normalstrohigen Kontrollgenotypen wurden durch Selbstung erhalten. Die Einzelpflanzen wurden im Stadium der Gelbreife (BBCH 87) bis kurz vor der Ernte (BBCH

89) (BBCH-Skala nach Lancashire et al. (1991)) erfasst, wobei vom Boden bis zum Ende der jeweils längsten Ähre gemessen wurde. Jede Pflanze wurde einmal ohne Wiederholung gemessen. Nach der Ernte wurde für jeden Genotypen das TKG mit Hilfe des Saatkornanalysegerätes Marvin (GTA Sensorik GmbH, Neubrandenburg) bestimmt. Für die Validierung der Wuchshöhe der 298 rekombinanten Genotypen wurde ein Nachkommenschaftstest angesetzt. Je 13 normalstrohige und kurzstrohige homozygote Kontrollen wurden parallel in gleicher Weise analysiert. Dazu wurde die F₆-Generation verwendet.

2.2.2. Phänotypische Datenanalyse

Die uniforme Verteilung der gemessenen WH in der Population wurde mittels des Chi-Quadrat-Tests bei einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ geprüft. Alle statistischen Tests wurden mit Standardfunktionen der Programmiersprache R v.3.4.1 (R Core Team 2017) und R Studio v.1.0.153 (R Studio Team 2016) ausgeführt. Varianzanalyse und Mittelwertvergleichstest nach Tukey ($p < 0.05$) zur Analyse der WH und des TKG wurden mit dem R-Paket agricolae (<https://CRAN.R-project.org/package=agricolae>; de Mendiburu 2017) berechnet. Um signifikante phänotypische Unterschiede zwischen den rekombinanten Genotypen und den homozygoten normalstrohigen bzw. kurzstrohigen Genotypen auszuwerten, wurde ein zweiseitiger Dunnett-Test (Dunnett 1955), der in den R-Paketen lme4 (Bates et al. 2015) und multcomp (Hothorn et al. 2008) enthalten ist, durchgeführt. Dabei wurde eine Typ I Fehlerrate von $\alpha = 0,01$ verwendet. Erste und zweite Wiederholung des Nachkommenschaftstests wurden als Faktor berücksichtigt. Zur Einstufung des heterozygoten kurzstrohigen Phänotyps wurde mit dem Grenzwert ≤ 74 cm das Spaltungsverhältnis pro Phänotyp ermittelt. Der Grenzwert liegt über dem Durchschnitt der Kurzstrohigen in der hochauflösenden Population. Ein Spaltungsverhältnis mit 50–80 % kurzstrohigem Anteil wurde als heterozygot kurz eingestuft.

2.3. Markerentwicklung für die Kartierung von *Ddw1*

Für die Kartierung von *Ddw1* wurden verschiedene Ansätze zur Entwicklung molekularer Marker angewandt. Bei der Transkript-basierter Markeranreicherung wurden Roggentranskripte aus der neu erstellten Sequenzressource nach ihrem Expressionsmuster ausgewählt. Ferner dienten Transkripte bei einem Kandidatengenansatz für Gene des Gibberellinstoffwechsels und der Gibberelinsignaltransduktion als Basis der Markerentwicklung. Beim Positions-basierten Ansatz wurden in der Sequenzressource homologe Roggensequenzen in teils kartierten Sequenzen identifiziert. Diese kartierten Sequenzen waren bekannte Roggen- und andere Gräserressourcen, um über Syntanie Aussagen über deren Lokalisation ableiten zu können.

2.3.1. Transkript-basierte Markerentwicklung

cDNA-Sequenzanalyse von nah-isogenen Bulks

Die Massensequenzierung der cDNA zur *de novo* Transkriptomanalyse wurde nach der Methode *massive analysis of cDNA ends* (MACE) durchgeführt. Dazu wurde Gesamt-RNA aus beiden NIB von je sechs Gewebetypen an unterschiedlichen Entwicklungsstadien extrahiert. Die verwendeten Gewebetypen mit ihrem jeweiligen Entwicklungsstadium sind in **Tabelle 4** aufgelistet. Für die RNA-Extraktion wurde das NucleoSpin miRNAkit (Machery Nagel, Düren) verwendet, das die Trennung in große und kleine RNA-Fragmente ermöglicht. Isoliert wurde sowohl der Anteil der RNA mit ≥ 200 bp Länge, als auch die kleine RNA Fraktion ($150 \text{ bp} \leq x \leq 200 \text{ bp}$). Unter Verwendung des GenXPro MACE kit (GenXPro, Frankfurt am Main) wurden aus der größeren Fraktion die MACE-Bibliotheken und aus der kleineren Fraktion die miRNA-Bibliotheken erstellt. Die RNA-Qualität wurde durch den Elektrophoreseansatz *Plant RNA nano* auf dem Agilent2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) bestimmt. Die Proben wurden in einem Illumina Hiseq2000 mit einer Zyklusdauer von 1×100 bp sequenziert. Die Vorbereitung der RNA-seq Bibliotheken, die Sequenzierung mit Illumina Hiseq2000 und die Quantifizierung der mRNA Expression wurden von GenXPro GmbH (Frankfurt am Main), wie von Zawada et al. (2014) beschrieben, ausgeführt. Die Contig-Assemblierung der einzelnen Sequenzreads erfolgte mit Trinity RNA-Seq de novo Assembly (Version: trinityrnaseq_r20140717; Grabherr et al. (2011)).

Tabelle 4 Gewebe mit Entwicklungsstadium für cDNA-Sequenzanalyse von nah-isogenen Bulks (NIB).

Gewebe	BBCH-Stadium ¹	Beschreibung ¹
Keimwurzeln	7	
Korn	7	Keimung: Keimscheide (Koleoptile) aus dem Samen ausgetreten
Koleoptile	7	
2. Laubblatt	12	Blattentwicklung: 2-Blatt-Stadium
Halm	29	Bestockung: Ende der Bestockung
Halm	37	Schossen: Erscheinen des letzten Blattes (Fahnenblatt)
Halm	51	Ährenschieben: Beginn des Ährenschiebens
Ähre	51	

¹BBCH-Skala nach Lancashire et al. (1991)

Definition von Basis-Contigs aufgrund von Homologie

Die *de novo* erstellten Contigs wurden basierend auf vorhandenen Genomanalysen, Genmodellen oder Expressed Sequence Tags (ESTs) zugeordnet mit dem Ziel sie funktionell zu charakterisieren und sie aufgrund der Homologie zu im Gräsergenom lokalisierten Sequenzen physikalisch zu kartieren. Zur Identifizierung von Roggentranskripten wurde eine Blast-Analyse zur Bestimmung der homologen Sequenzen in teils kartierten Basis-Sequenzen durchgeführt. Diese Sequenzen waren folgende Roggenressourcen: Zwei Transkriptomdatensätze (Haseneyer et al. 2011; Khalil et al. 2015), genomische *whole-chromosome-arms* (WCA) *shotgun*-Sequenzen (Martis et al. 2013), *whole-genome shotgun* (WGS)-Contigs (v2) (Bauer et al. 2017), und 27784 prognostizierte Roggengenmodelle (Bauer et al. 2017). Ausserdem wurden Gräserressourcen genutzt um möglicherweise über Syntänie Aussagen zur Lokalisation machen zu können: Dies waren die Vollängen-cDNA-Sequenzen von Gerste (*Hordeum vulgare* L.) (Sato et al. 2009; Matsumoto et al. 2011), kodierende Sequenzen von *Aegilops tauschii* (Jia et al. 2013), *Triticum urartu* (Ling et al. 2013), Gerste (Mascher et al. 2017), *Brachypodium distachyon* (Vogel et al. 2010) und Reisproteinsequenzen (*Oryza sativa* subsp. *japonica*) (International Rice Genome Sequencing 2005) eingesetzt. Die Analyse erfolgte mit BLAST (Altschul et al. 1990) unter der Einstellung des Ähnlichkeitsgrenzwertes bei $E \leq 1E-20$. Die Kriterien für eine Zuordnung der Contigs waren eine Übereinstimmung von $\geq 80\%$ bei Nukleotiden und von $\geq 75\%$ bei Proteinen und einer Überlappung von ≥ 100 bp (bei Proteinsequenzen ≥ 30 Aminosäuren). Zur Annotation der Roggencontigs wurde die NCBI-Proteindatenbank NRPEP genutzt. Dazu wurde die Sequenzähnlichkeit mit dem Grenzwert bei $E \leq 1E-20$ zu anderen sequenzierten Pflanzenarten geprüft. Zur Translation der Nukleotidsequenzen in Aminosäuresequenzen wurde EMBOSS Transseq, ein Service des European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI), verwendet (Madeira et al. 2019).

Analyse der differentiellen Genexpression

Zur Datennormalisierung wurde die Relative Log Expression (RLE) mit Hilfe der im R-Paket DESeq2 (Love et al. 2014) verfügbaren Funktionen verwendet. Für die Auffindung differentiell exprimierter Gene (DEG) zwischen der kurzstrohigen Mutante und dem normalstrohigen Genotyp wurden die Halmexpressionsdaten (3 Wiederholungen) mit DESeq2 analysiert. Zur Detektion von DEGs wurde ein globales Signifikanzniveau ($\alpha = 0,05$) durch die Kontrolle der falsch positiven Rate (false discovery rate, FDR) nach Benjamini & Hochberg (Benjamini und Hochberg 1995) und ein „log₂-fold change“ (log₂FC) Grenzwert bei $x \geq 2$ (überexprimiert) oder $x \leq -2$ (unterexprimiert) verwendet. Die visuelle Darstellung der DEG wurde ebenfalls mit DESeq2 nach regularisierter logarithmischer Transformation (rlog) der Rohdatenexpressionswerte durchgeführt. Zum Vergleich von signifikanten Veränderungen der Genexpression und „fold changes“ wurden Z-Werte („z-scores“) verwendet. Den Roggentranskripten,

die differentielle Expression aufwiesen, wurden GO zugeordnet. Die Auffindung der signifikanten GO im MACE-Datensatz wurde mittels der R-Pakete GoSeq (Young et al. 2010) und gogadget (Nota 2017) durchgeführt. Durch Annahme der Wallenius-Verteilung wurde die Nullhypothese geschätzt (Young et al. 2010), um signifikante repräsentierte GO unter den DEG im Vergleich zum kompletten Datensatz zu finden und die adjustierten p-Werte (p_{adj}) zu berechnen. Zur Reduktion redundanter GO und zur systematischen Gruppierung, wurde mittels hierarchischer Clusteranalyse, mit Anlegung eines p_{adj} -Grenzwert bei $< 0,05$, ein GO-Netzwerk erstellt (Nota 2017). Die signifikanten GO-Termini wurden anschließend mit Hilfe von Revigo (Supek et al. 2011) auf funktionale Ähnlichkeit überprüft. Dies erfolgte getrennt nach den funktionellen Kategorien molekulare Funktionen, biologische Prozesse und zelluläre Lokalisation. Um funktionell redundante GO-Termini zu eliminieren wurde zum Vergleich zweier GO-IDs die Ähnlichkeitsmatrix simRel (Schlicker et al. 2006) verwendet. Als Ähnlichkeitsgrenzwert wurde 0,4 auf einer Skala von 0-1 für minimale bis maximale Ähnlichkeit eingestellt, um ein möglichst stringentes Ergebnis zu erzielen. Zur Darstellung der hierarchischen Clusteranalyse der GO-Termini wurden Streudiagramme mit Hilfe der auf dem Revigo-Server (<http://revigo.irb.hr/>) implementierten R-Pakete ggplot2 (Wickham 2016) und scales (<https://CRAN.R-project.org/package=scales>) erstellt. Die Bedeutung der signifikanten ($p_{adj} < 0,05$) GO wurde in der GO-Datenbank (Ashburner et al. 2000, The Gene Ontology Consortium 2019) ermittelt.

Markerentwicklung mittels Expressionsprofiling

Polymorphe Roggencontigs (2.3.2), die aufgrund des Vergleichs mit den Daten der WCA den Chromosomen 4RL und 5RL zugeordnet werden konnten, wurden zur Markerentwicklung ausgewählt. Die Abbildung der SNPs erfolgte mit dem Programm JMP (Version 15) (SAS Institute Inc. 2019). Um diese Contigs zu validieren, wurden Contigs mit mindestens einem Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP) in einem der beiden *Ddw1*-Genotypen selektiert. Die generischen Primerpaare wurden mittels Batchprimer3 (You et al. 2008) mit adaptierten Konditionen (GC-Anteil 40-60 %, Amplicongröße 200-500 bp, Schmelztemperatur (T_m 55-65 °C) bestimmt. Außerdem wurden Primer für die Variante der Allel-spezifischen Tetra-Primer mit Primer1 (Collins und Ke 2012) abgeleitet. Roggencontigs die differentielle Genexpression aufwiesen, wurden durch Nutzung der genomischen Ressourcen aus dem Roggen und *Aegilops tauschii* kartiert. Dadurch konnten weitere für die Analyse geeignete polymorphe Sequenzen im Zielbereich für *Ddw1* identifiziert und in Primersequenzen für die PCR-Analyse umgesetzt werden. Die Primersequenzen und PCR-Analysebedingungen sind in **Tabelle A 6** und **Tabelle A 13** aufgelistet.

Kandidatengenansatz für Gene der Gibberellinbiosynthese und Gibberellinsignaltransduktion im Roggen

Identifizierung

Die Roggengenomsequenz von Bauer et al. (2017) diente als Quelle zur Identifizierung von Genen, die in der GA-Biosynthese und Signaltransduktion eine Rolle spielen. Die Auswahl beruhte dabei auf der vorhergesagten Annotation in der Roggengenomsequenz (Bauer et al. 2017). Ergänzt wurde die Auswahl durch die Identifikation von putativen Roggen GA-Genen durch eine BLAST-Analyse des Roggengenoms mit definierten GA-Genen von Reis (Hirano et al. 2008; Huang et al. 2015) und Weizen (*Triticum aestivum* L.) (Pearce et al. 2015; Clavijo et al. 2017) als Abfragesequenzen. Der Wahrscheinlichkeitsgrenzwert wurde auf > 80 % für Reis und > 90 % für Weizen gesetzt und eine Basenpaarüberlappung von ≥ 100 bp gefordert. Orthologe Gene aus Reis und Weizen wurden aus der Datenbank Ensembl Plants, Version 41 (Aken et al. 2017) heruntergeladen. Wenn Treffern in der Roggengenomsequenz kein Genmodell zugeordnet war, wurde mit Hilfe des AUGUSTUS-Algorithmus (Stanke et al. 2008) eine Vorhersage für die *Lo7*-Contigs gemacht.

Analyse

Die Genstrukturen der Gibberellingene wurden mit Hilfe des frei verfügbaren Programms Gene Display Server (Hu et al. 2015) erstellt. Mit dem Programm CLUSTALW, das im Programm MEGA 7 (Kumar et al. 2016) verfügbar ist, wurden Alignments aus den Nukleotidsequenzen der nach der Sanger-Methode sequenzierten Roggencontigs und Gene erstellt. BlastP-Analysen wurden mit der Datenbank Ensembl Plants (Version 41) durchgeführt (Aken et al. 2017). Die phylogenetischen Bäume wurden im Programm MEGA 7 nach der Maximum-Likelihood-Methode, die auf dem Tamura-Nei Model basierte, berechnet (Tamura und Nei 1993). Mit Hilfe des Neighbor-Join- und BioNJ-Algorithmus (Gascuel 1997) wurde eine Matrix paarweiser Abstände durch den *Maximum Composite Likelihood* (MCL)-Ansatz geschätzt und die Baumtopologie mit dem höchsten logarithmischen Wahrscheinlichkeitswert ausgewählt. Positionen mit weniger als 80 % Wahrscheinlichkeit wurden eliminiert, sodass an keiner Position weniger als 20 % Lücken, fehlende Datenpunkte oder uneindeutige Basen zugelassen wurden.

Primerdesign

Für 27 putative GA-Roggengene wurden entsprechende Contigs ($E \leq 1E-20$) aus dem hier analysierten Transkriptomdatensatz oder der EST-Roggenressource von Haseneyer et al. (2011) zum Primerdesign verwendet. Primerpaare wurden mit dem Programm Batchprimer3 (You et al. 2008) mit modifizierten Einstellungen (GC-Gehalt 40-60%, Primerlänge 18-24 bp, Ampliconlänge 150-1000 bp, Optimum bei 500 bp) abgeleitet. Die Webanwendung Oligocalc (Kibbe 2007) diente zur Überprüfung der Wahrscheinlichkeit der Selbstamplifizierung und der Ausbildung von Haarnadelstrukturen. Splign

(Wheelan et al. 2001) wurde zur Kontrolle der Primerpositionen im jeweiligen Genmodell verwendet. Die Sequenzen und PCR-Analysebedingungen der sequenzierten und/oder kartierten GA-Genmarker sind in **Tabelle A 11** aufgelistet.

2.3.2. Positions-basierte Markerentwicklung

Vergleichende Kartierung mit Weizen, *Aegilops tauschii* und *Triticum urartu*

Über Syntänie der Gräser wurden weitere Marker identifiziert. Die Marker *tcos4366* und *tcos1137*, die ein engeres Intervall um *Ddw1* mit weiteren Markern definierten, wurden zur Identifizierung der orthologen Gene über Ähnlichkeitssuchen (blastN Algorithmus; $E \leq 1E-40$) im Weizen, *Aegilops tauschii* und *Triticum urartu* verwendet. Entsprechende Sequenzinformationen wurden über die Datenbank Ensembl Plants (Version 41) (Aken et al. 2017) ermittelt. Nach der Feinkartierung und der Genotypisierung der hochauflösenden Kartierungspopulation wurde mit den Markern *MACE3* und *c15679* nach Weizenscaffolds im TGACv1 *whole genome shotgun assembly* (Mayer et al. 2014) gesucht. Die Suche erfolgte mit blastN ($E \leq 1E-20$) auf dem URGI *wheat blast server* (<https://wheat-urgi.versailles.inra.fr/>). Zur Strukturierung der Weizen und *Aegilops tauschii*-Scaffolds wurden Gene mit dem AUGUSTUS-Algorithmus (Stanke et al. 2008) vorhergesagt. Diese Gene wurden als Suchsequenz gegen die Genome von *Aegilops tauschii*, *Triticum urartu* und Weizen zur Identifizierung bereits beschriebener Genen sowie entsprechender Roggentranskripte verwendet. Darüber hinaus wurde eine mögliche chromosomale Verortung auf dem Zielchromosom 5R über eine Ähnlichkeitssuche gegen die WCA-5R-Sequenz (Akzession ERX140516; Martis et al. 2013) in der NCBI-Datenbank *Sequence Read Archive Nucleotide* (SRA) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>) ausgeführt. Um repetitive Elemente aufzuspüren wurde eine blastN -Suche ($E \leq 1E-20$) auf der *Transposable Elements Platform* (TREP) (Wicker et al. 2007) durchgeführt, sodass diese von der Markerentwicklung ausgeschlossen werden konnten. Die Auswahl der Roggentranskripte für das Primerdesign erfolgte nach einer Stringenz $\geq 80\%$ -Ähnlichkeit über ≥ 100 bp. Durch die simulierte Genstruktur konnte die Ableitung von Primern, die Introns überspannen, erstellt werden. Primer wurden mit Primer3 (v.04.0) (Rozen und Skaletsky 2000) und BatchPrimer3 (Davis Server) unter Berücksichtigung modifizierter Einstellungen (Produktgröße 200-1500 bp, GC Gehalt 40-60 %, T_m 55-65°C, T_m -Differenz zwischen den Primerpaaren $\leq 5^\circ\text{C}$) abgeleitet. Weiterhin wurden 13 Tetra-Primer für polymorphe Roggentranskripte mit Primer1 abgeleitet. Die PCR-Bedingungen und Sequenzen der Gen-basierten *Ddw1* und auf Chromosom 5R lokalisierten Oligos sind in **Tabelle A 13** zusammengefasst.

Roggengenom-basierte Marker

Ähnlich zu dem oben beschriebenen Ansatz der vergleichenden Kartierung (2.3.2.) wurde in der *Lo7* Roggengenomsequenz (Bauer et al. 2017) das *Ddw1*-Zielintervall durch Ankermarker identifiziert. Das durch *MACE1* und *c15679* definierte Intervall erstreckt sich über neun *Lo7*-Contigs. Die vorhandenen 42 hochauflösenden SNPs des 600k-Genotypisierungsarrays für Roggen (Bauer et al. 2017) wurden zum Primerdesign von 36 Tetra-Primer-Sätzen genutzt. Die erwünschte innere Primerampliconlänge lag zwischen 150 bp-600 bp und belief sich auf einen GC-Anteil zwischen 30-70 %. Sequenzen der *Ddw1* und übrigen Chromosom 5R Tetra-Primer und deren PCR-Analysebedingungen sind in **Tabelle A 13** aufgelistet.

2.4. Molekulare Analysen

2.4.1. Extraktion der genomischen DNA

Zur Extraktion der DNA aus Roggen wurde eine Variante der Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) Methode nach Stein et al. (2001) angewendet. Für die Lagerung in 1,2 ml Mikrotiterplatten mit 96 Wells wurde das halbe Volumen verwendet. Pflanzenmaterial wurde von den jüngsten zwei bis drei Blättern geschnitten und in Mikrotiterplatten (Qiagen, Hilden, D) gesammelt. Bevor die Blattproben zwei Mal in einer Retschmühle mit 3 Wolframcarbidkugeln für je 30 s bei 25 Hz homogenisiert wurden, wurden sie in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Platte wurde kurz bei 6000 U·min⁻¹ zentrifugiert und auf Eis gestellt. Dann wurden 500 µl CTAB-Extraktionspuffer (Konzentration der Bestandteile: 2 % (w/v) CTAB, 200 nM Tris-HCl (pH= 8), 20 nM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (pH= 8), 1,4 M NaCl, 1 % (w/v) Polyvinylpyrrolidon, 1 % Mercaptoethanol auf 65°C temperiert) hinzugefügt. Die Platte wurde in einem 65°C warmen Wasserbad für eine Stunde erhitzt und dann für je 15 min im Gefrierschrank und Kühlschranks heruntergekühlt. Nachdem 400 µl kalter Dichlormethan-Isoamylalkohol (Verhältnis 24:1) hinzugegeben und die Platte umgedreht für 15 min bei 4°C geschüttelt wurde, erfolgte die Zentrifugation bei 3850 U·min⁻¹ für 30 min bei 4°C. Nach Überführung von 400 µl des Überstands in eine neue 1,2 ml Mikrotiterplatten (4titude Ltd, Berlin, D) wurden zu jeder Probe 6,25 µl RNase (Roche, Mannheim, D) hinzugefügt. Die Platte wurde mit einer Matte versiegelt und die Lösung anschließend durch Invertieren und durch kurzes Zentrifugieren bei bis zu 6000 U·min⁻¹ gemischt. Die DNA-Lösung wurde für 15 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde zur Fällung der DNA 0,7 Volumen Isopropanol (C₃H₈O) (≈280 µl) zu jeder Probe hinzugegeben und die Platte erneut versiegelt, um die Proben durch sechsmaliges Invertieren zu mischen. Die nachfolgende Zentrifugation bei 3850 U·min⁻¹ für 20 min bei Raumtemperatur diente dem Erhalt des DNA-Pellets. Durch Invertieren der Platte auf ein Papiertuch wurde der Überstand verworfen und der Rest des Überstands entfernt, indem die Platte umgedreht auf ein Papiertuch geschlagen wurde. Um die Wells

zu waschen, wurde 0,7 Volumen ($\approx 350 \mu\text{l}$) Waschlösung (76 % Ethanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$) und 200 nM Natriumacetat ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$)) zu jeder Probe hinzugefügt. Dann wurde die Platte ohne Abdeckung bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert. Nach dem Zentrifugieren für 10 min bei $3850 \text{ U}\cdot\text{min}^{-1}$ wurde der Überstand wie zuvor beschrieben entfernt und ein zweiter Waschschrift durch die Zugabe von $350 \mu\text{l}$ ($\approx 0,7$ Volumen) Waschlösung (76 % Ethanol und 10 nM Ammoniumacetat ($\text{C}_2\text{H}_7\text{NO}_2$)) durchgeführt. Inkubation, Zentrifugation und Verwerfen des Überstands erfolgten wie für den ersten Waschschrift beschrieben. Im letzten Waschschrift inkubierte das DNA-Pellet in $350 \mu\text{l}$ gekühltem 80 % Ethanol für 5 min bei Raumtemperatur. Nach Entfernen des Überstands wurde das DNA-Pellet im Inkubatorschrank für mindestens 10 min luftgetrocknet und dann in $100 \mu\text{l}$ TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH= 8; 1 mM EDTA, pH= 8) resuspendiert. Die Qualität der DNA wurde auf einem Gel mit 2 % Agarose kontrolliert. Dabei diente ein 100 bp-Größenstandard (AppliChem, Darmstadt, D) als Referenz. Die Quantität der DNA wurde mit dem Spektrophotometer Infinite 200 NanoQuant (Tecan Group AG, Männedorf, CH) überprüft. Um die Arbeitslösung herzustellen, wurde mit Wasser auf $5 \text{ ng}/\mu\text{l}$ verdünnt.

2.4.2. PCR- basierte Markeranalyse

2.4.2.1. Amplifizierung der STS-Marker

Die PCR-Reaktionen für die STS (*sequence-tagged site*: sequenzmarkierte Stelle) Marker wurden auf dem peqSTAR 96X Universal Thermocycler (VWR Life Science, Erlangen, D) inkubiert. Eine Reaktion beinhaltete 50 ng genomische DNA. Ihr Gesamtvolumen betrug $25 \mu\text{l}$ und wurde mit $20 \mu\text{l}$ Mineralöl überschichtet (Sigma-Aldrich, Darmstadt, D). Der Standard-PCR-Ansatz bestand aus 1X green GoTaq Flexi Reaktionspuffer (Promega, Madison, WI, USA), 1,5 mM MgCl_2 (Promega, Madison, WI, USA), 150 mM von jedem dNTP (Roth, Karlsruhe, D), 5 pmol von beiden *forward* und *reverse* Primern (Metabion international AG, Planegg, D) und 5 U *Taq*-DNA-Polymerase (Promega, Madison, WI, USA). Bei der Genotypisierung wurde ein halber Reaktionsansatz verwendet. Die PCR-Reaktion wurde durch Variation der MgCl_2 -Konzentration gegebenenfalls optimiert (**Tabelle A 6**, **Tabelle A 11**, **Tabelle A 13**). Die anfängliche Denaturierung bei 95°C für 2 min wurde mit 30-45 Denaturierungszyklen bei 94°C für je 20 s fortgeführt. Die Annealingreaktion erfolgte bei Primer-spezifischer Temperatur ($50\text{-}65^\circ\text{C}$) für 1 min und der Extensionsschritt bei 72°C für 3 min. Die PCR-Reaktion wurde mit einem letzten Extensionsschritt bei 72°C für 10 min beendet. Im Falle einer Markervalidierung auf Sequenzebene wurden die Oligos mit 1X farblos GoTaq Flexi Reaktionspuffer (Promega, Madison, WI, USA) amplifiziert und zur Durchführung der Sanger-Sequenzierung an LGC Genomics (Berlin, D) versendet.

2.4.2.2. Restriktionsverdau

Cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS, gespaltene amplifizierte polymorphe Sequenz) diente als Methode zur Kartierung. Dazu wurde jeweils 5 µl des PCR-Produkts mit indikativen Restriktionsenzymen (New England BioLabs NEB, Ipswich, MA, USA) geschnitten (**Tabelle A 6, Tabelle A 11, Tabelle A 13**). Die Restriktion erfolgte unter den vom Hersteller angegebenen Bedingungen in einem Reaktionsansatz von 10 µl und enthielt 1X CutSmart Puffer (NEB, MA, USA) mit BSA (100 µg/mL) und Wasser ohne Nuclease. Für die Restriktion mit dem Enzym *Taq*^qI wurde stattdessen 1X *Taq*^qI Puffer (1 M NaCl; 0,1 M MgCl₂; 0,1 M Tris-HCl, pH 8,4), 100 µg/mL Bovines Serumalbumin (BSA) (20 mg/mL) (NEB, MA, USA) und Wasser ohne Nuclease verwendet. Der Restriktionsansatz wurde über Nacht bei 37°C bzw. für *Taq*^qI bei 65°C inkubiert.

2.4.2.3. Tetra-primer ARMS PCR

Zur SNP Genotypisierung wurde die Tetra-Primer ARMS (*amplification-refractory mutation system*) PCR-Methode (Collins und Ke 2012; Medrano und de Oliveira 2014) verwendet. Das Gesamtvolumen der PCRs betrug 10 µl und enthielt 25 ng DNA, DNA 1X green GoTaq Flexi Reaktionspuffer (Promega, Madison, WI, USA), 1,5 mM MgCl₂ (Promega, Madison, WI, USA), 150 mM von jedem dNTP (Roth, Karlsruhe, D), 10 pmol von den inneren Primern, 1 pmol von den äußeren Primern (Metabion international AG, Planegg, D) und 0,5 U *Taq*-DNA-Polymerase (Promega, Madison, WI, USA). Analog zu den Standardmarkeranalysen wurde die Reaktion der als AX- und MACetp-indizierten Marker optimiert (**Tabelle A 13**). Die Denaturierung erfolgte 2 min bei 95°C, gefolgt von weiteren 35-40 Zyklen zur Denaturierung mit je 1 min bei 95°C, 30 s Annealing bei Primer-spezifischer Temperatur (55-65°C) und Extension bei 72°C für 1 min. Die PCRs wurden nach einem letzten Extensionsschritt bei 72°C für 5 min beendet. Zur Etablierung der PCR-Konditionen liefen die ersten PCR-Reaktionen ohne das innere Primerpaar.

2.4.2.4. Gelelektrophorese

Die Gele der Gelelektrophorese enthielten in Abhängigkeit der Bandenlänge 2-3 % Universalagarose (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, D), 1X Tris-Borat-EDTA (TBE) Puffer (0,089 M Tris, 0,089 M Borsäure; 2 mM EDTA, pH 8,0) und 8-12 Tropfen der 0,025 % Ethidiumbromidlösung (Roth, Karlsruhe, D). Die einzelnen Taschen wurden mit je 5-7 µl PCR-Produkt beladen und eine einzige Tasche pro Reihe mit 2 µl 100 bp Längenstandard (AppliChem, Darmstadt, D). Um PCR-RFLPs zu analysieren, wurde das gesamte Volumen des Restriktionsprodukts (10 µl) eingesetzt. Erfolgte die PCR mit

farblosem Puffer, wurde zu jeder Probe vor der Auftrennung auf dem Gel 2 µl Ladepuffer (10 mM EDTA, 0,1 % basisches Fuchsin, 0,01 % Bromophenolblau, 95 % Formamid) hinzugefügt.

2.5. Genetische Kopplungsanalyse

Die molekularen Marker wurden zunächst in Roggen 'Imperial', den *Ddw1*-NIB 12/1148 und 12/1149 und Weizen 'Chinese Spring' etabliert. Nach Etablierung von PCR-Amplifikationen erfolgte ein Screening nach Polymorphismen in vier *Ddw1*-Genotypen mit bekanntem Phänotyp und den *Ddw1*-NIB. Wasser diente als Negativkontrolle der Methode. Alle über Weizen-Roggen Additionslinien lokalisierten Marker, wurden darüber hinaus im Roggen 'Imperial' und Weizen 'Chinese Spring' auf Polymorphismen hin geprüft. Eine weitere Überprüfung auf Polymorphismen erfolgte in fünf Individuen der RIL Population *L2039-N x DH*, um die genetische Position einzelner Marker zu ermitteln.

2.5.1. Genetische Kartierung in der *Ddw1*-Kartierungspopulation *R1620 x R347/1*

Die Kopplungsanalyse der Marker erfolgte mit Hilfe des Softwarepakets JoinMap v.4.0 (Van Ooijen 2006). Für die Umwandlung der Rekombinationswerte in genetische Abstände (centiMorgan, cM) wurde die Kosambi-Funktion (Kosambi 1943) verwendet. Die genetische Feinkartierung des dominanten Kurzstrohgens *Ddw1* in *R1620 x R347/1* basierte auf der Grundlage von 685 Einzelpflanzen. Die Loci auf den einzelnen Kopplungsgruppen wurden nach dem Ansatz der Regressionskartierung (LOD-Score = 0) bestimmt. Alle genetischen Kopplungskarten wurden mit Mapchart v.2.3 (Voorrips 2002) graphisch dargestellt.

2.5.2. Erstellung der hochauflösenden Karte für *Ddw1*

Zur Genotypisierung der Kartierungspopulation wurden der distale *c28517* und proximale *Ddw1*-Marker *c26102*, sowie der enger gekoppelte Marker *MACE3* eingesetzt (**Tabelle 3**). Bei der ersten Genotypisierung der gesamten Population wurden zusätzlich die distalen Marker *c27051*, *c30002* und der proximale Marker *tcos4366* verwendet (**Tabelle 3**). Zur weiteren Auflösung des *Ddw1*-Locus wurden homozygote Kontrollen für den normalstrohigen und kurzstrohigen Genotyp und 298 Genotypen, in denen Rekombination zwischen *c28517*, *MACE3* und *c26102* identifiziert wurde, mit weiteren Markern genotypisiert. Zu diesem Zweck wurden die Marker *MACE1* und *MACE2*, sowie die neu entwickelten *Ddw1*-Marker *MACE4*, *dMACE3*, *dMACE3_2*, *c15679*, *SC5R14198*, *c3251_c109325* eingesetzt (**Tabelle 3**). Detaillierte Angaben zu den Markern befinden sich in **Tabelle A 13**.

3. ERGEBNISSE

3.1. Analyse der Wuchshöhe der Kartierungspopulation für *Ddw1*

3.1.1. Spaltungsdaten des dominant-rezessiv vererbten *Ddw1*-Gens

Die genetische Kartierung basiert auf Nachkommenschaften der langstrohigen Roggenlinie *R1620* (*ddw1*) mit der kurzstrohigen Roggenlinie *R347/1* (*Ddw1*) (**Abbildung A 1**). Damit sollte sichergestellt werden, dass die Differenzierung der Wuchshöhe in der daraus entstandenen Kartierungspopulation auf das dominant-rezessiv vererbte Verzweigungsgen *Ddw1* zurückzuführen ist. Aufgrund des beobachteten Spaltungsverhältnisses zwischen kurzstrohigen und langstrohigen Pflanzen konnte gezeigt werden, dass *Ddw1* das einzige Gen mit einem großen Einfluss auf die Wuchshöhe war.

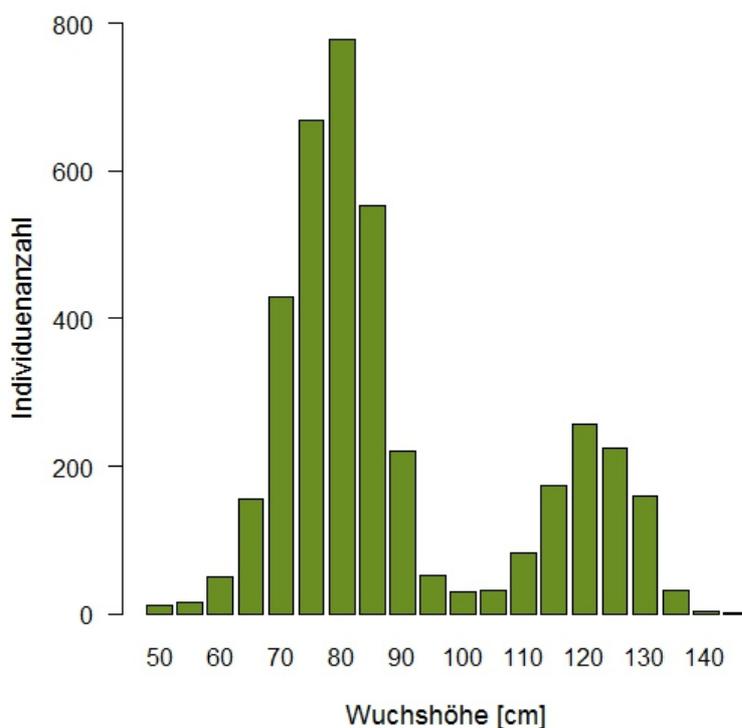


Abbildung 3 Häufigkeitsverteilung in der für das *Ddw1*-Gen spaltenden $F_{5,6}$ -Population (N = 3929) für das Merkmal Wuchshöhe. Die Population entstammt der Kreuzung *R1620* (*ddw1*) x *R347/1* (*Ddw1*).

Zum Aufbau der hochauflösenden Kartierungspopulation (N = 3929) wurden aus einer $F_{4,5}$ -Linienfamilie 36 im *Ddw1*-Zielbereich heterozygote F_5 -Einzelpflanzen ausgewählt und geselbstet. Die Analyse der Spaltungsdaten der Wuchshöhe in der $F_{5,6}$ -Einzelpflanzennachkommenschaft ergab eine bimodale Häufigkeitsverteilung (**Abbildung 3**). Die 3929 Pflanzen unterteilten sich in zwei Gruppen, entweder größer oder kleiner als 94 cm. Die beobachtete Spaltung in 2969 kurzstrohige und 960

normalstrohige Pflanzen, weicht nicht signifikant ($p < 0,05$) von einem 3:1-Verhältnis zwischen kurzen und langen Pflanzen ab (**Tabelle A 1**). Ein solches Spaltungsverhältnis wurde auch in Generation $F_{4:5}$ beobachtet. In dieser Vorgängerpopulation, bestehend aus 697 Pflanzen, waren 517 kleiner und 180 Pflanzen größer als 85 cm (**Abbildung A 2**). Auch diese Spaltungsdaten legen nahe, dass in dieser Population ein einzelnes, dominantes Kurzstrohgen spaltet.

3.1.2. Effekt von *Ddw1* auf Wuchshöhe und Tausendkorngewicht

Mit den beiden codominanten, *Ddw1*-flankierenden Markern *c26102* und *c30002* (**Tabelle 3**) wurden die genetischen Klassen bestimmt und diese dann ausgewertet. Das Ziel war die Definition von Phänotyp-Klassen. Besonderes Augenmerk lag auf der Abgrenzung der heterozygoten Klasse. Dazu wurden für 28 $F_{5:6}$ -Linienfamilien mit je ≥ 80 Individuen die drei Genotypklassen (*Ddw1Ddw1*, *Ddw1ddw1*, *ddw1ddw1*) bestimmt, um die Wirkung von *Ddw1* auf die Wuchshöhe zu beschreiben. Linienfamilie bezieht sich auf die Herkunft der jeweiligen Individuen, die sich darauf zurückverfolgen lässt, dass 36 für die *Ddw1*-Region auf 5RL heterozygote F_5 -Einzelpflanzen mit Markern genotypisiert wurden und durch Selbstung dieser F_5 -Einzelpflanzen die F_6 -Linienfamilien erstellt wurden (**Abbildung A 1**). Die durchschnittliche Wuchshöhe der Genotypen *ddw1/ddw1* (normalstrohig) betrug 118,7 cm, die der Heterozygoten 78,6 cm und die Wuchshöhe der kurzstrohig Homozygoten (*Ddw1/Ddw1*) 73,1 cm (**Tabelle 6, Abbildung 4**). Der Tukey-Test ($p < 0,05$) zeigte, dass die Unterschiede zwischen allen drei phänotypischen Klassen signifikant waren (**Tabelle 6**). Diese Verteilung traf auch für das TKG zu (**Abbildung 4, Tabelle 5**). Das TKG der kurzen Phänotypen (*Ddw1/Ddw1*) war im Vergleich zu den homozygot normalstrohigen Phänotypen (*ddw1/ddw1*) reduziert, wohingegen es in den heterozygoten Pflanzen weniger reduziert war. Wie zuvor für Wuchshöhe zeigte der Mittelwertsvergleich (Tukey; $p < 0,05$), dass die Unterschiede zwischen den Genotypen signifikant waren (**Tabelle 6**).

3.1.3. Validierung der Wuchshöhe in der Nachkommenschaft

Um eine hochauflösende Karte zu erstellen, wurde die komplette $F_{5:6}$ -Population mit den *Ddw1* proximalen Markern *c26102*, *tcos4366* und distalen Markern *c27051*, *c28517*, *c30002* genotypisiert (**Tabelle 3**). Auch der Marker *MACE3*, der in der $F_{4:5}$ -Population mit 0,1 cM zu *Ddw1* kartiert wurde (**Abbildung 15**, Braun et al. 2019), diente als Marker für die Genotypisierung der $F_{5:6}$ -Population. Bei Auswertung der Genotypisierungsdaten und phänotypischen Daten der $F_{5:6}$ -Population wurden 298 Genotypen als rekombinant für die Marker *c26102*, *c28517* und *MACE3* identifiziert. Diese wurden zur Überprüfung erneut angebaut. Die durchschnittliche Wuchshöhe der $F_{6:7}$ -Nachkommenschaft war im Vergleich zu der Wuchshöhe der $F_{5:6}$ -Population kleiner. Die normalstrohige Kontrolle maß 83,0 cm

und die kurzstrohige Kontrolle 51,4 cm. In der F_{6:7}-Nachkommenschaft wurden Individuen identifiziert, die sich signifikant von den homozygot kurzstrohigen und normalstrohigen Kontrollen im Merkmal Wuchshöhe unterschieden (Dunnett; $p < 0,05$). Von den 298 rekombinanten Genotypen, wurden fünf als kurzstrohig (15/1816, 15/1822, 15/1824, 15/1827, 15/1948), vier als heterozygot kurzstrohig (15/1817, 15/1818, 15/1823, 15/1828) und sieben als normalstrohig (15/1829, 15/1830, 15/1831, 15/1833, 15/1835, 15/1836, 15/1840) eingestuft (**Tabelle A 4, Abbildung 6**). Dies waren allesamt Individuen, für die in der Phänotypisierung der F_{5:6}-Population eine Wuchshöhe im Grenzbereich bei 95-99 cm (normalstrohig) oder bei 88-93 cm (kurzstrohig) ermittelt worden war (**Abbildung 6**). Der erneute Validierung der Wuchshöhe in der F_{6:7}-Nachkommenschaft hat drei Rekombinante zwischen *Ddw1* und *MACE3* bestätigt: Es wurden 15/2101, 15/2102 als normalstrohig und 15/1834 als heterozygot kurzstrohig bewertet (**Abbildung 6**). Der Genotyp 15/1834 wurde trotz signifikanter Unterschiede zu der kurzstrohigen Kontrolle (Dunnett, $p < 0,05$) (**Tabelle A 4**) bei individueller Betrachtung der Einzelpflanzenmesswerte (56 % der Einzelpflanzen ≤ 74 cm) als heterozygot kurz eingestuft.

Tabelle 5 Mittelwerte und Signifikanz der Wuchshöhe und Tausendkorngewicht von *Ddw1* Genotypen aus F_{5:6}-Linienfamilien (≥ 80 Individuen, selektiert mit den Markern *c26102* und *c30002*).

Merkmal	Genotyp	N	Mittelwert \pm Std.fehler	t-Wert	Pr(> t)	Signifikanz
WH (cm)	<i>ddw1ddw1</i>	769	118,75 \pm 0,26	453,6	<2e-16	***
WH (cm)	<i>Ddw1ddw1</i>	1436	78,64 \pm 0,32	329,9	<2e-16	***
WH (cm)	<i>Ddw1Ddw1</i>	758	73,09 \pm 0,37	330,7	<2e-16	***
TKG (g)	<i>ddw1ddw1</i>	759	27,08 \pm 0,13	213,0	<2e-16	***
TKG (g)	<i>Ddw1ddw1</i>	1417	20,09 \pm 0,16	163,59	<2e-16	***
TKG (g)	<i>Ddw1Ddw1</i>	745	18,06 \pm 0,18	163,03	<2e-16	***

WH: Wuchshöhe (in cm)

TKG: Tausendkorngewicht (in g)

N: Anzahl der analysierten Individuen der R1620 x R347/1-Kartierungspopulation

Ddw1Ddw1: homozygoter Halbzweig

Ddw1ddw1: heterozygoter Halbzweig

ddw1ddw1: homozygoter Wildtyp

Mittelwerte \pm Standardfehler für die Merkmale WH im adulten Stadium und TKG

t-Werte

Pr(>|t|): p-Werte der Varianzanalyse

*** Differenz zwischen den Mittelwerten signifikant bei $p < 0,001$

Tabelle 6 Ergebnisse des Tukey-Tests zum Mittelwertsvergleich der Wuchshöhe und des Tausendkorngewichts zwischen den *Ddw1*-Genotypen in den F_{5,6}-Linienfamilien.

Merkmal	Genotyp 1	Genotyp 2	Mittlere Differenz	p adj	Untergrenze	Obergrenze
WH (cm)	<i>Ddw1Ddw1</i>	<i>ddw1ddw1</i>	-45,67 ^a	0	-46,54	-44,79
WH (cm)	<i>Ddw1ddw1</i>	<i>ddw1ddw1</i>	-40,12 ^b	0	-40,88	-39,36
WH (cm)	<i>Ddw1ddw1</i>	<i>Ddw1Ddw1</i>	5,55 ^c	0	4,78	6,31
TKG (g)	<i>Ddw1Ddw1</i>	<i>Ddw1ddw1</i>	-6,99 ^a	0	1,62	2,36
TKG (g)	<i>ddw1ddw1</i>	<i>Ddw1Ddw1</i>	9,03 ^b	0	8,61	9,45
TKG (g)	<i>Ddw1ddw1</i>	<i>ddw1ddw1</i>	2,03 ^c	0	6,67	7,41

WH: Wuchshöhe (in cm)

TKG: Tausendkorngewicht (in g)

Ddw1Ddw1: homozygoter Halbzwerg

Ddw1ddw1: heterozygoter Halbzwerg

ddw1ddw1: homozygoter Wildtyp

Mittlere Differenz: Unterschied zwischen zwei Genotypen

p adj: adjustierter P-Wert

Untergrenze und Obergrenze des zweiseitigen 95 % Konfidenzintervals

^{a,b,c}: Gruppen mit unterschiedlichen Kennbuchstaben (a, b, c) unterscheiden sich auf dem Signifikanzniveau $p < 0,05$

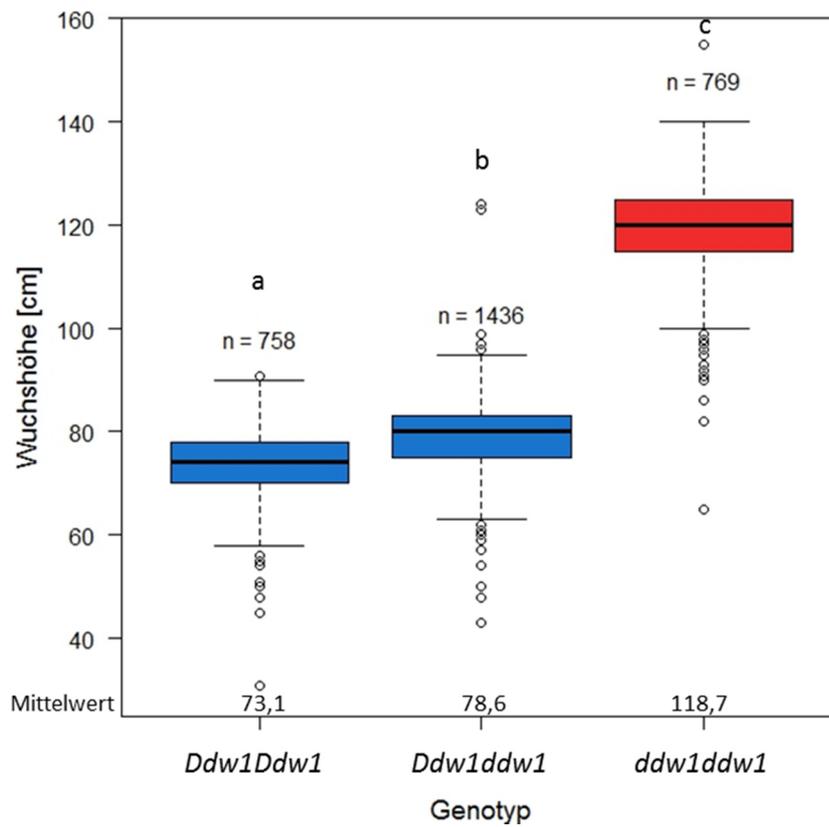


Abbildung 4 Vergleich der Wuchshöhe zwischen den drei phänotypischen Klassen in der *R1620 x R347/1* F_{5:6}-Population gestützt auf der Genotypisierung mit flankierenden *Ddw1*-Markern. Die Boxplots zeigen den Median, das obere und untere Quartil und die Whisker der homo- (*Ddw1Ddw1*) und heterozygoten (*Ddw1ddw1*) Halbzwerges, sowie der homozygoten normalstrohigen (*ddw1ddw1*) Phänotypen. Die Bestimmung der Markergenotypen basierte auf den flankierenden *Ddw1*-Markern *c26102* und *c30002*. Die drei Markergenotypen mit unterschiedlichen Kennbuchstaben (a, b, c) unterscheiden sich auf dem Signifikanzniveau $p < 0,05$.

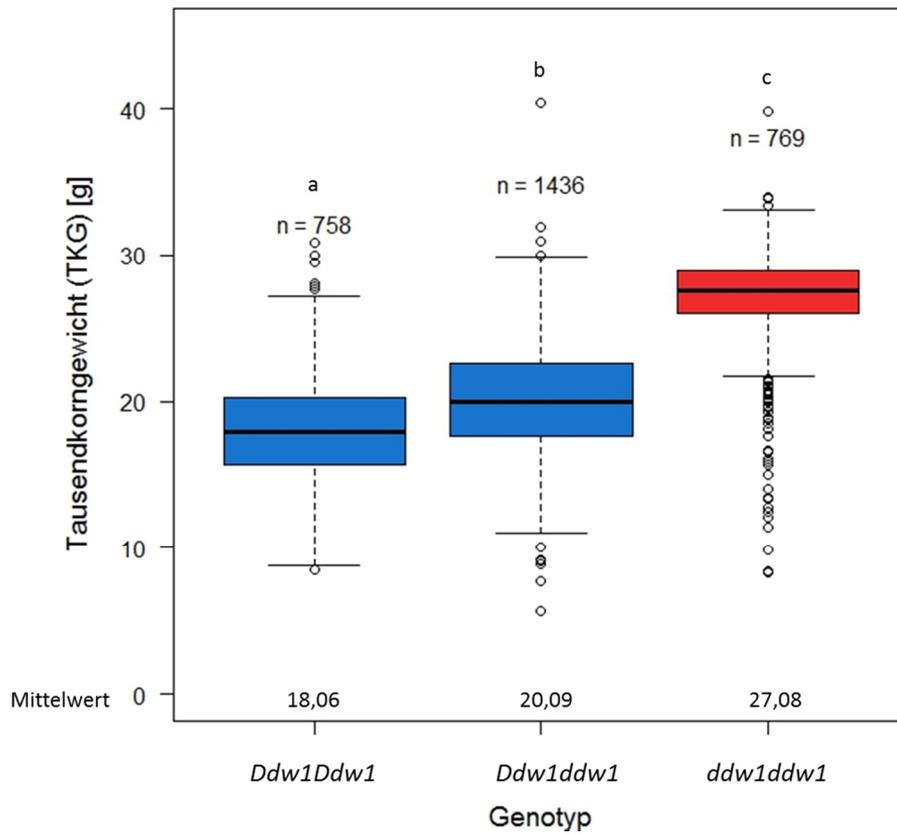


Abbildung 5 Vergleich des Tausendkorngewichts zwischen den drei phänotypischen Klassen in der für *Ddw1* spaltenden *R1620 x R347/1* F_{5,6}-Population. Die Boxplots zeigen den Median, das obere und untere Quartil und die Whisker der homo- (*Ddw1Ddw1*) und heterozygoten (*Ddw1ddw1*) Halbzwerg, sowie der homozygoten normalstrohigen (*ddw1ddw1*) Phänotypen. Die Bestimmung der Markergenotypen erfolgte mit den flankierenden *Ddw1*-Markern *c26102* und *c30002*. Die drei Markergenotypen mit unterschiedlichen Kennbuchstaben (a, b, c) unterscheiden sich auf dem Signifikanzniveau $p < 0,05$.

F _{5:6} Einzelpflanze	Wuchshöhe (cm)	F _{6:7} Linienfamilie	Wuchshöhe (cm)	Phänotyp. Klasse			Phänotyp. Klasse				
				c26102	tcos4366	MACE3	F _{5:6}	F _{6:7}	c28517	c27051	c30002
13-1404/147	88	15-1829	78,8	A	A	A	C	A	A	A	A
13-1415/78	90	15-1835	87,3	A	A	A	C	A	A	A	A
13-1418/2	90	15-1836	79,1	A	A	A	C	A	A	A	A
13-1405/136	91	15-1830	79,9	A	A	A	C	A	A	A	A
13-1420/1	92	15-1840	86,9	A	A	A	C	A	A	A	A
13-1409/4	93	15-1831	74,4	A	A	A	C	A	A	A	A
13-1412/58	93	15-1833	81,2	A	A	A	C	A	A	A	A
13-1414/40	93	15-1834	75,4	A	A	A	C	H	A	A	A
13-1412/133	95	15-1822	58,3	H	H	C	A	H	H	H	H
13-1419/78	95	15-1823	65,9	H	H	C	A	H	H	H	H
13-1432/30	95	15-1828	64,8	H	H	C	A	H	H	H	H
13-1403/13	96	15-1816	58,4	H	H	C	A	H	H	H	H
13-1403/30	96	15-1818	56,8	H	H	C	A	H	H	H	H
13-1412/117	96	15-1948	57,1	H	H	C	A	H	A	A	A
13-1430/86	97	15-1827	51,0	H	H	C	A	B	H	H	H
13-1403/20	99	15-1817	60,6	H	H	C	A	H	H	H	H
13-1424/39	115	15-1824	50,3	H	H	C	A	B	B	B	B
13-1422/3	149	15-2102	95,1	A	A	C	A	A	A	A	H
13-1417/143	155	15-2101	95,7	A	A	C	A	A	A	A	A

Abbildung 6 Wiederholung der Phänotypisierung der Wuchshöhe bei Nachkommen rekombinanter F_{5:6}-Individuen und Validierung ihrer Einteilung in drei phänotypische Klassen. Die Identifizierung der Rekombinanten erfolgte mit Hilfe der molekularen Marker *c26102*, *tcos4366*, *MACE3*, *c28517*, *c27051* und *c30002* (ihre Verwendung kann in Tabelle 3 nachvollzogen werden). Die Codierung A und C entspricht dem parentalen Genotyp *ddw1ddw1* bzw. *Ddw1Ddw1*.

3.2. Charakterisierung von Chromosomenregionen durch Lokalisation von differentiellen Contigs aus dem NIB-Transkriptom

Zur Erstellung einer hochauflösenden Karte für *Ddw1* wurden weitere Marker benötigt. Für die bereits vorhandenen Marker sind die Abstände zu *Ddw1* und jeweils zueinander bekannt (**Tabelle 3**, Braun et al. 2019). Die Entwicklung vieler dieser mit *Ddw1*-gekoppelten Selektionsmarker (*MACE1*, *MACE2*, *MACE3*, *MACE4*, *dMACE3*, *dMACE3_2*) erfolgte mittels Transkriptom-Sequenzierung. Diese erzeugte eine neue Roggensequenzressource (MACE). Für die cDNA-Sequenzierung wurden nah-isogene, normal- und kurzstrohige F_{5:6}-Linien (NIL) aus der Kreuzung *R1620 x R347/1* verwendet (**Tabelle 4**, **Abbildung A 1**). Die cDNA-Sequenzen wurden *in silico* in 113547 Contigs angeordnet, die zwischen 151-4335 bp lang waren und eine durchschnittliche Länge von 318 bp aufwiesen. Insgesamt wurden 36,13 Mbp exprimierte Gensequenzen erzeugt. Diese Sequenzen wurden gegen genomische Ressourcen von Roggen und verwandten Gräsern abgeglichen.

10730 Contigs konnten beschriebenen Sequenzen von Roggen zugeordnet werden (**Tabelle A 5**). Davon konnten 8878 Contigs eindeutig genomischen Sequenzen und 2242 Contigs ausschließlich cDNA Sequenzen zugeordnet werden. Zwischen allen Roggensequenzen gab es 10091 partielle Überschneidungen, zwischen den cDNA Sequenzen 288 und zwischen den genomischen 956. Weitere 104 Contigs erzielten ausschließlich Treffer mit heterologen Sequenzen (*Aegilops tauschii*: 1 Contig, *Triticum urartu*: 12 Contigs, Weizen A-Genom: 5 Contigs, B-Genom: 16 Contigs, D-Genom: 7 Contigs, Gerste: 39 Contigs).

Von den 8878 genomischen Treffern wurden 8731 Contigs und insgesamt 4107 cDNA Treffer eine definierte Position im Roggengenom zugewiesen. Dies geschah entweder durch Zuordnung über die hochdichte Karte oder durch Sequenzhomologie zu den *Whole Chromosome Amplified (WCA) Shotgun*-Sequenzen. In anschließenden Experimenten wurden 54 Marker auf Chromosom 4R und 13 auf Chromosom 5R kartiert (**Tabelle A 7**, **Tabelle A 13**).

3.2.1. Vergleichende Analyse eines Intervalls auf Chromosom 4R

Da das Material für die Transkriptomanalyse auf zwei Linien beruht, die sich in der Wuchshöhe unterscheiden wurden generell Sequenzunterschiede in den Transkripten erwartet, da es sich um nicht verwandte Linien handelte. In den NIB wurden Korrelationen von Allelen mit den Phänotypen und unterschiedliche Expressionshöhen erwartet. Die Sequenzunterschiede (SNPs) wurden daraufhin analysiert, da diese SNPs direkt (d.h. über das Gen oder gekoppelte Gene) oder indirekt (trans-Effekte) mit *Ddw1* verbunden sein könnten.

Für die $F_{5;6}$ -Kartierungspopulation *R1620 x R347/1* wurden lokalisierte und gleichzeitig polymorphe Sequenzen gesucht. Die meisten polymorphen Transkripte (644 SNPs in 161 Contigs) wurden dem langen Arm von Chromosom 4R zugeordnet (**Abbildung 7**). Der größte Teil der 4R-SNPs (601 in 125 Contigs) konnten in einem 16,97 cM großen Intervall der hochdichten Karte des Roggens lokalisiert werden. Dieser Bereich weist Makro-Syntänie zu den kurzen Armen der drei Weizenchromosomen der homöologen Gruppe 7 auf. Auf 7AS entspricht dieser Bereich 57,09 Mbp, in dem 62 Gene lokalisiert sind, auf 7BS umfasst ein entsprechendes 79,09 Mbp-Segment 60 Gene und auf 7DS entspricht dieser Bereich einem 62,42 Mbp Abschnitt mit 63 Genen (**Abbildung A 4**). Die zweitgrößte Gruppe mit 102 SNPs in 22 Contigs wurde auf dem langen Arm von Chromosom 5R in einem 6,46 cM Bereich identifiziert (**Tabelle A 5**). Zusammengefasst wurden 147 Contigs auf den Chromosomen 4R und 5R in die Auswahl genommen. Zur Überprüfung der SNPs in einem Kartierungsexperiment wurden diese 147 Contigs mit weiteren 156 Roggencontigs, auf denen strikt polymorphe (*high resolution*) SNPs zwischen den NIB nachgewiesen worden waren, selektiert. Von den 156 Roggencontigs konnten 53 dem Chromosom 4R und 6 dem Chromosom 5R durch Sequenzhomologie zu den *Whole Chromosome Amplified (WCA) Shotgun*-Sequenzen zugeordnet werden. 118 STS-Marker wurden auf Basis von 46 Contigs der ersten Gruppe und 136 Contigs der zweiten Gruppe entwickelt. Von den etablierten Markern zeigten 81 (67,8%) einen Polymorphismus zwischen den NIB. Insgesamt folgten 62,5 % einem dominant-rezessiven Erbgang, 25 % wurden nach Restriktionsanalysen detektiert und 13,5 % waren durch eine Insertion oder Deletion gekennzeichnet (**Tabelle A 6, Tabelle A 7**).

Insgesamt war es mittels der Charakterisierung von Chromosomenregionen durch Lokalisation von differentiellen Contigs aus dem NIB-Transkriptom möglich, 73 Marker im Roggen genetisch oder physikalisch zu kartieren (**Tabelle 7**). Analysen in definierten *Ddw1*-Genotypen aus der $F_{4;5}$ -Kartierungspopulation zeigten, dass für mehr als 90 % der Marker keine Kopplung mit *Ddw1* vorliegt. 36 Marker wurden mit Weizen-Roggen-Additionslinien dem langen Arm von Chromosom 4R zugeordnet (**Tabelle 7, Tabelle A 6, Tabelle A 7**). Nach der genetischen Kartierung von 34 Markern in der Population *L2039-N x DH* zeigte sich, dass 31 Marker ein Intervall auf Chromosom 4R mit einer Länge von 45,69 cM bestimmten (**Tabelle A 14**), 28 dieser Marker liegen sogar in einem 9,9 cM-Intervall. Der Vergleich mit *Aegilops tauschii* und Gerste zeigte, dass zwischen diesem 9,9 cM 4R-Intervall und einem 25 cM-Intervall auf Chromosom 7D bzw. einem 43,97 Mbp-Bereich auf dem kurzen Arm des Chromosoms 7H der Gerste (**Tabelle A 7**) eine kollineare Beziehung besteht. In die genetische Kartierung wurden elf Marker einbezogen, die physikalisch oder genetisch auf Chromosom 4RL verortet waren (*MACE116, MACE124, MACE14, MACE153, MACE158, MACE40, MACE59, MACE67, MACE70, MACE75, MACE91*; **Tabelle A 7**). In der *Ddw1* spaltenden $F_{5;6}$ -Familie 11-1582 wurden diese Marker einem Intervall auf Chromosom 4R von 30,8 cM zugeordnet (Daten nicht gezeigt). Für die Marker *MACE116* und *MACE153* keine Kopplung festgestellt werden konnte (**Tabelle A 8**).

Sieben der auf Chromosom 4R kartierten MACE-Contigs wurden in den *Ddw1*-NIB differentiell exprimiert ($p > 0,05$; $\log_2 \text{fold change (log}_2\text{FC)} \times \geq 2$ oder $\times \leq -2$) (**Tabelle 8, Tabelle A 9**). Marker *MACE51*, der einen dieser sieben differentiell exprimierten Contigs repräsentiert, wurde sowohl in der hochdichten Karte als auch in der Population *L2039-N x DH* kartiert. Die sieben Contigs sind annotiert als Chaperon-Protein, UMP/CMP-Kinase, Glykosyltransferase (UGT), drei Transmembran-Proteine und Nitrattransporterprotein (NRT1/PTR-Familie) (**Tabelle 8**). Der putative Nitrattransporter kann als orthologe Sequenz des Gerstengens *HORVU7Hr1G025670* auf 7HS eingestuft werden, das als Mitglied der NRT1/PTR-Familie annotiert ist. Das putative UGT-Gen ist homolog zu *Sc0Loc00271807.1*, das als Roggen-BX8 (ScG), eine UG der Benzoxazinoid-Biosynthese, annotiert ist (Bauer et al. 2017). ScGT wurde auf Chromosom 4R lokalisiert (Sue et al. 2011). Während die putativen UMP/CMP-Kinase, Chaperon und Transmembranproteine-Gene in der Mutante überexprimiert werden, sind die anderen vier Gene in der Mutante unterexprimiert (**Tabelle 8, Tabelle A 9**).

3.2.2. Vergleichende Analyse im Bereich des *Ddw1*-Gens auf Chromosom 5R

Der Transkriptomdatensatz wurde mit der hochdichten Karte der Genomsequenz für den Roggen und der Roggen *WCA shotgun*-Sequenzen abgeglichen, um für die Markerentwicklung möglichst eindeutig auf Chromosom 5R lokalisierte Contigs zu identifizieren. Von den 8150 (7,2 %) wiesen 5445 Sequenzen signifikante Homologie mit den beiden cDNA-Kollektionen des Roggens auf. Ein Vergleich der in der Gerste *in silico* kartierten 24815 Contigs (Braun et al. 2019) zeigte, dass die Kollinearität zwischen dem distalen Ende des langen Arms von Chromosom 5R und einem Segment des langen Arms von Chromosom 4H durch ein kleines Segment unterbrochen ist, das homöolog zu Chromosom 7H ist (Braun et al. 2019). Im MACE-Datensatz sind zwei Contigs präsent, die homolog zu *Lo7_v2_contig_2880798* und *Lo7_v2_contig_233128* sind. Diese beiden Contigs sind in der hochdichten Karte *Lo7 x Lo225* in der *Ddw1*-Region auf 5RL verortet. In Gerste wurden den Contigs die Genmodelle *HORVU7Hr1G031190* und *HORVU7Hr1G089960* zugeordnet, die auf Chromosom 7H lokalisiert sind (**Tabelle A 5**). Damit besteht zwischen Gerste und Roggen ein Rearrangement, das die Nutzung des Gersten-Referenzgenoms für die Entwicklung eng gekoppelter *Ddw1*-Marker limitiert. MACE-Contigs, die in der hochdichten Karte des Roggens dem Chromosom 5RL oder in Gerste den Chromosomen 4H oder 7H zugeordnet wurden, wurden ausgewählt, um die syntänen Segmente zwischen Roggen und Gerste darzustellen. Auf diese Weise wurde der Datensatz der ausgewählten 8150 5R-Contigs auf 3652 5R-Contigs reduziert.

Tabelle 7 Zusammenfassung der aus der Transkriptomsequenzierung der *Ddw1* nah-isogenen Bulks (NIB) (*R1620 x R347/1*) entwickelten und in Weizen-Roggen-Additionslinien (W-R-ADL) und in der Population *L2039-N x DH*^a kartierten Marker.

Marker	Contig ^b	Chromosom		
		<i>R1620 x R347/1</i>	<i>L2039-N x DH</i> ^a	W-R-ADL
<i>MACE03</i>	comp11656_c0_seq1		4R	
<i>MACE05</i>	comp12430_c0_seq1			4R;4RL
<i>MACE06</i>	comp128201_c0_seq1			4R;4RL
<i>MACE07</i>	comp13255_c0_seq1		4R	
<i>MACE09</i>	comp13679_c0_seq1		4R	
<i>MACE102</i>	comp34554_c0_seq2			4R;4RL
<i>MACE106</i>	comp30935_c0_seq1		4R	
<i>MACE107</i>	comp24551_c0_seq1		4R	
<i>MACE108</i>	comp34783_c0_seq9		4R	
<i>MACE11</i>	comp14694_c0_seq1			4R;4RL
<i>MACE111</i>	comp34930_c0_seq1		4R	
<i>MACE114</i>	comp35126_c1_seq1		4R	4R;4RL
<i>MACE116</i>	comp24880_c0_seq1		4R	4R;4RL
<i>MACE12</i>	comp154661_c0_seq1			4R;4RL
<i>MACE120</i>	comp35442_c0_seq1			4R;4RL
<i>MACE124</i>	comp31427_c0_seq1		4R	4R;4RL
<i>MACE127</i>	comp18119_c0_seq1			4R;4RL
<i>MACE13</i>	comp1551_c0_seq1			4R;4RL
<i>MACE137</i>	comp26532_c0_seq1		4R	4R;4RL
<i>MACE138</i>	comp35963_c0_seq1		4R	
<i>MACE139</i>	comp20024_c0_seq1			4R;4RL
<i>MACE14</i>	comp159280_c0_seq1		4R	4R;4RL
<i>MACE143</i>	comp21038_c0_seq1		4R	
<i>MACE144</i>	comp32183_c0_seq1			4R;4RL
<i>MACE148</i>	comp3229_c0_seq1		4R	
<i>MACE151</i>	comp219105_c0_seq1		4R	
<i>MACE153</i>	comp28676_c0_seq1		4R	4R;4RL
<i>MACE158</i>	comp36388_c0_seq1		4R	4R;4RL
<i>MACE176</i>	noHitAssembly_c12049_g1_i1			4R;4RL

Tabelle 7 Fortsetzung

Marker	Contig ^b	Chromosom		
		R1620 x R347/1	L2039-N x DH ^a	W-R-ADL
MACE177	noHitAssembly_c13723_g1_i1			4R;4RL
MACE18	comp18079_c0_seq1			1R;4R;4RL
MACE19	comp36398_c0_seq1			4R;4RL
MACE23	comp36502_c0_seq1		4R	4R;4RL
MACE26	comp36646_c0_seq2			4R;4RL
MACE34	comp9422_c0_seq1			4R;4RL
MACE35	comp36762_c0_seq3		4R	4R;4RL
MACE38	comp36953_c0_seq4		4R	
MACE40	comp37163_c0_seq1		4R	4R;4RL
MACE41	comp37400_c0_seq3			4R;4RL
MACE42	comp37544_c0_seq4			4R;4RL
MACE49	comp37923_c0_seq7		4R	
MACE51	comp47958_c0_seq1		4R	
MACE53	comp62520_c0_seq1			4R;4RL
MACE54	comp75248_c0_seq1		4R	
MACE55	comp76341_c0_seq1		4R	
MACE56	comp93476_c0_seq1			4R;4RL
MACE59	noHitAssembly_c8895_g1_i1		4R	4R;4RL
MACE64	noHitAssembly_c11228_g1_i1			4R;4RL
MACE66	noHitAssembly_c12819_g1_i1		4R	
MACE67	noHitAssembly_c13567_g1_i1		4R	
MACE70	noHitAssembly_c13954_g1_i2		4R	
MACE75	comp33147_c0_seq1		4R	4R;4RL
MACE91	comp29998_c0_seq2		4R	
MACE97	comp30257_c0_seq1			4R;4RL
MACE99	comp34554_c0_seq1			4R;4RL
MACEtp11-4R	comp37544_c0_seq7			4R;4RL
MACEtp9	comp36502_c0_seq1			4R;4RL
MACE1	comp29006_c0_seq1	5R		
MACE2	comp36011_c0_seq2	5R		
MACE3	noHitAssembly_c10497_g1_i1	5R		

Fortsetzung Tabelle 7

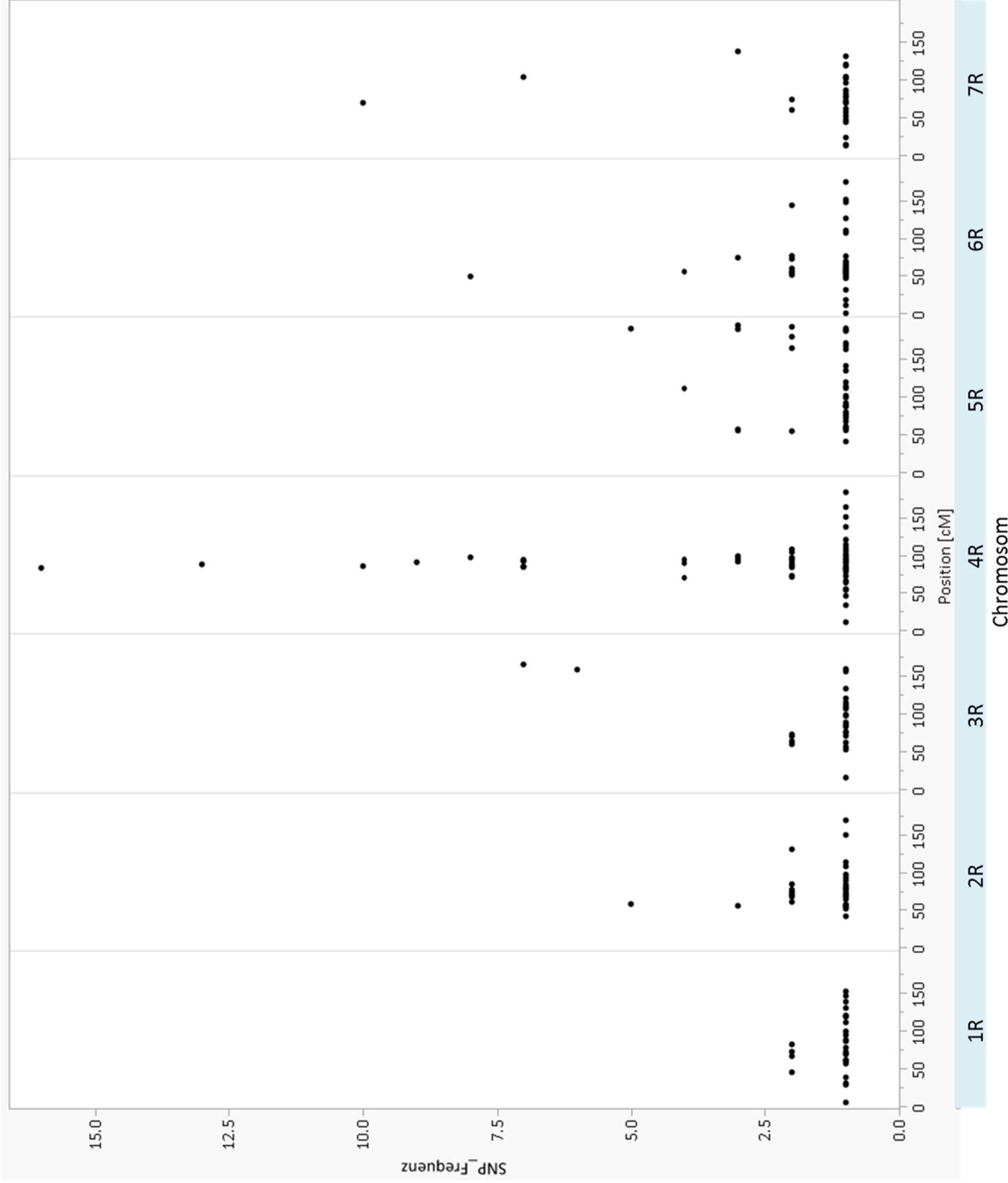
Marker	Contig ^b	Chromosom		
		<i>R1620 x R347/1</i>	<i>L2039-N x DH^a</i>	<i>W-R-ADL</i>
<i>MACE4</i>	noHitAssembly_c10497_g1_i2	5R		
<i>MACE08</i>	comp13332_c0_seq1	5R	5R	
<i>MACE113</i>	comp24863_c0_seq2	5R		5R;5RL
<i>MACE118</i>	comp31371_c0_seq1	5R		
<i>MACE27</i>	comp36659_c0_seq1	5R		5R;5RL
<i>MACEtp04</i>	comp31371_c0_seq2	5R		
<i>MACEtp15</i>	noHitAssembly_c10806_g1_i1	5R		
<i>MACEtp01A-5R</i>	comp30448_c0_seq1			5R;5RL
<i>MACEtp01B-5R</i>	comp30448_c0_seq1			5R;5RL
<i>MACEtp05-5R</i>	comp18600_c0_seq1			5R;5RL
<i>MACE61</i>	noHitAssembly_c9759_g1_i1			5R;5RL
<i>MACE71</i>	noHitAssembly_c22878_g1_i1			5R;5RL
<i>MACE96</i>	comp3436_c0_seq1			5R;5RL
<i>MACE110</i>	comp24863_c0_seq1			5R;5RL
<i>MACE159</i>	comp12596_c0_seq1			5R;5RL
<i>MACE28</i>	comp4677_c0_seq1		6R	
<i>MACE98</i>	comp24327_c0_seq1			7R;7RL

^a Martis et al. (2013) ; ^b Braun et al. (2019)

Abbildung 7

Häufigkeitsverteilung der Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP) abgebildet entlang der hochdichten Karte *Lo7 x Lo225*^a des Roggens. Die SNPs wurden durch Transkriptom-sequenzierung der kurzstrohigen *Ddw1* Mutante und des normalstrohigen *Ddw1* Wildtyps generiert.

^a Bauer et al. 2017



3.3. Transkriptprofil in kurz- und langstrohigem Roggen

Um das Roggen-Transkriptom umfassend abzubilden, wurde für jede der beiden NIB die gesamte RNA aus sechs Roggenpflanzenteilen isoliert, die zu fünf Entwicklungszeitpunkten beprobt wurden. Die Hauptkomponentenanalyse zeigt, dass die Transkriptomdaten der ausgewählten Pflanzenorgane eine spezifische Gruppierung der Sequenzen ergab (**Abbildung 8**). Diese entsprechen der Herkunft der Gewebeprobe. Koeoptile, Blätter und Halme grenzen sich gegenüber den Wurzeln und Ähren ab, wobei Halme als Untergruppe erkennbar sind. Die Unterschiede zwischen individuellen Organen waren wesentlich größer als zwischen normal- und kurzstrohigem Genotyp. Am größten war die Variation zwischen den Genotypen bei den Koeoptilen, den Ähren und den Halmen zu Beginn der Blüte. Bei den restlichen Gewebetypen war sie vergleichsweise gering.

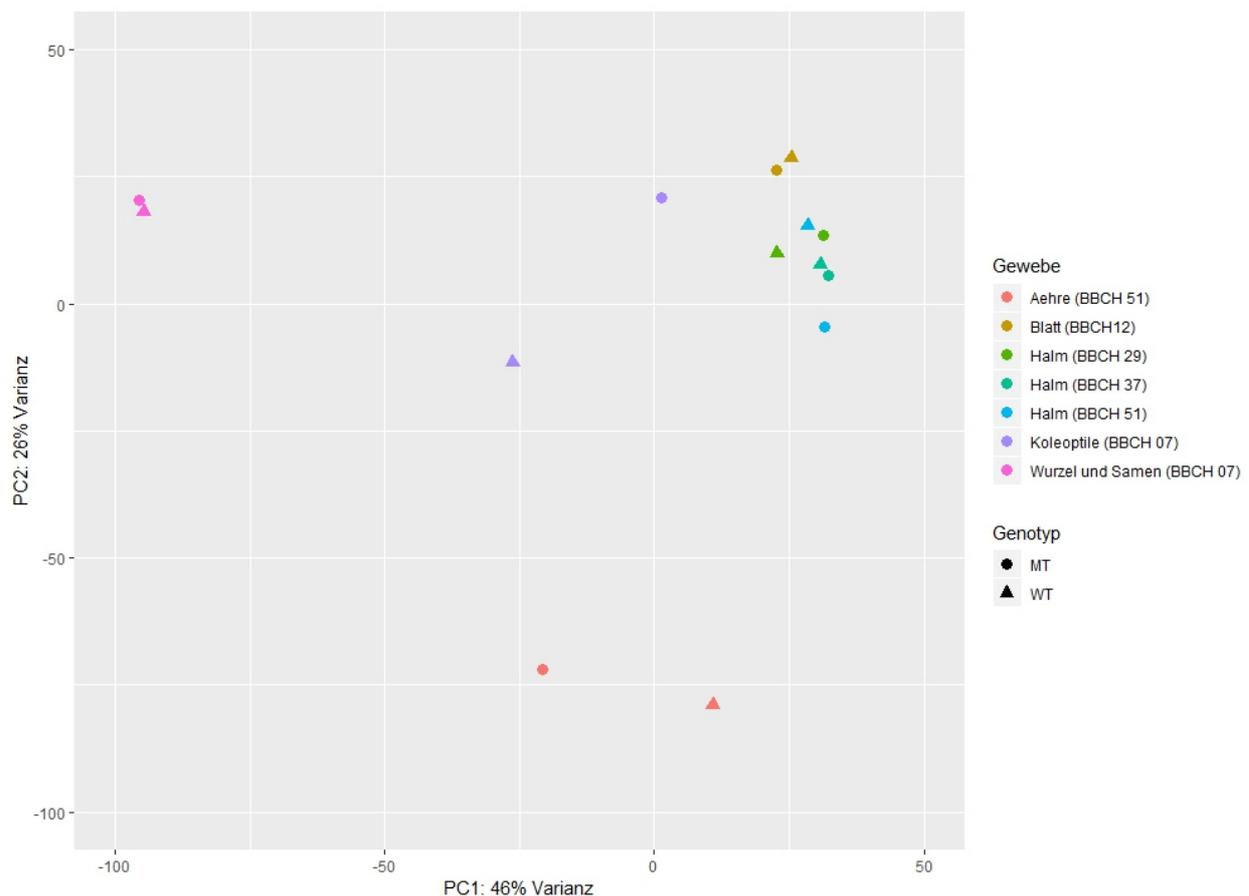


Abbildung 8 Hauptkomponentenanalyse der Expressionsdaten der normal- und kurzstrohigen nah-isogenen Bulks (NIB) in verschiedenen Organen des Roggens (modifiziert nach Braun et al. 2019). Abkürzungen: WT: Wildtyp-NIB, MT: Mutanten-NIB.

Die differentielle Expressionsanalyse stützte sich auf die drei Halmproben (Stadien: BBCH 29, BBCH 37, BBCH51) als biologische Replikate (**Abbildung 9**). Es wurden 186 Contigs zwischen normal- und kurzstrohigen Pflanzen als signifikant ($p < 0,05$) hoch- oder herunterreguliert identifiziert (Bonferroni korrigiert). Bei 171 der differentiiell exprimierten Gene (DEG) unterscheidet sich die Höhe der Genexpression im Halm beider Genotypen um den Faktor 2 (**Tabelle A 8**). Dabei waren in der *Ddw1*-Mutante 88 (51,5 %) Gene über- und 83 (48,5 %) unterexprimiert. Von 171 DEG wurden 154 (87,0 %) einem Chromosom des Roggens zugeordnet, wovon 18 (10,5 %) auf Chromosom 5R lokalisiert waren (**Tabelle A 8**). Ferner wiesen 48 (28,6 %) der DEG SNPs zwischen den *Ddw1*-Genotypen auf, worunter sich acht 5R-DEG befanden.

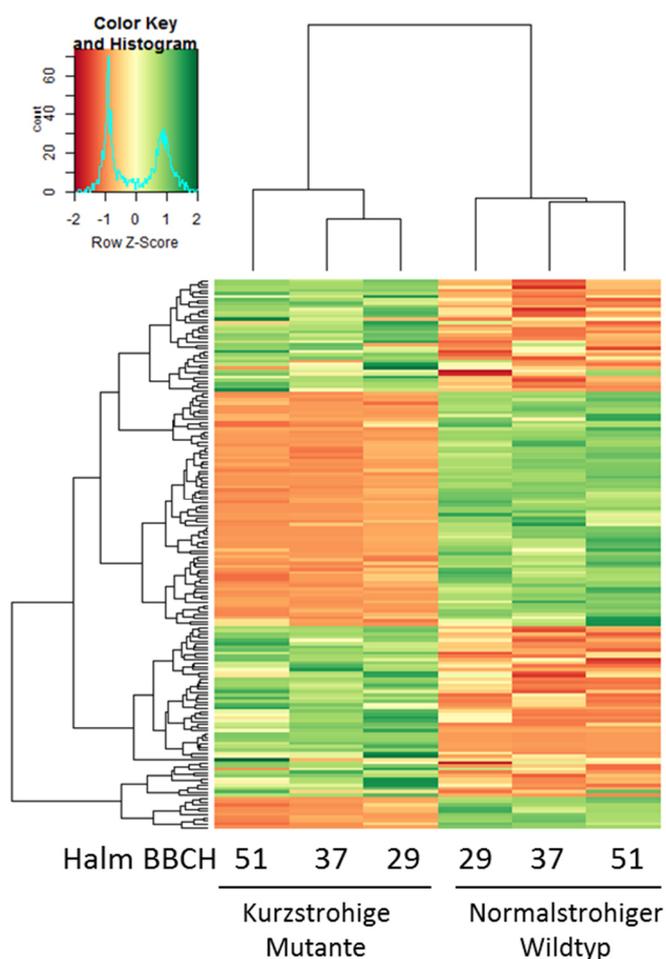


Abbildung 9 Heatmap von 171 differentiiell in normal- und kurzstrohigen nah-isogenen Bulks (NIB) exprimierten Genen nach z-Transformation der relativen Veränderung der Genexpression und hierarchischer Clusteranalyse (modifiziert aus Braun et al. 2019). Jede Reihe steht für ein individuelles Contig und jede Spalte für das jeweilige Organ und den *Ddw1* Genotyp. Die Höhe der Genexpression wird über eine Farbskala (*color key and histogram*) von rot (niedrige Expression) nach grün (hohe Expression) angezeigt.

Nach Identifizierung der DEG erfolgte in den differentiell exprimierten Roggentranskripten eine Analyse signifikanter Genontologien (GO). Diese identifizierte 35 bzw. 20 nicht redundante GO ($p_{\text{adj}} < 0,05$), die mit biologischen Prozessen bzw. molekularen Funktionen in Verbindung stehen (**Abbildungen 10 und 11**). In der Kategorie der zellulären Komponente konnten 18 signifikante, nicht redundante ($p_{\text{adj}} < 0,05$) GO-Termini identifiziert werden.

Viele signifikante GO (gemessen am absoluten $\log_{10} p_{\text{adj}}$ -Wert) waren bei einer Reihe von reaktiven Prozessen, wie der Reaktion auf einen endogenen Reiz (GO:0009719), der Regulierung, beispielsweise der biologischen Qualität (GO:0065008), im Makromolekülmetabolismus (GO:0043170) und bei zellulärem Katabolismus (GO:0044248) zu finden. Weiterhin waren GO wie die Regulierung des Hormonspiegels (GO:0010817) und die Reaktion auf ein Hormon (GO:0009725) signifikant vorhanden. GO aus dem Bereich „Wachstum und Entwicklung“ stellten einen größeren Anteil unter den als signifikant identifizierten GO. Hierzu zählten die Organisation oder Biogenese der Zellwand (GO:0071554) beziehungsweise die Organisation oder Biogenese von zellulären Komponenten (GO:0071840, GO:0044085), Entwicklungsprozess (GO:0032502) und Wachstum (GO:0040007), sowie Reproduktion und Reproduktive Prozesse (GO:0000003, GO:0022414). Neben des bereits erwähnten Makromolekülstoffwechsels, wozu auch der Stoffwechsel der Kohlenhydrate (GO:0005975) und Kohlenstoffderivaten (GO:1901135) gehören, waren die Lokalisierung (GO:0051179, GO:0051641) und der Transport organischer Substanz (GO:0071702) signifikant vertreten. Signalwirkung (GO:0023052) und Zellkommunikation befanden sich auch unter den signifikant ($p_{\text{adj}} < 0,05$) vertretenen Prozessen innerhalb der DEG.

Das Kacheldiagramm in **Abbildung 11** zeigt die GO der molekularen Funktionen ($p_{\text{adj}} < 0,05$). Viele der GO-Termini gehörten zur Gruppe der Bindung. Das Cluster enthielt die GOs GO:0005515 (Proteinbindung), GO:0097159 (Organische zyklische Verbindung), GO:0003676 (Nukleinsäurebindung), GO:0036094 (Kleinmolekülbindung), GO:0043167 (Ionenbindung), GO:1901363 (heterozyklische Verbindung), GO:1901265 (Nukleosid-Phosphat-Bindung). Das zweitgrößte Cluster umfasst die Transferase-Aktivität von Glycosyl-Gruppen. Es wurde gebildet aus GO:0016773 (Phosphotransferase-Aktivität), GO:0016758 (Transferase-Aktivität, Übertragung von Hexosyl-Gruppen), GO:0016757 (Transferase-Aktivität, Übertragung von Glycosyl-Gruppen). Das drittgrößte Cluster beschreibt die Kalziumionenbindung (GO:0005509), GO:0005524 (ATP-Bindung) und GO:0043169 (Kationenbindung). Die restlichen Bereiche des Kacheldiagramms beinhalten GO:0015075 (Ionentransmembran Transporter-Aktivität), GO:0016788 (Hydrolase-Aktivität mit Wirkung auf Esterbindungen), GO:0016787 (Hydrolase-Aktivität), GO:0004872 (Rezeptor-Aktivität), GO:0005215 (Transporter-Aktivität), GO:0016874 (Ligase-Aktivität), GO:0016740 (Transferase-Aktivität), GO:0043565 (Sequenz-spezifische DNA-Bindung). Geringere Anteile lagen bei den GO

GO:0003674 (Molekulare Funktion), GO:0003824 (Katalytische Aktivität) und GO:0005488 (Bindung) vor (**Abbildung 11**).

Unter den Chromosom 5R-DEG detektierte die Homologie-basierte Genannotation ein Homöobox-Leucin-Zipperprotein (HD-ZIP) (*comp31371_c0_seq2*, überexprimiert in der Mutante), eine DEAD-Box ATPase-abhängige RNA-Helicase (*comp7751_c0_seq1*, unterexprimiert in der Mutante), eine Phospholipase (*comp68387_c0_seq1*, unterexprimiert in der Mutante), eine Glykosyltransferase (UDP) (*comp52087_c0_seq1*, unterexprimiert in der Mutante), sowie ein DEG (*comp222186*, überexprimiert in der Mutante), das homolog zu einem Genmodell des Roggengenoms mit der Annotation GA2-Oxidase ist (**Tabelle 8, Tabelle A 9**). Das DEG *comp31371*, das als HD-ZIP-Protein (HOX9, Unterfamilie III) annotiert ist, wurde mit Wachstums- und Entwicklungsassozierten GO konnotiert, wie beispielsweise anatomische Strukturmorphogenese (GO:0009653), Entwicklungsprozess (GO:0032502), Wachstum (GO:0040007), Reproduktion (GO:0000003, GO:0022414) und Signalübertragung (GO:0023052, GO:0050896) (**Tabelle 8**). Das Transkript *comp31371_c0_seq2* und seine homologe Sequenz *comp31371_co_seq1* wurden zur Entwicklung der 5RL-Marker *MACEtp04* bzw. *MACE118* verwendet (**Abbildung 15, Tabelle A 13**). Zudem wurde mit DEG *comp7751_c0_seq1* eine DEAD-Box ATPase-abhängige RNA-Helicase identifiziert. Diese Enzyme sind essenziell im DNA- und RNA-Metabolismus: Sie sind für Replikation, Reparatur, Rekombination, Transkription, Translation, Ribosomengenesse und Splicing zuständig, und stehen in Verbindung mit Entwicklungsprozessen (GO:0032502) (**Tabelle 8**). Die Phospholipase, repräsentiert durch das Transkript *comp68387*, war mit den Genontologien anatomische Strukturmorphogenese (GO:0009653), Reaktion auf einen endogenen Reiz (GO:0009719), Reaktion auf ein Hormon (GO:0009725), Entwicklungsprozess (GO:0032502), Wachstum (GO:0040007), Signalübertragung (GO:0023052), Hydrolaseaktivität (GO:0016788, GO:0016787) und Fettstoffwechsel (GO:0006629) konnotiert (**Tabelle 8**). Das als Glykosyltransferase (UDP) präsent beschriebene DEG *comp52087_c0_seq1* wurde bei der Identifizierung signifikanter GO mit Transferase-Aktivität (GO:0016758, GO:0016757, GO:0016740) konnotiert (**Tabelle 8**). Für das als GA2-Oxidase annotierte DEG *comp222186* wurden keine signifikanten GO angereichert.

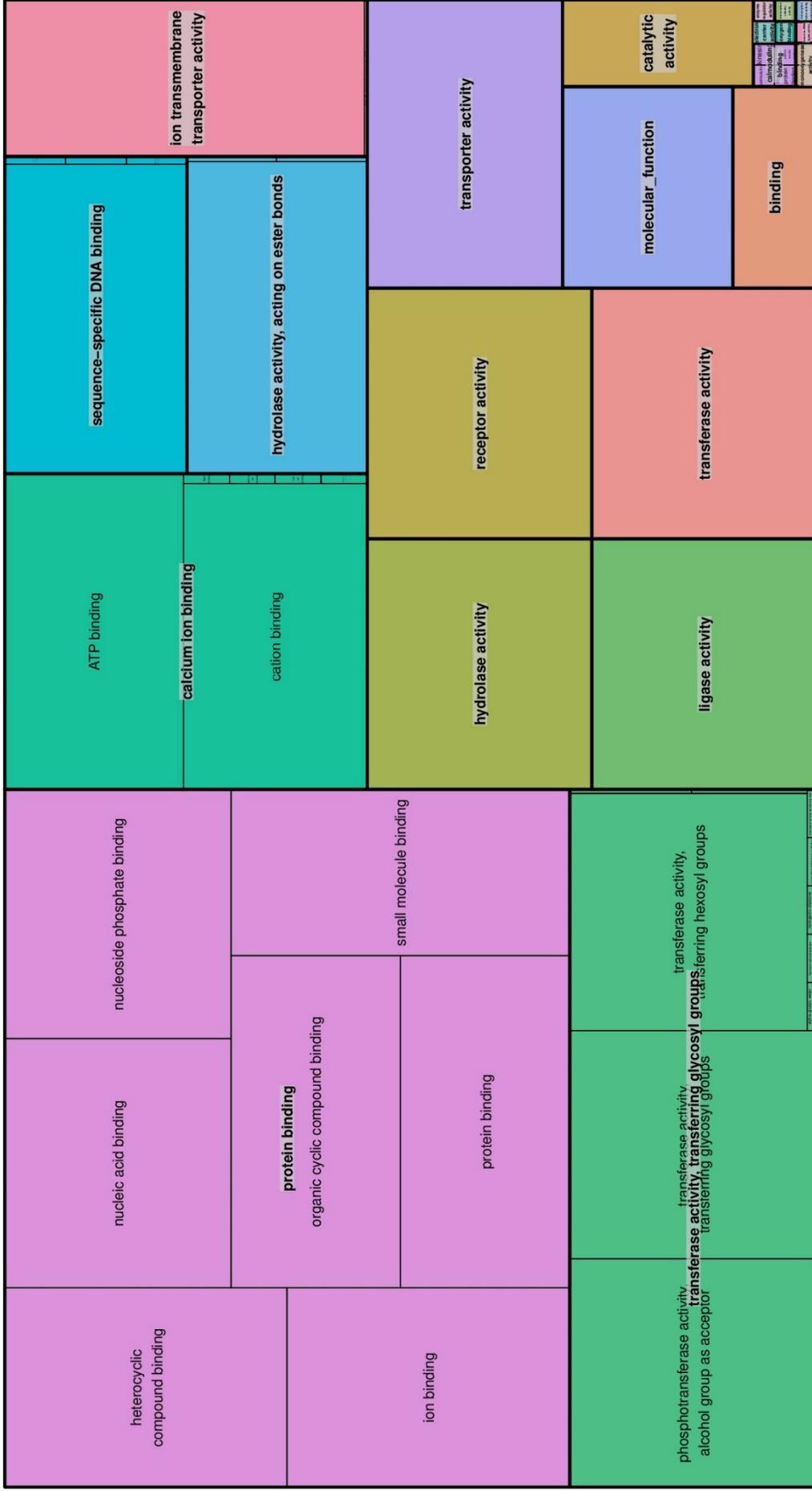


Abbildung 11 Kacheldiagramm der signifikant ($p < 0,05$) überrepräsentierten Genontologien der Kategorie Molekulare Funktion innerhalb der differentiell exprimierten Roggentranskripte. Die jeweilige Größe ist proportional zum absoluten $\log_{10} p_{adj}$ -Wert der jeweiligen GO-Termini. Semantisch ähnliche GO-Begriffe befinden sich nebeneinander. Die hell unterlegten Begriffe beschreiben die übergeordneten Cluster.

Tabelle 8 Liste der selektierten GO-Termini der Transkripte, die auf 5R lokalisiert und differentiell zwischen dem normal- und kurzstrohigen *Ddw1*-Genotyp exprimiert sind. Die GO gehören zu den Kategorien Molekulare Funktion (MF) und Biologischer Prozess (BP).

Transkript	ähnlich zu	Lo7-Contig	Chr. (a)	Chr. (b)	GO-ID	Ontologie	GO-Beschreibung	log ₁₀ p adj	p adj
comp52087_c0_seq1	glucosyltransferase 1	Lo7_v2_contig_1361654	1R, 5R		GO:0009725	BP	Reaktion auf ein Hormon	-300	0
					GO:0006629	BP	Fettstoffwechselprozess	-300	0
					GO:0051707	BP	Reaktion auf andere Organismen	-300	0
					GO:0065008	BP	Regulierung der biologischen Qualität	-300	0
					GO:0009416	BP	Reaktion auf Lichtreiz	-300	0
					GO:0044248	BP	Zellulärer kataboler Prozess	-300	0
					GO:0010817	BP	Regulierung des Hormonspiegels	-300	0
					GO:0009719	BP	Reaktion auf endogene Reize	-300	0
					GO:0009607	BP	Reaktion auf biotischen Reiz	-300	0
					GO:0019748	BP	Sekundärer Stoffwechselprozess	-300	0
					GO:1901360	BP	Stoffwechselprozess einer organischen zyklischen Verbindung	-300	0
					GO:0051704	BP	Multi-Organismus Prozess	-300	0
					GO:0050896	BP	Reaktion auf Reize	-300	0
					GO:0065007	BP	Biologische Regulierung	-300	0
					GO:0009987	BP	Zellulärer Prozess	-129.5016	3.15E-126
					GO:0044237	BP	Zellulärer Stoffwechselprozess	-98.2638	5.45E-95
					GO:0016758	MF	Transferaseaktivität, Übertragung von Hexosyl-Gruppen	-300	0
GO:0016757	MF	Transferaseaktivität, Übertragung von Glycosyl-Gruppen	-300	0					
GO:0005515	MF	Proteinbindung	-300	0					
GO:0016740	MF	Transferaseaktivität	-300	0					
GO:0003674	MF	Molekulare Funktion	-182.4448	3.59E-179					
GO:0005488	MF	Bindung	-90.0732	8.45E-86					
GO:0003824	MF	Katalytische Aktivität	-87.9553	1.11E-83					

Fortsetzung Tabelle 8

Transkript	ähnlich zu	Lo-Contig	Chr. (a)	Chr. (b)	GO-ID	Ontologie	GO-Beschreibung	log ₁₀ p adj	p adj
comp7751_c0_seq1	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 50 [Hordeum vulgare]	Lo7_v2_contig_95436	3R, 5R		GO:0008610	BP	Lipid-biosynthetischer Prozess	-300	0
					GO:0009653	BP	Anatomische Strukturmorphogenese	-300	0
					GO:0042180	BP	Zellulärer Ketonstoffwechselprozess	-300	0
					GO:0044281	BP	Kleinstmolekularer Stoffwechselprozess	-300	0
					GO:0006629	BP	Fettstoffwechselprozess	-300	0
					GO:0044249	BP	Zellulärer biosynthetischer Prozess	-300	0
					GO:0034660	BP	ncRNA-Stoffwechselprozess	-300	0
					GO:0044260	BP	Zellulärer Makromolekül-Stoffwechselprozess	-300	0
					GO:0034641	BP	Stoffwechselprozess zellulärer Stickstoffverbindungen	-300	0
					GO:0006725	BP	Metabolischer Prozess einer zellulären aromatischen Verbindung	-300	0
					GO:0046483	BP	Heterozyklischer Stoffwechselprozess	-300	0
					GO:0044085	BP	Zelluläre Komponentenbiogenese	-300	0
					GO:0006793	BP	Phosphor-Stoffwechselprozess	-300	0
					GO:0022414	BP	Reproduktiver Prozess	-300	0
					GO:0043170	BP	Makromolekül-Stoffwechselprozess	-300	0
					GO:1901360	BP	Metabolischer Prozess einer organischen zyklischen Verbindung	-300	0
					GO:1901135	BP	Kohlenhydratderivat Stoffwechselprozess	-300	0
					GO:0032501	BP	Multizellulärer organischer Prozess	-300	0
					GO:0032502	BP	Entwicklungsprozess	-300	0
					GO:0071840	BP	Organisation oder Biogenese zellulärer Komponente	-300	0
					GO:0044699	BP	Einzelorganismus-Prozess	-300	0
					GO:0000003	BP	Reproduktion	-300	0
					GO:0009987	BP	Zellulärer Prozess	-129.5016	3.15E-126
					GO:0044237	BP	Zellulärer Stoffwechselprozess	-98.2638	5.45E-95
					GO:0005524	MF	ATP Bindung	-300	0
					GO:0003676	MF	Nukleinsäurebindung	-300	0
					GO:1901265	MF	Nukleosid-Phosphatbindung	-300	0

Fortsetzung Tabelle 8

Transkript	ähnlich zu	Lo7-Contig	Chr. (a)	Chr. (b)	GO-ID	Ontologie	GO-Beschreibung	log ₁₀ p adj	p adj
comp7751_c0_seq1	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 50 [Hordeum vulgare]	Lo7_v2_contig_95436	3R, 5R		GO:1901363	MF	Heterozyklische Verbindung	-300	0
					GO-ID	Ontologie	GO-Beschreibung	log ₁₀ p adj	p adj
comp31371_c0_seq2	homöobox-leucine zipper protein HOX9 [Brachypodium distachyon]				GO:0036094	MF	Kleinstmolekülbindung	-300	0
					GO:0016787	MF	Hydrolaseaktivität	-300	0
					GO:0003674	MF	Molekulare Funktion	-182.4448	3.59E-179
					GO:0005488	MF	Bindung	-90.0732	8.45E-86
					GO:0003824	MF	Katalytische Aktivität	-87.9553	1.11E-83
					GO:0051239	BP	Regulierung eines multizellulären organischen Prozesses	-300	0
					GO:0009653	BP	Anatomische Strukturmorphogenese	-300	0
					GO:0048522	BP	Positive Regulierung eines zellulären Prozesses	-300	0
					GO:0007049	BP	Zellzyklus	-300	0
					GO:0044249	BP	Zellulärer biosynthetischer Prozess	-300	0
					GO:0006259	BP	DNA-Stoffwechselprozess	-300	0
					GO:0065008	BP	Regulierung biologischer Qualität	-300	0
					GO:0048519	BP	Negative Regulierung eines biologischen Prozesses	-300	0
					GO:0048518	BP	Positive Regulierung eines biologischen Prozesses	-300	0
					GO:0044260	BP	Zellulärer Makromolekül-Stoffwechselprozess	-300	0
					GO:0009416	BP	Reaktion auf Lichtreiz	-300	0
					GO:0034641	BP	Stoffwechselprozess zellulärer Stickstoffverbindungen	-300	0
					GO:0006725	BP	Metabolischer Prozess einer zellulären aromatischen Verbindung	-300	0
GO:0046483	BP	Heterozyklischer Stoffwechselprozess	-300	0					
GO:0044085	BP	Zelluläre Komponentenbiogenese	-300	0					
GO:0022414	BP	Reproduktiver Prozess	-300	0					
GO:0043412	BP	Makromolekülmodifikation	-300	0					
GO:0043170	BP	Makromolekül-Stoffwechselprozess	-300	0					
GO:1901360	BP	Stoffwechselprozess einer organischen zyklischen Verbindung	-300	0					
GO:0071554	BP	Organisation oder Biogenese der Zellwand	-300	0					

Fortsetzung Tabelle 8

Transkript	ähnlich zu	Lo7-Contig	Chr. (a)	Chr. (b)	GO-ID	Ontologie	GO-Beschreibung	log ₁₀ p adj	p adj
comp1371_c0_seq2	homöbox-leucine zipper protein HOX9 [Brachypodium distachyon]		5R		GO:0040007	BP	Wachstum	-300	0
					GO:0032501	BP	Multizellulärer organischer Prozess	-300	0
					GO:0032502	BP	Entwicklungsprozess	-300	0
					GO:0023052	BP	Signal	-300	0
					GO:0071840	BP	Organisation oder Biogenese zellulärer Komponente	-300	0
					GO:0050896	BP	Antwort auf Reize	-300	0
					GO:0051179	BP	Lokalisierung	-300	0
					GO:0065007	BP	Biologische Regulierung	-300	0
					GO:0044699	BP	Einzelorganismus-Prozess	-300	0
					GO:0000003	BP	Reproduktion	-300	0
					GO:0009987	BP	Zellulärer Prozess	-129.5016	3.1506E-130
					GO:0044237	BP	Zellulärer Stoffwechselprozess	-98.2638	5.4478E-99
					GO:0003676	MIF	Nukleotidsäurebindung	-300	0
					GO:1901363	MIF	Heterozyklische Verbindung	-300	0
					GO:0005515	MIF	Proteinbindung	-300	0
					GO:0003674	MIF	Molekulare Funktion	-182.4448	3.5911E-183
					GO:0005488	MIF	Bindung	-90.0732	8.44984E-91
					GO:0043565	MIF	Sequenz-spezifische DNA Bindung	-2.4412	0.003620595
					GO:0009653	BP	Anatomische Strukturmorphogenese	-300	0
					GO:0042180	BP	Zellulärer Ketonstoffwechselprozess	-300	0
					GO:0048522	BP	Positive Regulierung eines zellulären Prozesses	-300	0
					GO:0009725	BP	Reaktion auf ein Hormon	-300	0
				5R	GO:0044281	BP	Kleinmolekularer Stoffwechselprozess	-300	0
					GO:0006629	BP	Fettstoffwechselprozess	-300	0
					GO:0048518	BP	Positive Regulierung eines biologischen Prozess	-300	0
					GO:0044248	BP	Zellulärer kataboler Prozess	-300	0
					GO:0034641	BP	Stoffwechselprozess zellulärer Stickstoffverbindungen	-300	0
comp68387_c0_seq1	phospholipase D alpha 2-like [Brachypodium distachyon]	Lo7_v2_contig_233128			GO:0009653	BP	Anatomische Strukturmorphogenese	-300	0
					GO:0042180	BP	Zellulärer Ketonstoffwechselprozess	-300	0
					GO:0048522	BP	Positive Regulierung eines zellulären Prozesses	-300	0
					GO:0009725	BP	Reaktion auf ein Hormon	-300	0
				5R	GO:0044281	BP	Kleinmolekularer Stoffwechselprozess	-300	0
					GO:0006629	BP	Fettstoffwechselprozess	-300	0
					GO:0048518	BP	Positive Regulierung eines biologischen Prozess	-300	0
					GO:0044248	BP	Zellulärer kataboler Prozess	-300	0
					GO:0034641	BP	Stoffwechselprozess zellulärer Stickstoffverbindungen	-300	0

Fortsetzung Tabelle 8

Transkript	ähnlich zu	Lo7-Contig	Chr. (a)	Chr. (b)	GO-ID	Ontologie	GO-Beschreibung	log ₁₀ p adj	p adj
comp68387_c0_seq1	phospholipase D alpha 2-like [Brachypodium distachyon]	Lo7_v2_contig_233128		5R	GO:0009719	BP	Reaktion auf endogene Reize	-300	0
					GO:0005975	BP	Kohlenhydrat Stoffwechselprozess	-300	0
					GO:0040007	BP	Wachstum	-300	0
					GO:0032501	BP	Multizellulärer organischer Prozess	-300	0
					GO:0032502	BP	Entwicklungsprozess	-300	0
					GO:0023052	BP	Signal	-300	0
					GO:0071840	BP	Organisation oder Biogenese zellulärer Komponente	-300	0
					GO:0050896	BP	Antwort auf Reize	-300	0
					GO:0051179	BP	Lokalisierung	-300	0
					GO:0065007	BP	Biologische Regulierung	-300	0
					GO:0044699	BP	Einzelorganismus-Prozess	-300	0
					GO:0009987	BP	Zellulärer Prozess	-129.5016	3.1506E-130
					GO:0044237	BP	Zellulärer Stoffwechselprozess	-98.2638	5.4478E-99

^a Martis et al. (2013), ^b Bauer et al. (2017)

3.4. Kandidatengenansatz für Gibberellin-Gene im Roggen

3.4.1. Erstellung einer Übersicht und Kartierung von Gibberellin-Genen im Roggen

Aufgrund des Zusammenhangs zwischen Zwergwuchs bei Pflanzen und der Beteiligung von Gibberellinen (GA) kann spekuliert werden, dass Gene des GA-Metabolismus direkt oder indirekt mit *Ddw1* in Zusammenhang stehen. Deshalb wurden im Rahmen dieser Studie mögliche Roggen-Orthologe bekannter „GA“-Gene zusammengefasst und untersucht. Zur Ermittlung der Orthologen dienten Sequenzinformationen bekannter Gene des GA-Biosynthesewegs und der GA-Signaltransduktion (Hirano et al. 2008; Hedden und Sponsel 2015; Pearce et al. 2015; Clavijo et al. 2017) als Referenz. Die Nomenklatur wurde auf Roggen übertragen (**Tabelle A 10**). Insgesamt konnten mit Hilfe der Roggengenomreferenzsequenz (Bauer et al. 2017) 78 homologe Gene identifiziert werden (**Tabelle A 10**, Schwefel 2015; Braun et al. 2019), wovon 59 (75,6 %) auch in den genomischen WCA *shotgun*-Sequenzen (Martis et al. 2013) mit homologen Sequenzen vertreten waren (**Tabelle A 10**). In den beiden genannten Roggenressourcen wurden zunächst Enzyme, die die ersten Schritte der Biosynthese bestimmen, näher betrachtet. Dies sind sechs *ent*-Copalyl Diphosphat-Synthase Gene (CPS), acht *ent*-Kaurensynthase (KS) Gene, ein *ent*-Kaurenoxidase (KO) Gen und sechs *ent*-Kaurensäureoxidase (KAO) Gene (**Abbildung 1**). Hypothetische Roggen-Orthologe der GA-Oxidasen (*GA20ox*, sieben Gene; *GA3ox*, fünf Gene; *GA2ox*, fünfzehn Gene), die weitere Schritte der Biosynthese und des Abbaus der GA katalysieren (**Abbildung 1**) sind beschrieben (Achard und Genschik 2009). Darüber hinaus wurde ein orthologes Gen von *TaGA1ox-B1* (Pearce et al. 2015) entdeckt und zwei Roggenorthologe der Reis GA13-Oxidase (*GA13ox*)-Gene. Ebenso liegen von fünf Genen für P450-abhängige Enzyme der GA-Biosynthese Homologe von Roggen vor. Darunter befanden sich Orthologe des *elongated uppermost internode (EUI)* Gens aus Reis, das an der Deaktivierung bioaktiver Gibberelline beteiligt ist (Hedden und Sponsel 2015). Von den Genen der Signaltransduktion (**Abbildung 2**) sind im Roggen sieben Gibberellinrezeptorgene (*GA insensitive dwarf1*, *GID1*) und ein orthologes Gen des *Gibberellin insensitive dwarf2 (GID2)*-Gens aus Reis prognostiziert. Mit den in dieser Arbeit erzeugten Transkriptom-Sequenzen konnten die in der *Lo7*-Referenzgenomsequenz (Bauer et al. 2017) prognostizierten 74 GA-Gene um vier erweitert werden. Da *Ddw1* GA-sensitiv ist (Börner und Melz 1988) stellen diese Kandidatengene dar, insbesondere die bekannten GA-sensitiven Gene wie *ScGA13ox1*, *ScEL2*, *ScGIDL2* und ein homologes Gen der DELLA-Proteine, das als *ScSLR1* bezeichnet wurde (**Tabelle A 10**, **Abbildung 12**). Damit konnten Marker direkt im Gen entwickelt werden.

Im Roggen wurden 51 Marker für Gene des GA-Biosynthesewegs und des GA-Signaltransduktionsweges etabliert (Schwefel 2015). Die Marker sind in **Tabelle A 11** angegeben. Damit

wurden 26 (32,1%) „GA-Gene“ mit Hilfe disomer Weizen-Roggen Additionslinien auf einzelnen Chromosomen des Roggengenoms lokalisiert und 13 „GA-Gene“ in die genetische Karte der RIL Population *L2039-N x DH* integriert (**Abbildung 11**) (Schwefel 2015, Braun et al. 2019). Die Kartierungsergebnisse sind in **Tabelle 9** zusammengefasst. Auf Chromosom 5R wurden vier Gene der GA-Biosynthese (*ScKAOL4*, *ScKAOL5*, *ScGA3ox6*, *ScGA2ox12*) und sechs Gene der GA-Signaltransduktion kartiert (**Tabelle 10, Abbildung 11**). Die Primer vom Roggenortholog des *early flowering1* Blüterepressors im Reis, das ein Schlüsselregulator bei der GA-Antwort ist (Dai und Xue 2010), amplifizierten ein paraloges Gen auf Chromosom 4RL. Dieses kann weder durch die WCA *shotgun*-Sequenzen, noch durch die Roggengenomsequenz abgedeckt werden. Der GA-Signaltransduktionsweg beinhaltet zusätzlich ein Ortholog des *GA insensitive dwarfing gene D1*, vier *GAMYB*-Transkriptionsfaktoren, sowie die Orthologe der GA-Signalregulatoren SPINDLY (*SPY*), SNEEZY (*SNY*), EARLY FLOWERING1 (*EL1*) und drei mit *GAMYB*-assoziierte Proteinkinasen (*KGM*).

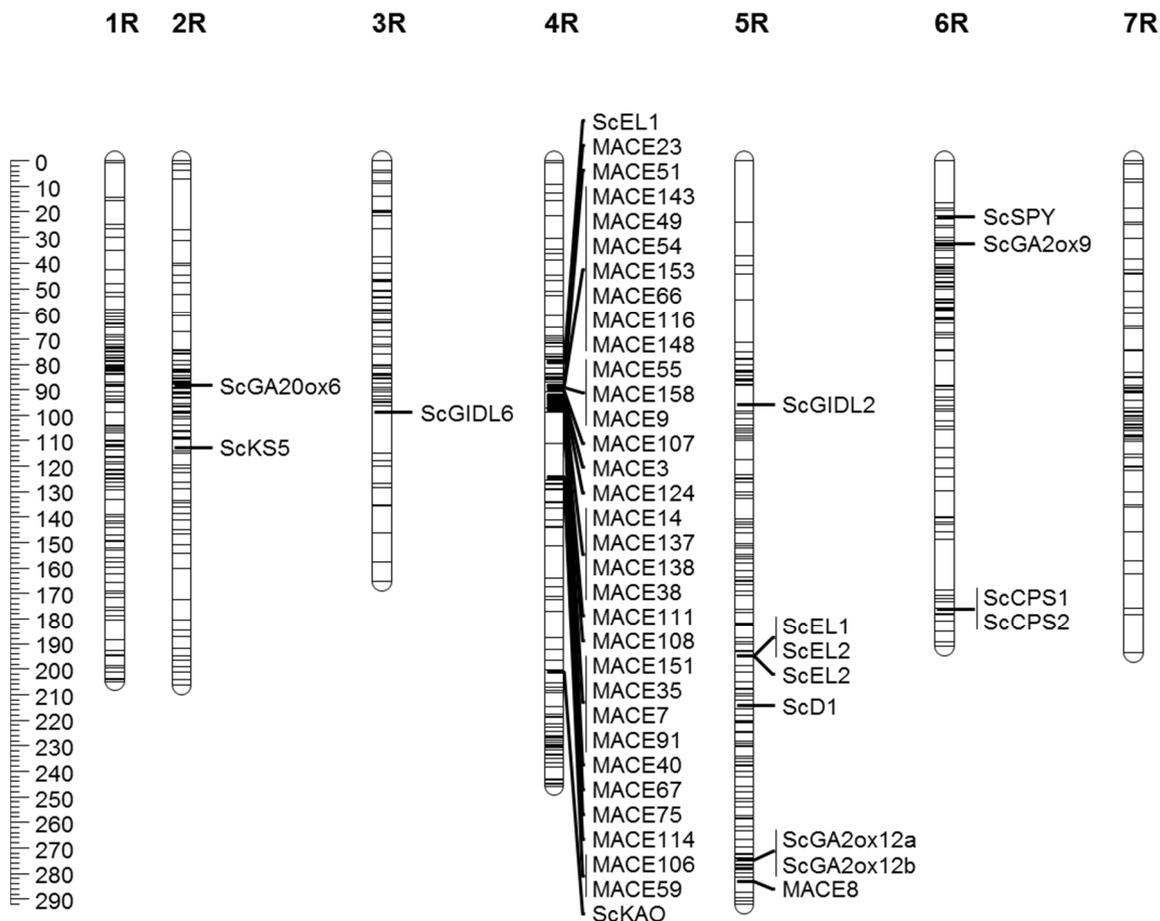


Abbildung 12 Kartierung (in cM) von Genen der Gibberellinbiosynthese (*ScCPS1*, *ScCPS2*, *ScKS5*, *ScKAO*, *ScGA20ox6*, *ScGA2ox9*, *ScGA2ox12a*, *ScGA2ox12b*) und Gibberellinsignaltransduktion (*ScEL1*, *ScEL2*, *ScD1*, *ScGIDL2*, *ScGIDL6*, *ScSPY*) in der Roggen-Population *L2039-N x DH* (adaptiert von Schwefel 2015, publiziert in Braun et al. 2019).

Tabelle 9 Übersicht über die kartierten Roggen-„GA-Gene“ (Schwefel 2015; Braun et al. 2019). Die Lokalisierung im Roggengenom erfolgte mittels disomer Weizen-Roggen Additionslinien und genetische Kartierung in der Population L2039-N x DH.

Roggen-GA-Gen	Lo7-Genmodell ^a	Lo7-contig ^a	Lo7 ^a	Roggengenomzipper ^a	WCA ^b	L2039xDH ^b	Weizen-Roggen Additionslinien
ScCPS1	Sc6Loc01460062.6	Lo7_v2_contig_2871227	6R		6R	6RL	1RS,6RL
ScCPS2	Sc6Loc00289390.2	Lo7_v2_contig_1361847	6R		6R	6RL	1RS,6RL
ScCPSL3	Sc1Loc00249276.4	Lo7_v2_contig_1356694	1R	1R	1R		1RS
ScKS1	Sc2Loc00135508.4	Lo7_v2_contig_1344120	2R	2R	1R, 2R		2RL
ScKS5	Sc2Loc00102810.4	Lo7_v2_contig_128032	2R	2R	2R	2RL	
ScKSL4	Sc7Loc00175501.2	Lo7_v2_contig_1348084	7R		2R		7RL
ScKO	Sc2Loc01442613.1	Lo7_v2_contig_2869509	2R	2R	2R		7RL
ScKAO	Sc4Loc01315347.2	Lo7_v2_contig_255428	4R	4R	4R	4RL	4RL
ScKAOL4	Sc1Loc00241579.1	Lo7_v2_contig_1355677	5R				5RS
ScGA13ox1	Keine Vorhersage	Lo7_v2_contig_1346653			4R, 5R, 6R		4RL
ScGA20ox1	Sc7Loc00329451.1	Lo7_v2_contig_1367831	7R		2R, 4R, 7R		7RS
ScGA20ox4	Sc1Loc01783522.4	Lo7_v2_contig_3968	1R	1R	1R		1RL
ScGA20ox6	Sc2Loc01307092.3	Lo7_v2_contig_252358	2R	2R	2R	2RL	2RL
ScGA3ox2	Sc3Loc01840570.1	Lo7_v2_contig_482629	3R	3R	3R		3RS
ScGA2ox9	Sc6Loc00222600.4	Lo7_v2_contig_1353437	6R	6R	6R	6RS	6RL
ScGA2ox12	Sc5Loc00129590.1	Lo7_v2_contig_133145	5R		5R, 7R	5RL	5RL
ScEUIL1	Sc1Loc00140626.1	Lo7_v2_contig_1344609	1R	1R	1R		1RL
ScD1	Sc5Loc01218674.5	Lo7_v2_contig_2309	5R	5R	5R	5RL	5RL
ScGID1	Sc1Loc01926132.2	Lo7_v2_contig_60281	1R	1R			1RL
ScGIDL2	Keine Vorhersage	Lo7_v2_contig_1344357		5R	5R	5RL	5RL
ScGIDL6	Sc3Loc00255746.1	Lo7_v2_contig_1357462	3R	3R	3R	3R	3RL
ScSPY	Sc6Loc00153402.2	Lo7_v2_contig_1345846	6R	6R	6R	6RS	6RS
ScSLR1	Keine Vorhersage	Lo7_v2_contig_1349703		4R			4RS
ScKGM1	Sc4Loc01966435.3	Lo7_v2_contig_63030	4R	4R	4R		4RL
ScEL1	Sc5Loc00312760.6	Lo7_v2_contig_1365212	5R	5R	5R	5RL	5RL
ScEL2						4RL	4RL
ScGAMYBL2	Sc4Loc02028316.1	Lo7_v2_contig_68693	4R	4R	4R		4RL

^a Bauer et al. (2017), ^b Martis et al. (2013)

Keines der DELLA-Paralogen wurde auf dem *Ddw1*-Zielchromosom 5R lokalisiert, sondern auf den Chromosomen 4RS (*ScSLR1*), 1R (*ScSLRL1*, *ScSLRL2*) und 2R (*ScSLRL3*). Das putative Roggengen *ScSLR1* konnte durch das Contig *Lo7 contig 1349703* vorhergesagt werden. Das prognostizierte Gen wurde in dieser Arbeit mit Marker *rGA57* auf Chromosom 4R kartiert (**Abbildung 12, Tabelle 9**). Es besteht aus einem Exon dessen kodierende Sequenz 1857 bp beträgt. Für den Marker wurde als Position zur Amplifikation der Bereich 2114-2620 bp in der genomischen Sequenz ermittelt (**Tabelle 12**). Bei Resequenzierung des Markers wurde ein 506 bp-langes Fragment erzeugt. Eine blastP-Analyse ($E < 1e-50$) in der Datenbank Ensembl Plants (Aken et al. 2017) ergab als beste Treffer eine Ähnlichkeit zu den DELLA-Proteinen DELLA RHT RHT1 TraesCS4B02G043100 (100 %, E-Wert: 2,3E-162) aus Weizen und SLN1 (HORVU4Hr1G006930) (99,6 %, E-Wert: 1,1E-161) aus Gerste.

Von den insgesamt sieben *GID1*-Genen im Roggen wurde bislang eines mit Hilfe der *Lo7*-Referenzsequenz aus Bauer et al. (2017) vorhergesagt. Das hier als *ScGIDL2* bezeichnete Gen wurde über das Contig *Lo7 contig 1344357* prognostiziert und auf Chromosom 5RL kartiert (**Abbildung 12, Tabelle 9**). Als kodierende Sequenz des Gens wurde eine Sequenz von 978 bp vorhergesagt. Für den Marker als Positionen zur Amplifikation wurde der Bereich zwischen 1395-1768 bp in der genomischen Sequenz ausgewählt. Das sequenzierte Markeramplicon von *rGA29* ergab bei Assemblierung 355 bp (**Tabelle 12, Abbildung 13**). Daraus konnte eine Proteinsequenz mit 325 aa abgeleitet werden. Die blastP-Analyse ($E < 1e-50$) erzielte als besten Treffer das Weizenprotein TraesCS5D02G249700 (Identität 92,8 %, E-Wert 1,1E-108) aus der Familie der Alpha/Beta Hydrolasen.

Das dritte putative Gen ist *ScGA13ox1* mit der Funktion einer GA13-Oxidase. Es wurde auf Grundlage des Contigs *Lo7 contig 1346653* vorhergesagt und auf Chromosom 4RL lokalisiert (**Tabelle 9**). Die angenommene kodierende Sequenz des Gens ist 1728 bp lang. Das Gen besteht aus drei Exons mit einer Länge von jeweils 292 bp, 227 bp und 1209 bp (**Tabelle 12**). Die Marker *rGA48*, *rGA21* sowie *rGA22* liegen im ersten Exon (**Abbildung 13**). Ihre Positionen für die Markeramplifikation waren in der genomischen Sequenz für *rGA22* 5485-6078, für *rGA21* 5589-6192 und für *rGA48* 6489-6678 bp. *rGA48* amplifizierte 189 bp, *rGA21* 603 bp und *rGA22* 593 bp (**Tabelle 12**). Eine Proteinsequenz mit 575 Aminosäuren konnte abgeleitet werden. Bei einer blastP-Analyse ($E < 1e-50$) wurden die Proteinsequenzen der Gene TraesCS4D02G174200 (94,6 %, E-Wert: 1,1E-167) aus Weizen und HORVU4Hr1G050930 (97,8 %, E-Wert: 2,3E-119) aus Gerste als beste Treffer ermittelt. Beide ähneln einem Protein aus der Familie Cytochrom P450 CYP714B3.

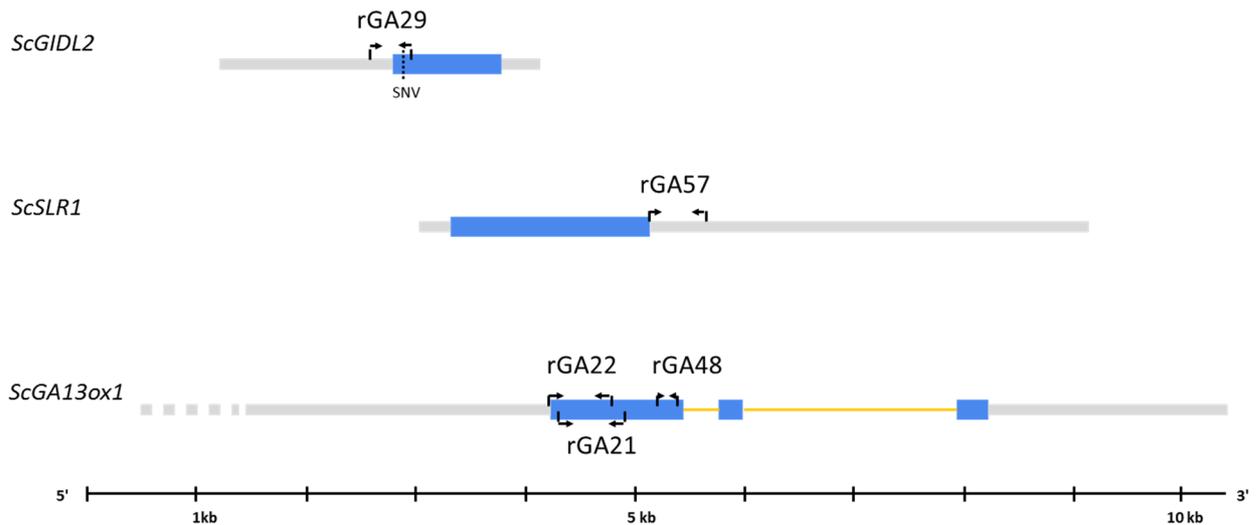


Abbildung 13 Genstruktur der putativen Gene *ScGIDL2*, *ScSLR1* und *ScGA13ox1*. Die Position der jeweiligen Marker (rGA) ist durch Pfeile angedeutet. Die grauen Balken kennzeichnen die untranslatierten (UTR) Bereiche, die blauen die kodierende Sequenz und der orangene Balken ein Intron.

3.4.2. Sequenzanalyse und phylogenetische Analysen der Gibberellinene im Roggen

Sowohl bei der Analyse der GA-Kandidatengene als auch in der Analyse der DEGs im Transkriptdatensatz ist eine GA2-Oxidase identifiziert worden. Eine phylogenetische Analyse sollte klären, inwieweit dieses Gen mit GA2-Oxidasen von *Arabidopsis thaliana* sowie anderer Gräser verwandt ist. Das GA2ox-Transkript *comp222186* ist in der Halbzwerghmutante signifikant überexprimiert und konnte auf dem 3,5 kb-langen *Lo7 contig 133145* (Bauer et al. 2017) mit einer Ähnlichkeit von 92 % und einer Wahrscheinlichkeit von $9,00E-159$ verankert werden (Braun et al. 2019). Das Gen ist auf Chromosom 5R lokalisiert (**Tabelle 9, Abbildung 12**). Der Genbereich umfasst 2565 bp und es wird ein Protein mit 345 Aminosäurelänge vorhergesagt (Braun et al. 2019). Das Protein weist die drei konservierten Aminosäuremotive S/PYRWG, xSW/VSEAF/YHI/VP/IL/M und DVxxxGxKxGLxxF auf, die die Funktionalität von C20 GA2-Oxidasen ausmachen (Lo et al. 2017). Wie *comp222186* erzielten die beiden Contigs *c10497_g1* (308 bp) und *c10497_g2* (290 bp) aus der Sequenzressource Braun et al. (2019) höchste Homologie mit *Lo7 contig 133145*. Dabei zeigte *c10497_g1* höchste Homologie zum kodierenden Bereich des Gens *ScGA2ox12* (**Abbildung A 5**). Diese Contigs konnten zur Identifizierung homologer Sequenzen in Weizen und *Aegilops tauschii* eingesetzt werden. Mit *c10497_g1* und der kodierenden Sequenz, die für das *Lo7 contig 133145* vorhergesagt

wurde, wurden im Weizen die drei Gene *TraesCS5A02G543100*, *TraesCS4B02G376200* und *TraesCS4D02G271300*, und in *Aegilops tauschii* die beiden Gene *EMT11481* (\approx *AET4Gv20853600*; Luo et al. 2017) und *EMT14198* identifiziert (Braun et al. 2019).

Die phylogenetische Analyse nach der Maximum-Likelihood-Methode (Kumar et al. 2016) zeigte, dass die von *Lo7 contig 133145* kodierte *GA2ox* zu *TaGA2ox-B12* im Weizen 94 % Ähnlichkeit aufweist (**Abbildung 14**). Aus diesem Grund wurde das Roggengen im Folgenden als *ScGA2ox12* bezeichnet. Diesem Schema folgend wurden die beiden orthologen Gene aus *Aegilops tauschii* *AetGA2ox12a* und *AetGA2ox12b* genannt. Das Ergebnis der phylogenetischen Analyse zeigte, dass die *GA2ox*-Gene aus Roggen, *Arabidopsis thaliana* und verwandter Gräsergenome drei paraloge Zweige bilden (**Tabelle 10**). Zweig I wird aus *GA2ox3*, -4, -7, -8 und -10 gebildet, Zweig II besteht aus *GA2ox1* und -2 und Zweig III setzt sich aus *GA2ox5*, -6 und -9 zusammen. *ScGA2ox12* gehört zu Zweig III und bildet unter anderem zusammen mit *OsGa2ox6*, *TaGa2ox-A9* und *TaGA2ox-A12* eine Klade. Die Roggenparaloga *ScGA2ox6*, *ScGa2ox9* und *ScGA2ox11* finden sich in einer Unterklade. Darüber hinaus wurde durch diese Analyse zum ersten Mal gezeigt, dass im Roggenreferenzgenom vier weitere *GA2ox*-Gene existieren. Diese wurden gemäß der vorherigen Nomenklatur *ScGA2ox14*, -15, -16 und -17 genannt. *ScGA2ox14* ähnelt *ScGA2ox4*, das zu Zweig I gehört. *ScGA2ox15* und -16 fallen in das Cluster, das den Zweig III bildet und sind mit *OsGA2ox5* und *BdGA2ox5* verwandt. *ScGA2ox14* und -15 konnten bislang keinem Chromosom zugeordnet werden. Jedoch kann über Syntäniebeziehungen zu Weizen eine Position auf den Chromosomen 1R und 3R postuliert werden. Die *ScGA2ox*-Gene konnten alle über die *Lo7*-Sequenz, den Roggengenomzipper und die WCA *shotgun*-Sequenzen einem Chromosom zugewiesen werden (**Tabelle 10**).

Zur Analyse der Sequenzen wurden die Markerpositionen in den von Bauer et al. (2019) prognostizierten Genstrukturen bestimmt (**Tabelle 12**). Insgesamt lagen 72,5 % der Marker in der prognostizierten kodierenden Sequenz eines Gens. Bei 23,5 % der Marker lagen die 5'-Enden der Vorwärts- und Rückwärts-Primer in den untranslatierten Bereichen (UTR) und 9,8 % der Marker lagen im Intron eines Gens. Zusätzlich zur Kartierung der GA-Marker wurden diese in zehn ausgewählten Roggeninzuchtlinien (*11/1662*, *11/1667*, *11/1730*, *11/1731*, *11/1732*, *11/1733*, *11/1739*, *11/1743*, *11/1744*, *11/1755*), sowie in zwei Eliteinzuchtlinien (*HYB201*, *HYB202*) aus dem 'Carsten' Genpool, resequenziert. Zur Verifizierung der 45 resequenzierten Marker wurden blastN-Analysen ($E < 1e-20$, $E < 1e-50$) der Konsensussequenzen gegen die Roggenkandidatengene durchgeführt. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 11** zusammengefasst und die Positionen der Marker in **Tabelle 12**. 34 Markersequenzen erzielten einen Treffer mit einem Kandidatengen. 10 weitere Marker, die in den UTR-Bereichen der Gene liegen (**Tabelle 11**), ergaben einen Treffer mit dem *Lo7*-Contig, auf dem das Kandidatengen kodiert ist. Der *ScKAOL4*-Marker *rGA70* zeigte zusätzlich Sequenzhomologie zu *ScKAOL1*.

Tabelle 10 GA2ox-Gene im Roggen (Auszug aus Braun et al. 2019). Zusammenfassung der phylogenetischen Analyse, der chromosomalen Lokalisation im Roggengenom und Position der Weizenhomologen.

Roggengen	Phylogenetischer Zweig	Lo7-Genmodel ^a	Lo7 x Lo225 ^a	Roggengenomzipper ^a	WCA ^b	L2039-N x DH ^b	Weizen-Roggen Additionslinien	Weizenchromosom
ScGA2ox1	II	Sc1Loc00171230.1	1R	1R	1R			1A, 1B, 1D
ScGA2ox2	II	Sc7Loc00167976.1	7R		7R			7A, 7B, 7D
ScGA2ox3	I	Sc3Loc01435616.2	3R	3R	3R			3A, 3B, 3D
ScGA2ox4	I	Sc1Loc01504161.1	1R	1R				1A, 1B, 1D
ScGA2ox6	III	Sc2Loc00178961.2	2R		2R, 5R, 7R			2A, 2B, 2D
ScGA2ox7	I	Sc3Loc01908121.1	3R	3R	3R			3A, 3B, 3D
ScGA2ox8	I	Sc1Loc01985677.2	1R	1R				1A, 1B, 1D
ScGA2ox9	III	Sc6Loc00222600.4	6R	6R	6R	6RS	6RL	6A, 6B, 6D
ScGA2ox11	III	Sc7Loc00246160.5	7R	7R	2R, 7R			4A, 4B, 4D
ScGA2ox12	III	Sc5Loc00129590.1	5R		5R, 7R	5RL	5RL	5A, 4B, 4D
ScGA2ox14	I	Sc1Loc01504157.1	1R	1R	1R, 3R			1A, 1B, 1D
ScGA2ox15	III	Sc0Loc00171204.3	1R		1R, 3R			1A, 1B, 1D
ScGA2ox16	III	Sc0Loc01055474.1			6R			3D
ScGA2ox17	III	Sc0Loc01318931.1			6R			3A, 3B, 3D

^a Bauer et al. (2017), ^b Martis et al. (2013)

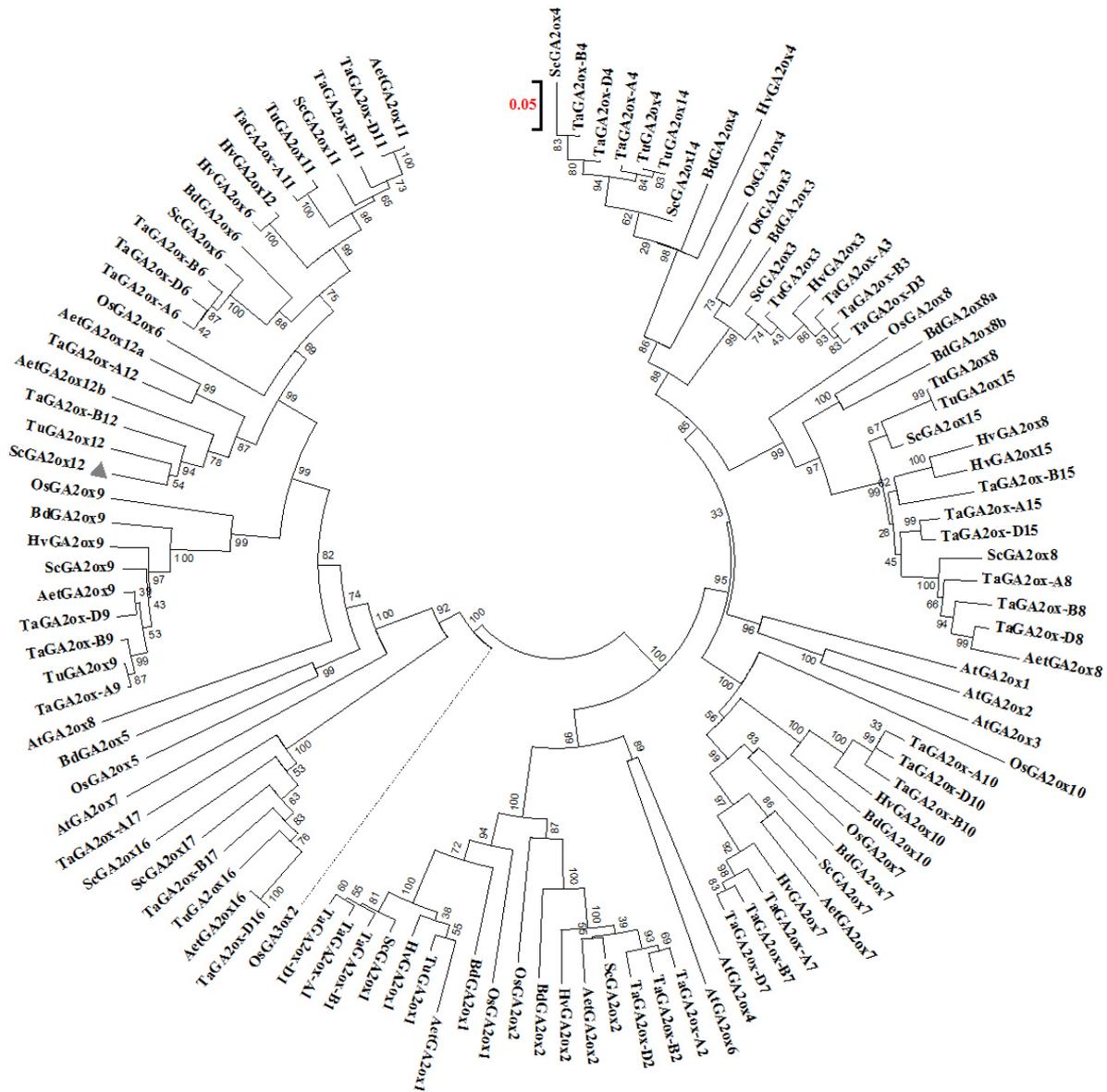


Abbildung 14 Phylogenetische Beziehungen der GA2ox-Aminosäuresequenzen von Roggen (*Secale cereale*, Sc), Brotweizen (*Triticum aestivum*, Ta), Gerste (*Hordeum vulgare*, Hv), *Aegilops tauschii* (Aet), *Triticum urartu* (Tu), *Brachypodium distachyon* (Bd), Reis (*Oryza sativa*, Os) und *Arabidopsis thaliana* (At) (aus Braun et al. 2019). Die als *Outgroup* verwendete Sequenz ist durch eine gestrichelte Linie abgebildet. Die Werte der Bootstrap-Validierung sind in Prozent von 1000 Wiederholungen angegeben. Die Skala gibt die Zahl der Aminosäuresubstitutionen pro Position an. Das Dreieck zeigt das GA2ox12-Gen, das durch die Feinkartierung des *Ddw1*-Gens als co-segregierender Marker identifiziert wurde.

Tabelle 11 Sequenzabgleich (blastN) der resequenzierten Marker gegen die GA-Kandidatengene im Roggen.

GA-Kandidatengen	Marker	Lo7-Genmodell/ Lo7-Contig ^a	Identität (%)	Überlap- pung (bp)	Fehlpaar- ung	Lücke	Start Abfrage- sequenz	Ende Abfrage- sequenz	Start Ziel- sequenz	Ende Ziel- sequenz	E Wert	Gesamt- ergebnis
ScCPS1	rGA46	Sc6Loc01460062.6	92,86	168	11	1	1	168	780	946	3,00E-60	230
ScCPS1	rGA47	Sc6Loc01460062.6	97,66	128	3	0	150	277	2031	1904	1,00E-59	230
ScCPS1	rGA47	Sc6Loc01460062.6	97,66	128	3	0	790	917	1904	2031	1,00E-59	230
ScCPS2	rGA23	Sc6Loc00289390.2	99,6	247	1	0	193	439	1702	1948	2,00E-135	482
ScKS1	rGA27	Sc2Loc00135508.4	100	244	0	0	249	492	2385	2142	2,00E-136	484
ScKS1	rGA25	Sc2Loc00135508.4	99,57	230	1	0	627	856	596	367	2,00E-125	448
ScKS1	rGA16	Sc2Loc00135508.4	100	218	0	0	111	328	1052	1269	1,00E-120	432
ScKS1	rGA14	Sc2Loc00135508.4	99,54	218	1	0	459	676	1694	1477	3,00E-118	424
ScKS1	rGA15	Sc2Loc00135508.4	99,02	205	2	0	472	676	1694	1490	3,00E-108	391
ScKS1	rGA25	Sc2Loc00135508.4	100	184	0	0	346	529	777	594	2,00E-100	365
ScKS1	rGA15	Sc2Loc00135508.4	100	144	0	0	1	144	1980	1837	1,00E-76	285
ScKS1	rGA15	Sc2Loc00135508.4	100	142	0	0	223	364	1836	1695	2,00E-75	281
ScKS1	rGA14	Sc2Loc00135508.4	98,61	144	0	1	208	351	1836	1695	8,00E-70	264
ScKS1	rGA14	Sc2Loc00135508.4	100	129	0	0	1	129	1965	1837	2,00E-67	256
ScKS1	rGA16	Sc2Loc00135508.4	100	116	0	0	435	550	1268	1383	9,00E-60	230
ScKS1	rGA25	Sc2Loc00135508.4	100	57	0	0	6	62	831	775	1,00E-24	113
ScKS5	rGA43	Lo7_v2_contig_128032	99,19	246	1	1	1	246	1354	1598	6E-133	464
ScKS5	rGA45	Sc2Loc00102810.4	100	96	0	0	163	258	1241	1146	3,00E-48	190
ScKS5	rGA45	Sc2Loc00102810.4	100	92	0	0	1	92	1331	1240	8,00E-46	182
ScKO	rGA41	Sc2Loc01442613.1	87,8	164	20	0	414	577	456	293	2,00E-40	167
ScKO	rGA41	Sc2Loc01442613.1	84,03	144	23	0	162	305	598	455	2,00E-21	103
ScKO	rGA42	Sc2Loc01442613.1	84,21	114	18	0	138	251	1067	954	1,00E-15	83,8
ScKAO	rGA31	Lo7_v2_contig_255428	99,25	134	1	0	2	135	2339	2472	1E-70	258
ScKAO	rGA69	Sc4Loc01315347.2	94,4	125	7	0	129	253	899	1023	6,00E-49	192
ScKAOL1	rGA70	Sc2Loc00151791.2	89,66	87	9	0	439	525	1386	1472	4,00E-21	101

Fortsetzung Tabelle 11

GA-Kandidatengen	Marker	Lo7-Genmodell/ Lo7-Contig ^a	Identität (%)	Überlap- pung (bp)	Fehlpaar- ung	Lücke	Start Abfrage- sequenz	Ende Abfrage- sequenz	Start Ziel- sequenz	Ende Ziel- sequenz	E Wert	Gesamt- ergebnis
ScKAOL4	rGA70	Lo7_v2_contig_1355677	93,59	312	12	4	7	313	3896	4204	3,00E-124	436
ScGA13ox1	rGA21	vorhergesagt	99,83	589	1	0	6	594	89	677	0	1160
ScGA13ox1	rGA22	vorhergesagt	99,82	563	1	0	16	578	1	563	0	1108
ScGA13ox1	rGA48	vorhergesagt	100	203	0	0	2	204	981	1183	8,00E-115	402
ScGA13ox1	rGA21	vorhergesagt	97,52	202	0	5	608	809	619	423	1,00E-89	321
ScGA20ox1	rGA61	Lo7_v2_contig_1367831	99,8	499	1	0	1	499	2116	2614	0	981
ScGA20ox1	rGA60	Lo7_v2_contig_1367831	99,38	487	1	1	1	487	2208	2692	0	936
ScGA20ox4	rGA49	Sc1Loc01783522.4	99,23	130	1	0	56	185	1	130	2,00E-66	250
ScGA20ox6	rGA55	Lo7_v2_contig_252358	100	471	0	0	1	471	1866	1396	0	934
ScGA3ox2	rGA66	Sc3Loc01840570.1	100	53	0	0	207	259	1085	1137	2,00E-22	105
ScGA2ox9	rGA67	Sc6Loc00222600.4	100	233	0	0	717	949	410	642	2,00E-129	462
ScGA2ox12	MACE3	Sc5Loc00129590.1	97,48	159	3	1	892	1050	638	795	2,00E-73	276
ScD1	rGA35	Sc5Loc01218674.5	98,57	140	2	0	643	782	683	544	5,00E-69	262
ScGID1	rGA54	Lo7_v2_contig_60281	97,83	508	3	4	1	508	2773	3272	0	896
ScGIDL2	rGA29	vorhergesagt	98,06	155	3	0	201	355	978	824	9,00E-79	283
ScGIDL6	rGA37	Sc3Loc00255746.1	98,7	307	4	0	398	704	413	107	3,00E-164	577
ScGIDL6	rGA36	Sc3Loc00255746.1	98,38	185	3	0	2	186	229	413	1,00E-93	343
ScGIDL6	rGA36	Sc3Loc00255746.1	99,15	118	1	0	482	599	486	603	2,00E-58	226
ScSPY	rGA7	Sc6Loc00153402.2	99,42	342	2	0	1	342	2451	2792	0	662
ScSPY	rGA6	Sc6Loc00153402.2	100	218	0	0	593	810	1951	2168	2,00E-120	432
ScSPY	rGA18	Sc6Loc00153402.2	99,46	186	0	1	1	186	177	361	1,00E-96	353
ScSPY	rGA18	Sc6Loc00153402.2	99,39	164	1	0	846	1009	359	522	7,00E-86	317
ScSPY	rGA19	Sc6Loc00153402.2	100	134	0	0	3	136	567	700	2,00E-70	266

Fortsetzung Tabelle 11

GA-Kandidatengen	Marker	Lo7-Genmodell/ Lo7-Contig ^a	Identität (%)	Überlap- pung (bp)	Fehlpaar- rung	Lücke	Start Abfrage- sequenz	Ende Abfrage- sequenz	Start Ziel- sequenz	Ende Ziel- sequenz	E Wert	Gesamt- ergebnis
ScSPY	rGA19	Sc6Loc00153402.2	100	132	0	0	890	1021	773	904	3,00E-69	262
ScSLR1	rGA57	Lo7_v2_contig_1349703	97,09	515	1	4	2	516	2114	2614	0	890
ScKGM1	rGA9	Sc4Loc01966435.3	100	142	0	0	5	146	1	142	2,00E-75	281
ScKGM1	rGA10	Sc4Loc01966435.3	100	57	0	0	385	441	975	919	2,00E-24	113
ScGAMYBL2	rGA73	Sc4Loc02028316.1	98,94	94	1	0	1	94	1203	1296	2,00E-44	178
ScEL1	rGA59	Lo7_v2_contig_1365212	98,38	616	9	1	1	615	6960	6345	0	1134
ScEL1	rGA58	Lo7_v2_contig_1365212	98,73	474	6	0	1	474	7033	6560	0	892
ScEL1	rGA3	Sc5Loc00312760.6	100	177	0	0	58	234	898	722	5,00E-96	351
ScEL1	rGA1	Sc5Loc00312760.6	100	144	0	0	859	1002	1146	1003	2,00E-76	285
ScEL1	rGA3	Sc5Loc00312760.6	100	133	0	0	867	999	722	590	9,00E-70	264
ScEL1	rGA4	Sc5Loc00312760.6	100	133	0	0	161	293	376	244	8,00E-70	264
ScEL1	rGA4	Sc5Loc00312760.6	100	96	0	0	618	713	178	83	9,00E-48	190
ScEL1	rGA4	Sc5Loc00312760.6	100	72	0	0	821	892	83	12	2,00E-33	143
ScEL1	rGA4	Sc5Loc00312760.6	100	70	0	0	372	441	246	177	3,00E-32	139
ScEL1	rGA4	Sc5Loc00312760.6	98,68	76	0	1	1	76	447	373	5,00E-31	135
ScGAMYBL2	rGA74	Sc4Loc02028316.1	100	215	0	0	289	503	1296	1082	4,00E-119	426

^a Ressource Kandidatengene: Bauer et al. (2017)

Tabelle 12 Markerpositionen in den Roggen GA-Genen und Genstruktur der vorhergesagten Roggen GA-Gene *ScGIDL2*, *ScSLR1* und *ScGA13ox1*.

Gen	Genbereich (bp)		Richtung	Marker	Markerposition (bp)		Markersequenz
	cds	genomisch			cds	genomisch	
<i>ScCPS1</i>	732–946	4576–4790	+	<i>rGA46</i>	725–969	4569–4922	299
<i>ScCPS1</i>	1181–1407	5319–5545	+	<i>rGA40</i>	1226–1752	5364–6285	##
<i>ScCPS1</i>	1408–1523	5812–5927	+	<i>rGA50</i>	1610–1783	6064–6316	##
<i>ScCPS1</i>	1905–2031	6808–6934	+	<i>rGA47</i>	1850–2084	6383–7090	1074
<i>ScCPS1</i>	2278–2502	7623–7847	+	<i>rGA23</i>	1936–2423	7768–6821	927
<i>ScCPS2</i>	656–776	5239–5119	–	<i>rGA46</i>	434–677	5216–5569	299
<i>ScCPS2</i>	1117–1232	4279–4164	–	<i>rGA40</i>	937–1421	3810–4734	##
<i>ScCPS2</i>	1233–1331	4075–3977	–	<i>rGA50</i>	1280–1453	3778–4028	##
<i>ScCPS2</i>	1332–1574	3899–3657	–	<i>rGA47</i>	1520–1701	3693–4955	1074
<i>ScCPS2</i>	1948–2172	2406–2182	–	<i>rGA23</i>	1587–2093	2261–3273	927
<i>ScKS1</i>	310–595	4730–5015	+	<i>rGA25</i>	355–837	4775–5643	858
<i>ScKS1</i>	1055–1269	6258–6472	+	<i>rGA16</i>	1014–1526	6137–7007	850
<i>ScKS1</i>	1270–1382	6582–6694	+	<i>rGA14</i>	1314–1809	6622–7397	999
<i>ScKS1</i>	1479–1694	6960–7175	+	<i>rGA15</i>	1478–1980	6959–7646	676
<i>ScKS1</i>	2083–2385	8394–8696	+	<i>rGA27</i>	2136–2385	8447–8946	496
<i>ScKS5</i>	1033–1145	4175–4063	–	<i>rGA45</i>	1057–1332	4151–3715	382
<i>ScKS5</i>	1846–1857	2696–2685	–	<i>rGA43</i>		1350–1604	246
<i>ScKSL4</i>	1–142	1944–2085	+	<i>rGA44</i>		1990–2323	456
<i>ScKO</i>	134–294	28911–28751	–	<i>rGA41</i>	249–645	27012–28796	1140
<i>ScKO</i>	910–1104	26385–26191	–	<i>rGA42</i>	881–1067	26228–26603	889
<i>ScKAO</i>	1–714	778–1491	+	<i>rGA31</i>	#–981	601–2277	414
<i>ScKAO</i>	715–793	1812–1890	+	<i>rGA33</i>	#–963	1814–2259	##
<i>ScKAO</i>	794–900	2003–2109	–	<i>rGA69</i>	1023–860	2067–2356	291
<i>ScKAOL4</i>	1–597	5792–5196	–	<i>rGA70</i>		3892–4204	551
<i>ScGA13ox1</i>	1–292	9515–9224	–	<i>rGA48</i>	747–558	6678–6489	204
<i>ScGA13ox1</i>	293–519	7273–7047	–	<i>rGA21</i>	1647–1063	6192–5589	809
<i>ScGA13ox1</i>	520–1728	6717–5509	–	<i>rGA22</i>	#–1177	6078–5485	586
<i>ScGA20ox1</i>	1–482	912–1393	+	<i>rGA61</i>		2116–2623	506
<i>ScGA20ox1</i>	483–1074	1518–2109	+	<i>rGA60</i>		2205–2696	487
<i>ScGA20ox4</i>	1–569	4112–3544	–	<i>rGA49</i>	#–133	4166–3980	185
<i>ScGA20ox6</i>	655–762	1229–1336	+	<i>rGA55</i>		1384–1878	471
<i>ScGA3ox2</i>	1091–1137	1285–1236	–	<i>rGA66</i>	1085–1137	1498–1062	430
<i>ScEUIL1</i>	336–5124	4789–6724	+	<i>rGA32</i>		2821–2608	##
<i>ScGA2ox9</i>	412–642	4716–4946	+	<i>rGA67</i>	387–642	4035–5146	1127
<i>ScGA2ox12</i>	1–456	2715–2260	–	<i>MACE3</i>	866–617	1708–1459	1050
<i>ScD1</i>	1–63	4645–4583	–	<i>rGA34</i>		4420–6707	##
<i>ScD1</i>	313–387	3035–2961		<i>rGA35</i>	338–800	3010–1371	1525
<i>ScGID1</i>	45–513	1978–2446	+	<i>rGA54</i>		2773–3277	508
<i>ScGIDL2</i>	1–978	2577–1600	–	<i>rGA29</i>		1395–1768	355
<i>ScGIDL6</i>	1–410	1895–2304	+	<i>rGA37</i>	101–587	1995–2712	704

Fortsetzung Tabelle 12

Gen	Genbereich (bp)		Richtung	Marker	Markerposition (bp)		Markersequenz
	cds	genomisch			cds	genomisch	
<i>ScGIDL6</i>	411–489	2394–2472	+	<i>rGA36</i>	212–591	2106–3282	1042
<i>ScSPY</i>	1–360	478–837	+	<i>rGA18</i>	140–611	655–1831	1162
<i>ScSPY</i>	361–522	1482–1643	+	<i>rGA19</i>	513–990	1710–2976	1163
<i>ScSPY</i>	1786–1880	5332–5426	+	<i>rGA6</i>	1769–2177	5091–6204	1054
<i>ScSPY</i>	1881–1950	5512–5581	+	<i>rGA7</i>	2447–2792	6656–7146	483
<i>ScSLR1</i>	1–1857	260–2116	+	<i>rGA57</i>		2114–2620	516
<i>ScKGM1</i>	141–219	4220–4142	–	<i>rGA9</i>	1–142	4483–5220	713
<i>ScKGM1</i>	1015–1306	1281–990	–	<i>rGA10</i>	919–975	1078–2252	1108
<i>ScEL1</i>	246–375	3340–3469	+	<i>rGA4</i>	446–762	2614–3628	999
<i>ScEL1</i>	592–722	3865–3995	+	<i>rGA2</i>		4705–6311	##
<i>ScEL1</i>	723–897	4629–4803	+	<i>rGA3</i>	421–927	3603–4896	1141
<i>ScEL1</i>	898–988	4886–4976	+	<i>rGA1</i>	1007–1146	5597–6612	1002
<i>ScEL1</i>	989–1146	5598–5755	+	<i>rGA59</i>		6345–6943	616
<i>ScEL1</i>	1147–1179	5927–5959	+	<i>rGA58</i>		6556–7027	474
<i>ScGAMYBL2</i>	367–1015	6296–5648	–	<i>rGA73</i>	1296–1203	4403–3906	501
<i>ScGAMYBL2</i>	1016–1296	4590–4310	–	<i>rGA74</i>	1296–1080	4526–4047	505

= Keine Verankerung des Markers in der kodierenden oder genomischen Sequenz, ## = kein Amplifikat für die Sequenzierung

3.5. Feinkartierung von *Ddw1* im Winterroggen

Zu Kartierungsbeginn war bereits bekannt, dass *Ddw1* auf einem translozierten Segment des langen Arms von Chromosom 5R liegt, das Homologie mit der Chromosomengruppe 4L der Triticeae zeigt, und mit dem RFLP-Marker *WG199* und dem Isoenzymmarker β -*Amy-R1* gekoppelt ist (Korzun et al. 1996). Um Marker im Zielintervall anzureichern, wurde unter anderem der Ansatz der vergleichenden Kartierung verfolgt. Dieser Ansatz wurde ergänzt durch die Nutzung von SNP-Markern aus der hochdichten Karte des Roggens sowie durch die Selektion von Roggen-ESTs aus dem MACE-Datensatz.

3.5.1. Markerentwicklung für *Ddw1*

Wertvolle Informationen lieferten die Genomentwürfe von *Triticum urartu* und *Aegilops tauschii* (Jia et al. 2013; Ling et al. 2013), wobei bei Beginn der Experimente die genomische Sequenz von *Aegilops tauschii* noch nicht zur Verfügung stand (Luo et al. 2017). Zu Beginn der Kartierungsarbeiten wurden einerseits Marker aus Weizen-ESTs (Akhunov et al. 2010), die nachfolgend als *tcos*-Marker bezeichnet wurden, entwickelt. Zum anderen stammten weitere Marker von Roggen-ESTs ab (Haseneyer et al.

2011), die durch Ähnlichkeit zu Genen im Reis und in *Brachypodium distachyon* nach der Vorgehensweise, wie von Hackauf et al. (2009; 2012) beschrieben, identifiziert wurden. Diese Marker sind: *tcos4366*, *c26102*, *c27051*, *c30002*, *c28517*, *c26078*, *tcos1137*, *tcos3110* (**Tabelle 3, Tabelle A 13**). Diese identifizierten in *Aegilops tauschii* den orthologen Bereich auf Chromosom 4D auf drei bins (*bin142*, *bin 143*, *bin144*) mit 36 Genmodellen (**Tabelle A 12**). Zudem wurden mit den Markern *c27051* und *c30002* vier in *Aegilops tauschii* unkartierte Genmodelle (*EMT00546*, *EMT00547*, *EMT00548*, *EMT00549*) gefunden, die im vollständig sequenzierten Genom ebenso auf Chromosom 4D lokalisiert sind. Unter Verwendung der *Aegilops*-Genmodelle wurden zur Markerentwicklung 43 Roggen-ESTs einem 5k Array (Haseneyer et al. 2011) entnommen und 32 neue Marker etabliert. In der Population *L2039-N x DH* wurden neun Marker auf Chromosom 5RL kartiert, die sich im *Aegilops tauschii* Zielintervall abbilden lassen: *c9152*, *c132523*, *c15353*, *c14842*, *c91370*, *c25606*, *c16271*, *c1751*, *c36819* (**Tabelle A 12, Tabelle A 13**). Zudem wurden einige dieser Marker, neben anderen, mit Hilfe der disomen Weizen-Roggen-Additionslinien auf Chromosom 5R bzw. 5RL lokalisiert. Diese sind: *c10570*, *c16271*, *c16271*, *c1751*, *c5051*, *c67906*, *c68163*, *c69423*, *c9152* (**Tabelle A 12, Tabelle A 13**). Durch die Nutzung der Genmodelle in *Aegilops tauschii* und den Vergleich zu *Triticum urartu* konnte schrittweise ein kleinerer Bereich definiert werden. Dadurch konnten die neuen Marker *c124937*, *c15679* und *c103925* entwickelt und in die *Ddw1*-Kartierungspopulation integriert werden (**Tabelle A 12, Tabelle 13, Abbildung 16**). Diese Marker weisen Ähnlichkeit zu Genen im *Ddw1*-Intervall der Chromosomen 4D in *Aegilops tauschii*, 4A in *Triticum urartu* und 4B bzw. 5A in *Triticum dicoccoides* und dem Weizen auf (**Tabelle 13, Abbildung 16**).

Weitere auf Chromosom 5RL-lokalisierte MACE-Marker zeigten Kopplung mit *Ddw1* und ihre physikalische Position wurde mit Hilfe von Weizen-Roggen-Additionslinien verifiziert (**Tabelle A 12, Tabelle A 13**). *MACEtp04*, *MACEtp15-5R*, *MACE08*, *MACE113*, *MACE118*, *MACE27*, *MACE3* und *MACE4* konnten relativ zu *Ddw1* in 685 Einzelpflanzen aus neun $F_{4:5}$ Linienfamilien (**Abbildung A 2, Tabelle A 1**) kartiert werden (**Abbildung 16**). Mit Ausnahme von *MACE113*, *MACE110* und *MACEtp04* zeigen die zugrunde liegenden ESTs keine differentielle Expression. Die gemeinsam auf *Lo7 contig 133145* verankerten Marker *MACE3* (abgeleitet von Contig *c10497_g1*), *MACE4* (abgeleitet von Contig *c104972_g2*) und *comp222186* haben Homologie mit den als *GA2ox* annotierten Genen *AET4Gv20853600* (entspricht *EMT11481* und *EMT14198*; Jia et al. 2013) von *Aegilops tauschii* und *TRIUR3_06906* von *Triticum urartu* (**Tabelle 13**). Marker *MACE3* und *MACE4* repräsentieren zwei paraloge Contigs, die zuvor den Genen *ScGA2ox12a* und *ScGA2ox12b* zugeordnet wurden.

3.5.2. Feinkartierung von *Ddw1* in der *R1620 x R347/1* F_{4:5}-Population

Das durch die DARt-Marker *rPt-507664* und *rPt-50826* gegebene Intervall, das laut Alheit et al. (2014), in Triticale das Gen *Ddw1* einschließt, wurde in Roggen durch die Kartierung in der Population *L2039-N x DH* auf 6,7 cM eingegrenzt. Die Kartierungsdaten für *MACE3* lokalisieren den Marker im Zielbereich von *Ddw1* (19,9 cM proximal von Marker *Xgwm6*, 17,5 cM distal von *HvBMYg*; **Tabelle A 14**), eng gekoppelt mit neuentwickelten Markern wie *c26102*, *tcos4366* und *c28517* (**Tabelle A 13**, **Tabelle A 14**). Um weitere Informationen zu erhalten wurde *MACE3* resequenziert, sodass *dMACE3* und *dMACE3_2* entwickelt werden konnten und relativ zu *Ddw1* in der Kartierungspopulation *R1620 x R347/1* kartiert wurden (**Abbildung 15**, **Abbildung 18**). Wie bereits beschrieben zeigen *MACE3* und *MACE4* Homologie zu den *Aegilops tauschii* Genmodellen *EMT11481* (\approx *AET4Gv20853600*; Luo et al. 2017) und *EMT14198*. Um die homologen Genmodelle (*Sc5R11481*, *Sc5R14198*) auf Chromosom 5R möglichst vollständig zu erfassen, wurden die WCA *shotgun*-Sequenzen nach homologen Sequenzen durchsucht. Aus dem Alignment ergab sich zusätzliche Sequenzinformation, die nach Validierung gegen die Roggen-ESTs zur Etablierung neuer Marker benutzt wurde. Beim Screening konnte für den Marker *Sc5R14198* ein dominanter Polymorphismus nachgewiesen werden und relativ zu *Ddw1* in der Kartierungspopulation *R1620 x R347/1* kartiert werden (**Abbildung 15**). Die in **Tabelle 13** genannten Marker (*c26102*, *tcos4366*, *c28517*, *c30002*, *c27051*, *MACE1*, *MACE2*, *MACE3*, *dMACE3*, *MACE4*, *Sc5R14198*) wurden in dieser Population in einem 3,4 cM langen Segment auf Chromosom 5R kartiert (**Abbildung 15**, **Abbildung 16**). Distal von *Ddw1* wurde durch *MACE3* das Zielintervall auf 0,2 cM definiert. Für diesen Marker wurde ein Rekombinationsereignis unter den 685 Einzelpflanzen der Kartierungspopulation *R1620 x R347/1* identifiziert. *MACE4* zeigte keine Rekombination zu *Ddw1* und damit absolute Kopplung mit *Ddw1* (**Abbildung 16**). Proximal von *Ddw1* wurde das Intervall durch *Sc5R14198* auf 0,2 cM eingegrenzt. *MACE3* und *Sc5R14198* definierten somit das Intervall um *Ddw1* auf 0,4 cM.

3.5.3. Kollinearität des *Ddw1* Locus zu *Triticum urartu*, *Aegilops tauschii*, *Triticum dicoccoides* und Weizen

Die Feinkartierung dokumentiert für den *Ddw1*-Locus im Roggen und den orthologen Regionen in *Triticum dicoccoides*, *Triticum urartu*, *Aegilops tauschii* und Weizen weitgehende Kollinearität auf Mikrolevelbene (**Tabelle 13**). Nach Feinkartierung der proximalen *Ddw1*-Marker *c26102*, *tcos4366* sowie *MACE3* im Roggen (**Abbildung 15**) konnte in *Aegilops tauschii* ein sub-genomischer Bereich von 0,22 Mbp auf Chromosom 4D identifiziert werden (**Abbildung 16**). In *Triticum urartu* konnten im Gegensatz zu *Aegilops tauschii* (Jia et al. 2013) die distalen *Ddw1*-Marker *c27051* und *c30002* verankert werden, wodurch ein zusammenhängendes Intervall zwischen *c26102* und *c30002* mit einer Länge von

0,24 Mbp identifiziert wurde (**Abbildung 16, Tabelle 13**). Der Vergleich mit der physikalischen Karte von *Aegilops tauschii* (Luo et al. 2017) zeigte, dass die Marker *c27051* und *c30002* in diesem Genom auf Chromosom 4D kartiert werden können. Das *Ddw1*-Intervall auf Chromosom 4D umfasst 1,11 Mbp, wobei es proximal durch die Marker *tcos4366* und *c26102* und distal durch *c27051* und *c30002* definiert wird (**Abbildung 16, Tabelle 13**). Der Abstand zwischen *c26102* und *MACE3* beläuft sich auf 0,59 Mbp und zwischen *MACE3* zu *c27051* auf 0,52 Mbp. Durch den Vergleich zwischen den Genmodellen, die mit der genomischen *Aegilops tauschii*-Sequenz vorhergesagt wurden, und den Genmodellen in *Triticum urartu* wurde sichtbar, dass sich allein die Reihenfolge der Marker *c15679* und *c103925* unterscheidet. Die Marker sind in beiden Genomen in derselben Reihenfolge wie in der genetischen Karte von Roggen angeordnet (**Abbildung 16**).

Dieselbe Reihenfolge der Marker wurde in *Triticum dicoccoides* auf den Chromosomen 4B und 5A beobachtet (**Tabelle 13, Abbildung 16**). Auf Chromosom 5A wird das Intervall durch die Gene *TRIDC5AG076830* und *TRIDC5AG076970* (verankert mit *tcos4366* bzw. *MACE2*) definiert und umfasst elf Gene. Auf dem langen Arm von Chromosom 4B sind 42 Gene im Intervall, das durch die Gene *TRIDC4BG061770* und *TRIDC4BG06240042* (verankert mit *tcos4366* bzw. *MACE2*) eingegrenzt wird, vorhanden. Das gesamte orthologe Segment auf Chromosom 5A umfasst 3,75 Mbp und auf Chromosom 4B 0,95 Mbp. Im Brotweizen konnten orthologe *Ddw1*-Segmente auf den langen Armen der Chromosomen 4B und 5A identifiziert werden (**Tabelle 13, Abbildung 17, Abbildung 19**). Die Marker *c26102* und *c15679* definieren einen 0,84 Mbp Abschnitt auf Chromosom 5A, der innerhalb eines 11,21 Mbp langen Intervalls verortet ist, in dem das GA-sensitive Kurzstrohgen *Rht12* liegt (Sun et al. 2019). Dieser Abschnitt zeichnet sich im Vergleich zum Roggen durch Kollinearität auf dem Mikroniveau aus (**Abbildung 17**). Dort befinden sich sechs Gene, unter anderem *TraesCS5A02G543000*, das eine UDP-Glykosyltransferase (UGT) kodiert und das Gen *TraesCS5A02G543100* für die GA2-Oxidase. In *Triticum urartu* wurde in dem Zielintervall auch ein als UDP-Glykosyltransferase (UGT) annotiertes Genmodell (*TRIUR3_06904*), sowie ein als GA2-Oxidase annotiertes Genmodell (*TRIUR3_06906*) beschrieben.

Ähnlich ist die Situation in *Triticum dicoccoides*, wo mit *TRIDC5AG076840* auf Chromosom 5A ein UDP-Gen im orthologen *Ddw1*-Intervall liegt. Wie zuvor beschrieben, sind die Gene für UGT und *GA2ox* in den Halmen des kurzstrohigen und des normalstrohigen Roggengenotyps differentiell exprimiert. Der orthologe Bereich auf Chromosom 4B in Brotweizen, definiert durch *tcos4366* und *MACE2*, umfasst 3,24 Mbp und schließt 51 Gene ein. Dieser Abschnitt ist durch eine Inversion mit mindestens 1,27 Mbp proximal von *Ddw1* gekennzeichnet. Darin befinden sich 15 Gene, die in der hochdichten Karte des Roggens zu finden sind (Bauer et al. 2017, **Tabelle A 5**). Der Vergleich der *Lo7* Roggencontigs mit Gerste zeigte, dass *Lo7 contig 1369736*, *Lo7 contig 1347967* und *Lo7 contig 1385814* auf 4H verortet sind. Die Kollinearität wird durch *Lo7 contig 2880798* und *Lo7 contig 233128*, die beide auf 7H lokalisiert

wurden, unterbrochen (**Tabelle 14**). Aus diesem Grund wurde Gerste als Modell nicht näher in Betracht gezogen.

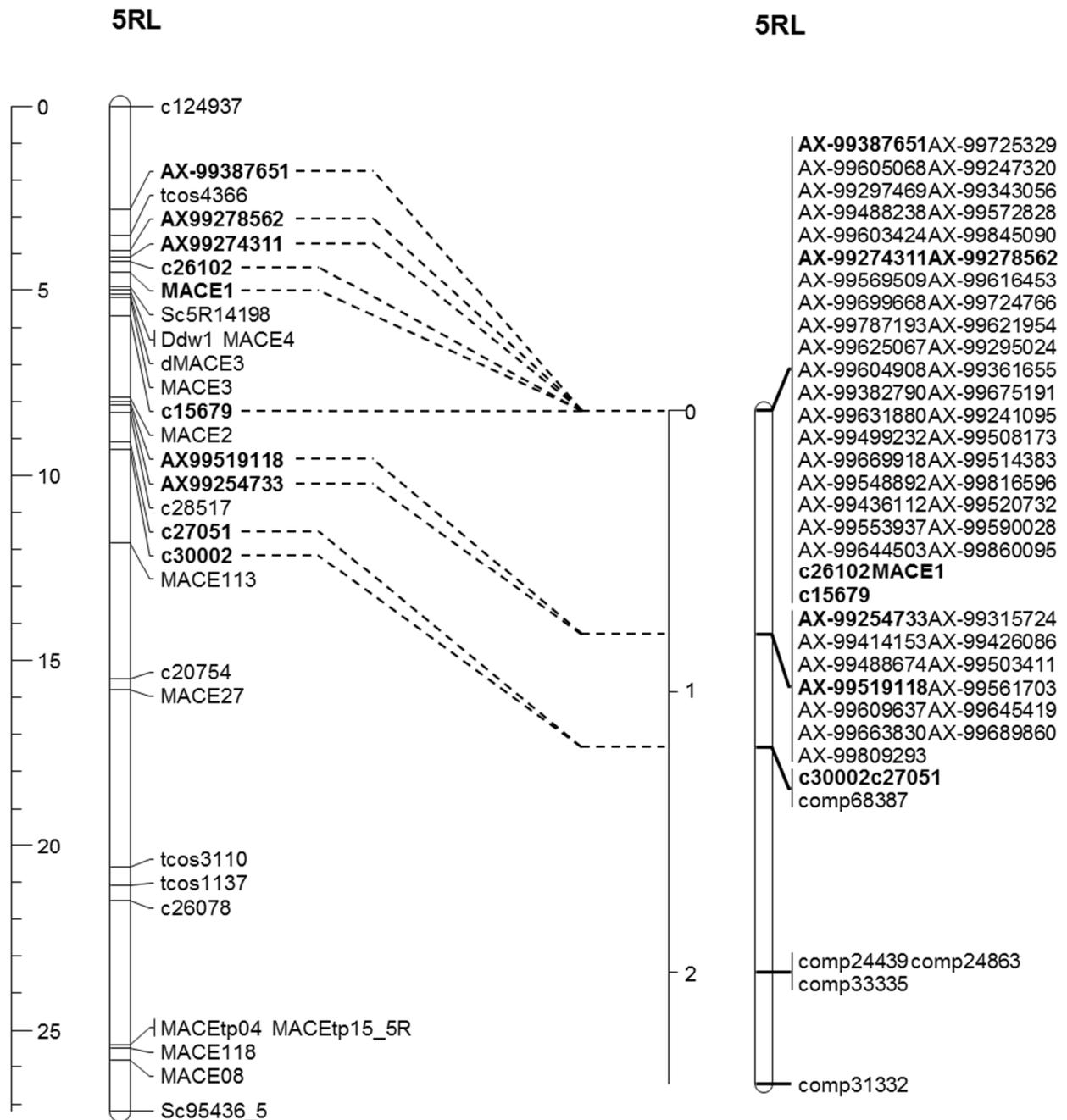


Abbildung 15 Kartierung von *Ddw1* auf Chromosom 5RL in *R1620 x R347/1* (linke Karte) und der Zielbereich in der hochdichten Karte *Lo7 x Lo225*^a des Roggengenoms (rechte Karte). In beiden Karten (adaptiert aus Braun et al. 2019) kartierte Marker sind fettgedruckt hervorgehoben. *comp68387*, *comp24439*, *comp24863*, *comp33335* und *comp31332* repräsentieren differentiell exprimierte Gene zwischen dem kurstrohigen und normalstrohigen *Ddw1*-Genotyp.

^a Ressource: Bauer et al. (2017)

Tabelle 13 Vergleichende Kartierung der *Ddw1*-Marker in *Aegilops tauschii*, *Triticum urartu*, Emmer (*Triticum dicoccoides*) und Weizen (*Triticum aestivum*). Das Chromosom ist, falls bekannt, hinter dem jeweiligen Genmodell angegeben.

Marker	<i>Aegilops tauschii</i> ^a	<i>Aegilops tauschii</i> (v.4) ^b	<i>Triticum urartu</i> ^c	<i>Triticum dicoccoides</i> [Chromosom] ^d	Weizen [Chromosom] ^e
c26102	EMT04361 [4D]	AET4Gv20852600 [4D]	TRIUR3_06902 [4AL4-0.80-1.00]	TRIDC4BG061770 [4B]	TraesCS4B02G371400 [4B] TraesCS4D02G366000 [4D] TraesCS5A02G542900 [5A]
MACE1		AET4Gv20852800 [4D]		TRIDC4BG061770 [4B]	TraesCS4D02G366000 [4D]
tcos4366	EMT04362 [4D]	AET4Gv20852800 [4D]	TRIUR3_06903 [4AL4-0.80-1.00]	TRIDC4BG061770 [4B] TRIDC5AG076830 [5A]	TraesCS4B02G371300 [4B]
MACE3	EMT11481 [4D]	AET4Gv20853600 [4D]	TRIUR3_06906 [4AL4-0.80-1.00]	TRIDC4BG062370 [4B] TRIDC5AG076930 [5A]	TraesCS4B02G376200 [4B] TraesCS5A02G543100 [5A]
MACE4					
dMACE3					
dMACE3_2					
Sc5R14198	EMT14198				
c15679	EMT10608	AET4Gv20853800 [4D]	TRIUR3_25311 [4AL4-0.80-1.00]	TRIDC4BG062380 [4B] TRIDC5AG076940 [5A]	TraesCS4B02G376300 [4B] TraesCS5A02G543200 [5A]
c103925	EMT10609	AET4Gv20853900 [4D]	TRIUR3_25310 [4AL4-0.80-1.00]	TRIDC4BG062390 [4B] TRIDC5AG076960 [5A]	TraesCS4B02G376400 [4B] TraesCS5A02G543300 [5A]
MACE2		AET4Gv20854100 [4D]		TRIDC4BG062400 [4B] TRIDC5AG076970 [5A]	TraesCS4B02G376500 [4B]
c27051	EMT00548	AET4Gv20855800 [4D]	TRIUR3_03143 [4AL4-0.80-1.00]		TraesCS4B02G378700 [4B] TraesCS5A02G544900 [5A]
c30002	EMT00459	AET4Gv20855900 [4D]	TRIUR3_03144 [4AL4-0.80-1.00]		TraesCS4B02G378800 [4B] TraesCS5A02G544800 [5A]
c28517	EMT10610 [4D]			TRIDC4BG062400 [4B] TRIDC5AG076970 [5A]	TraesCS4B02G376500 [4B] TraesCS5A02G543400 [5A]

^a Jia et al. (2013), ^b Luo et al. (2017), ^c Ling et al. (2013), ^d Avni et al. (2017), ^e Appels et al. (2018)

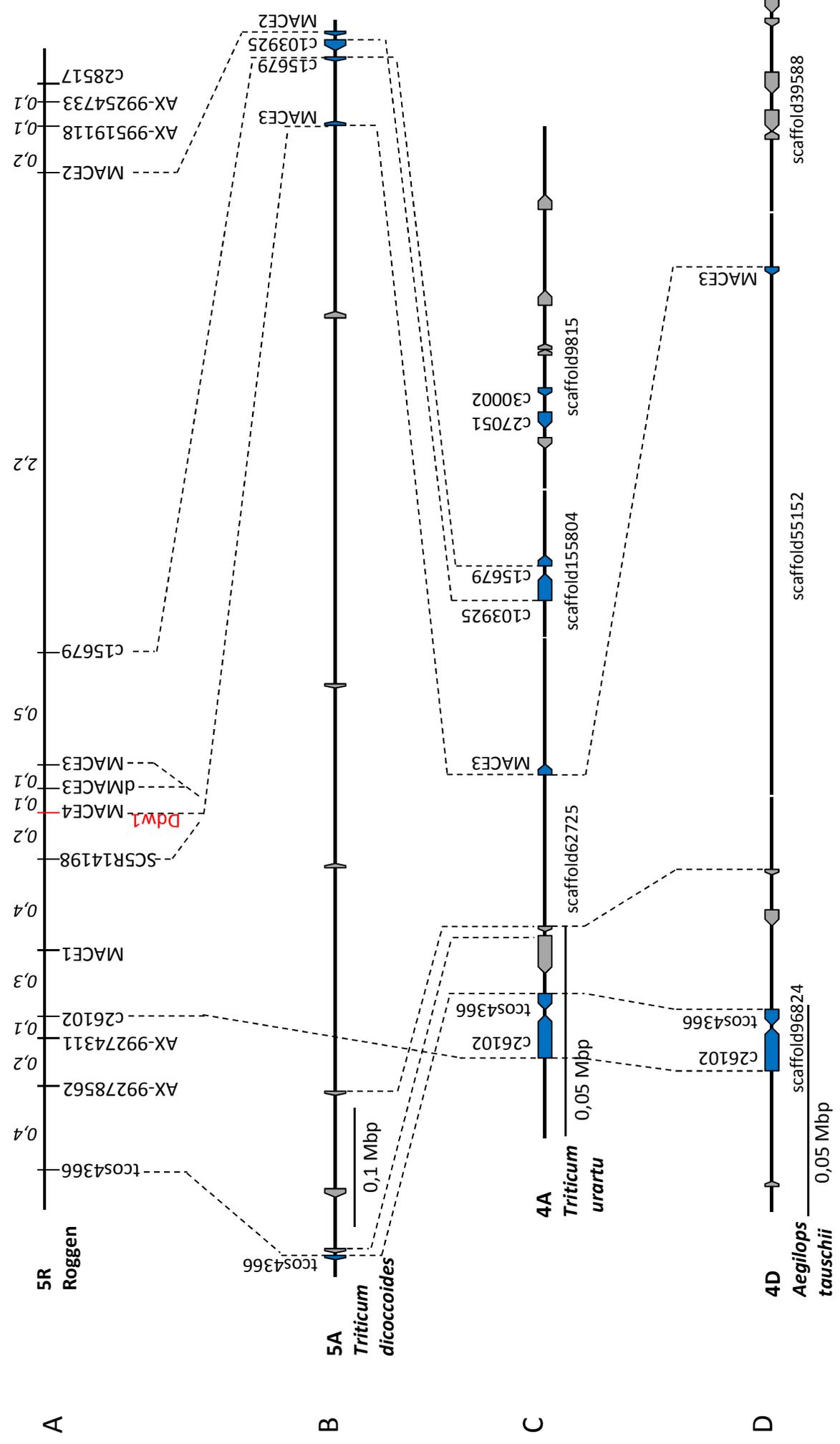


Abbildung 16 Vergleichende Kartierung von *Ddw1* im Roggen, *Triticum dicoccoides*, *Triticum urartu* und *Aegilops tauschii*.

(A) Ausschnitt aus der Kopplungskarte auf Chromosom 5R mit dem morphologischen Marker für das Gen *Ddw1*. Diese basiert auf 685 F_{4:5}-Nachkommen, die aus der Kreuzung 'R1620' x R347/1' hervorgingen. Die Abstände zwischen den Markern sind in der Einheit centiMorgan (cM) angegeben. (B) Integration der *Ddw1*-Marker auf Chromosom 5A in *Triticum dicoccoides*. Das Intervall zwischen *tcos4366* und *MACE2* misst in *Triticum dicoccoides* 0,95 Mbp, wobei der Abstand zwischen *MACE3* und *c15679* 0,048 Mbp einschließt. (C) Die Position des orthologen Bereichs von *Ddw1* auf Chromosom 4A in *Triticum urartu* wird durch die flankierenden Marker *c26102* und *c30002* angezeigt. Dieses Segment erstreckt sich über 0,24 Mbp (D) Integration der *Ddw1*-Marker auf Chromosom 4D in *Aegilops tauschii* in einem 0,42 Mbp Abschnitt. Die *Ddw1*-distalen Marker *c15679*, *c103925* und *MACE2* sind nicht in der genetischen Karte von *Aegilops tauschii* präsent. Durch *Ddw1*-Marker repräsentierte orthologe Gene sind blau hervorgehoben. Orthologe Beziehungen sind durch gestrichelte Linien dargestellt.

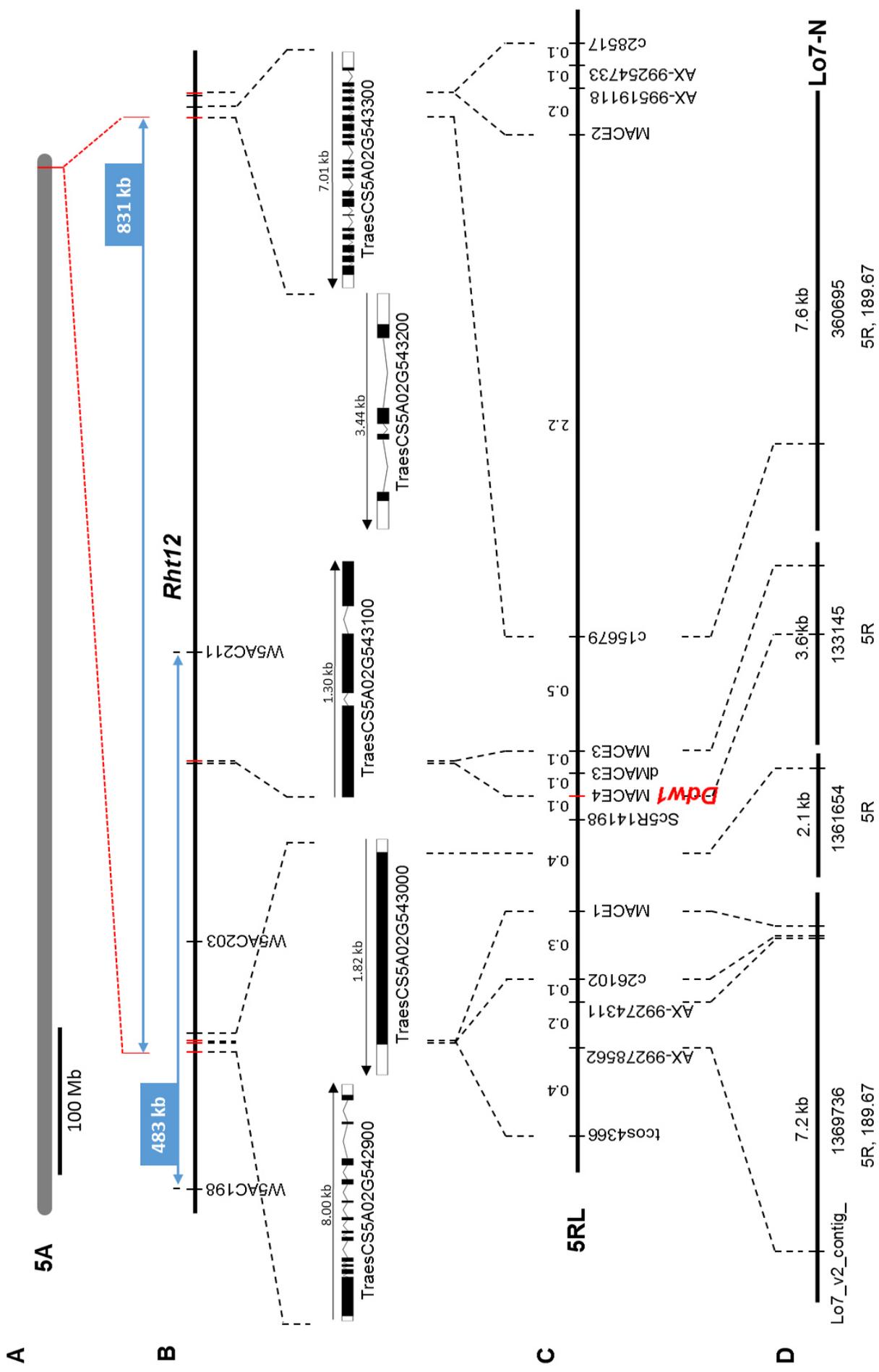


Abbildung 17 Vergleichende Kartierung von *Ddw1* im Roggen und *Rht12* im Weizen (aus Braun et al. 2019).

(A) Die Position des orthologen Bereichs von *Ddw1* auf Chromosom 5A im Weizen wird durch die flankierenden Marker *c26102* und *c15697* angezeigt und ist rot dargestellt. (B) Integration der *Ddw1*-Marker (rot hervorgehoben) im *Rht12* Intervall. Die Orientierung, Länge und Bezeichnung der fünf vorhergesagten Genmodelle in dem 0,83 Mbp-Zielintervall ist darunter abgebildet. (C) Ausschnitt aus der Kopplungskarte auf Chromosom 5R mit dem morphologischen Marker für das Gen *Ddw1*. Diese basiert auf 685 F_{4:5}-Nachkommen, die aus der Kreuzung 'R1620' x R347/1' hervorgingen. Die Markerpositionen sind in centiMorgan (cM) angegeben. (D) Integration des *Ddw1*-Locus in dem Entwurf der Genomreferenzsequenz des Roggens. Die Länge und die Positionsangaben der einzelnen Lo7-Roggen genomcontigs sind angegeben. Die Positionen der Contigs sind in der Einheit cM angegeben. Die zwischen den einzelnen Karten gemeinsamen Marker sind mit gestrichelten Linien verbunden.

3.5.4. Der *Ddw1* Locus in der hochdichten Karte des Roggengenoms

Durch die Nutzung der hochdichten Karte des Roggens konnten mittels der bereits entwickelten Marker SNP-Marker identifiziert werden und zur Feinkartierung von *Ddw1* verwendet werden. Mit den Markern *AX-99387651*, *AX-99278562*, *AX-99274311*, *AX-99519118* und *AX-99254733* wurde ein 5,4 cM Intervall in der genetischen Karte auf 5RL abgedeckt (**Abbildung 15**). Dieses Intervall entspricht 1,19 cM in der hochdichten Roggenkarte *Lo7 x Lo225* (**Tabelle 14**). Diese Marker bestätigten die genetische Kartierung von *Ddw1* in der hochdichten Karte an der Position 189,67 cM, die durch die flankierenden Marker *c26102* und *c15679* vorgeschlagen wurde.

Tabelle 14 Zielintervall für das Dominante Kurzstrohgen *Ddw1* in der hochdichten Karte *Lo7 x Lo225*^a des Roggens.

Lo7-Contig	Lo7-Genmodel	Chr.	Position (cM)	<i>Ddw1</i> -Marker
<i>Lo7_v2_contig_1369736</i>	<i>Sc5Loc00341140.5</i>	5R	189,672296	<i>c26102</i> , <i>MACE1</i> , <i>AX-99278562</i> , <i>AX-99274311</i>
<i>Lo7_v2_contig_263817</i>		5R	189,672296	
<i>Lo7_v2_contig_2870544</i>		5R	189,672296	<i>AX-99387651</i>
<i>Lo7_v2_contig_2880622</i>		5R	189,672296	
<i>Lo7_v2_contig_2880798</i>		5R	189,672296	
<i>Lo7_v2_contig_2896561</i>		5R	189,672296	
<i>Lo7_v2_contig_360695</i>	<i>Sc5Loc01726733.4</i>	5R	189,672296	<i>c15679</i>
<i>Lo7_v2_contig_1345025</i>	<i>Sc5Loc00144795.3</i>	5R	190,466013	<i>c103925</i> , <i>AX-99519118</i> , <i>AX-99254733</i>
<i>Lo7_v2_contig_1347967</i>	<i>Sc5Loc00174477.2</i> <i>Sc5Loc00174478.2</i>	5R	190,859722	<i>c27051</i> , <i>c30002</i>
<i>Lo7_v2_contig_233128</i>		5R	190,859722	
<i>Lo7_v2_contig_1385814</i>	<i>Sc5Loc00422231.2</i>			<i>tcos4366</i>
<i>Lo7_v2_contig_133145</i>	<i>Sc5Loc00129590.1</i>			<i>MACE3</i> , <i>MACE4</i> , <i>dMACE3</i> , <i>dMACE3_2</i>

^a Ressource: Bauer et al. (2017)

3.6. Hochauflösende Kartierung des *Ddw1* Locus im Winterroggen

Um eine höhere Auflösung zu erreichen, erfolgte nach der Feinkartierung die Genotypisierung der hochauflösenden Kartierungspopulation mit den Markern *c26102*, *c28517* und *MACE3* als zentrale Fixpunkte des *Ddw1*-Intervalls. Insgesamt wurden 298 Genotypen als Rekombinante für die Marker *c26102*, *c28517* und *MACE3* identifiziert. Zwischen *Ddw1* und *MACE3* wurden 19 Rekombinationen unter 6834 Gameten entdeckt. Diese Einzelpflanzen wurden mit weiteren eng gekoppelten Markern, das heißt mit *MACE1*, *MACE2*, *MACE4*, *dMACE3*, *dMACE3_2* und *Sc5R14198*, analysiert. Die erneute Phänotypisierung der Nachkommenschaft dieser betreffenden Einzelpflanzen lieferte Daten zur endgültigen Einstufung der Genotypen. Die Ergebnisse wurden bereits im Kapitel 3.1. beschrieben und

zeigten, dass die drei rekombinanten EP 18/1834, 15/2101, 15/2102 bestätigt werden konnten und 16 revidiert wurden (**Tabelle A 4, Abbildung 5**). Mit diesen Daten konnte eine hochauflösende Karte des *Ddw1*-Locus erstellt werden. Dabei wurde ersichtlich, dass im distalen Bereich von *Ddw1* 87 Rekombinationen zu *c28157* beobachtet und somit weitere Marker notwendig wurden.

3.6.1. Markeranreicherung für *Ddw1* über vergleichende Genkartierung im Weizen

Zur Markeranreicherung wurde die Sequenzinformation im orthologen Bereich des Brotweizens genutzt. Um Weizenscaffolds zu identifizieren, wurden die durch Feinkartierung als am engsten gekoppelten Marker *MACE3*, *dMACE3*, *dMACE3_2* und *Sc5R14198*, sowie der absolut gekoppelte Marker *MACE4* zur Suche gegen das TGACv1 *whole genome shotgun assembly* verwendet. Als Treffer wurden drei Scaffolds der Weizenchromosomen 4BL (*TGACv1_scaffold_320553_4BL*), 4DL (*TGACv1_scaffold_343668_4DL*) und 5AL (*TGACv1_scaffold_373973_5AL*) (Mayer et al. 2014) ermittelt. Diese Scaffolds ergaben ebenfalls signifikante Treffer für die genomischen WCA *shotgun*-Sequenzen von Chromosom 5R (Martis et al. 2013). Durch bioinformatische Vorhersage (Stanke et al. 2008) konnten auf dem 4BL-Scaffold (187,8 kb) 20, auf dem Chromosom 4DL-Scaffold (69,7 kb) neun und auf dem Chromosom 5AL-Scaffold (301,4 kb) 44 Genmodelle vorhergesagt werden. Mit den kodierenden Sequenzen (**Tabelle A 15**) konnten Roggencontigs der MACE-Analysen und des 5 k-Arrays identifiziert und zur Markerentwicklung genutzt werden. Auf dem Chromosom 4BL-Scaffold wurde *MACE3* mit Gen-8, das dem Weizengen *TraesCS4B02G376200* entsprach, und *c28517* mit Gen-13, das Ähnlichkeit zu *TraesCS4B02G376500* aufwies, verankert. Mit Gen-9 konnte kein *Ddw1*-Marker verankert werden und eine Ähnlichkeitssuche zeigte, dass dieses prognostizierte Gen nicht im Zielintervall von Chromosom 4B vorhanden ist, sondern *TraesCS7B02G495500* ähnelte. Dahingegen erzielte Gen-10 einen Treffer zu *TraesCS4B02G376300* und Gen-11 zu *TraesCS4B02G376400*. Diese Gene und deren Orthologe in *Aegilops tauschii*, *Triticum urartu* und *Triticum dicoccoides* waren bereits vorher in den jeweiligen orthologen Zielintervallen verortet worden (**Tabelle 13, Abbildung 16**). Die restlichen Genmodelle schieden auch als potentielle Kandidatengene aus, da sie Ähnlichkeit zu verschiedenen repetitiven Elementen aufwiesen. Auf den Scaffolds der Chromosomen 4DL und 5AL konnte bis auf *MACE3* kein weiterer Marker verankert werden. In Folge wurden Intron-überspannende Primer für die auf dem Chromosom 4BL-Scaffold vorgesagten kodierenden Sequenzen Gen-9, Gen-10 und Gen-11 abgeleitet. Zwei Marker, die von Gen-11 auf Chromosom 4BL abgeleitet wurden (*c103925*, *c80538*), detektierten einen genetischen Polymorphismus zwischen den beiden *Ddw1*-NIB (**Tabelle A 12**). Durch Genotypisierung der 298 rekombinanten Einzelpflanzen der hochauflösenden Kartierungspopulation konnte nachgewiesen werden, dass *c103925* mit *Ddw1* gekoppelt ist und distal des Gens 77 Rekombinationen gezählt werden konnten (**Abbildung 18**). Der Marker *c103925* reduzierte das orthologe, distal von *Ddw1* gelegene, Intervall im Weizen B-Genom von vormals 49,8 kb

(zwischen *MACE3* und *c28517*) auf 30,8 kb (zwischen *MACE3* und *c103925*). Mit Hilfe des prognostizierten Gen-10 auf Chromosom 4B konnte ebenfalls der neue Marker *c15679* entwickelt und distal von *Ddw1* kartiert werden. Dieser reduzierte das Intervall zu *MACE3* auf 20,2 kb. Beide Marker zeigten, dass in diesem sub-genomischen Bereich Makro- und Mikrokollinearität nicht nur zwischen Roggen, *Triticum dicoccoides*, *Aegilops tauschii* und *Triticum urartu* (**Abbildung 16**), sondern auch zwischen Roggen und Weizen besteht (**Abbildung 17**). Dieser Befund konnte durch die inzwischen bekannte Weizenreferenzsequenz (Appels et al. 2018) bestätigt werden. Durch die Verankerung der *Ddw1*-Marker konnte auf Chromosom 4B zwischen *c26102* und *c15679* ein Zielbereich von 3,19 Mbp definiert werden. Der orthologe Bereich auf Chromosom 5A erstreckt sich auf einen 0,84 Mbp großen Bereich, der durch die flankierenden Marker *c26102* und *c15679* eingegrenzt wird (**Abbildung 19**).

In der physikalischen Sequenz von *Aegilops tauschii* befinden sich zwischen *MACE1* und *MACE3* fünf Genmodelle, die bislang nicht mit Markern adressiert wurden (**Tabelle A 14**). Alle fünf zeigen Ähnlichkeit zu unkartierten Genmodellen der Roggengenomsequenz: *AET4Gv20852900* zu *Sc5Loc01745623.1*, *AET4Gv20853000* zu *Sc7Loc01758524.1*, *AET4Gv20853100* zu *Sc5Loc01925280.2*, *AET4Gv20853200* zu *Sc5Loc01486204.1* und *Sc5Loc01921734.1*. In **Abbildung 16** ist erkennbar, dass orthologe Beziehungen zwischen *Triticum urartu* und *Aegilops tauschii* bestehen. Beim Versuch Genbasierte Marker für die Gene *EMT04363*, *EMT04364* (ortholog zu *TRIUR3_06905*) und *EMT21439* zu etablieren, wurden keine Polymorphismen gefunden, was bereits im Abschnitt 3.4.1. beschrieben wurde. Das Gen *AET4Gv20853400* hat in *Triticum urartu* kein orthologes Gen und in der genetischen Karte von *Aegilops tauschii* kein Äquivalent. Der Vergleich dieses Gens mit der Roggengenomsequenz zeigte Ähnlichkeit zu dem Genmodell *Sc2Loc00107640.3*, das als *flowering locus t-like protein* annotiert wurde (Bauer et al. 2017).

Durch die Verankerung der *Ddw1*-Marker im Weizengenom wird erkennbar (**Abbildung 17**, **Abbildung 19**), dass die Gene auf dem langen Arm von Chromosom 4B, die durch *MACE3*, *c15679*, *c103925* und *MACE2* repräsentiert werden, sukzessive aufeinander folgen (**Tabelle 13**). Auf dem langen Arm von Chromosom 5A sind *MACE3*, *c15679*, *c103925* und *MACE2* direkt aufeinanderfolgend durch *TraesCS5A02G543100* bis *TraesCS5A02G543400* verankert. Die im Weizen und *Aegilops tauschii* gemachte Beobachtung der direkten Aufeinanderfolge der Gene, die mit *MACE3*, *c15679*, *c103925* und *MACE2* verankert sind, wird in *Triticum dicoccoides* bestätigt. Sowohl auf Chromosom 4B als auch Chromosom 5A sind weitere Gene vorhanden, die bislang nicht mit *Ddw1*-Markern verankert wurden. Ähnlich wie im Weizen, wo sich zwischen *c26102* und *MACE3* 42 Gene befinden, sind in *Triticum dicoccoides* auf Chromosom 4B 36 Gene präsent, während es auf Chromosom 5A sechs Gene sind. Diese sechs entsprechen zum Teil den Genen, die im Intervall zwischen *MACE1* und *MACE3* in *Aegilops tauschii* zuvor beschrieben wurden. So zeigt *TRIDC5AG076850* Ähnlichkeit zu *Sc7Loc01758524.1*,

TRIDC5AG076860 zu *Sc5Loc01925280.2* und *TRIDC5AG076910* zu *Sc2Loc00107640.3*, das distal am nächsten zu *MACE4* liegt. Wie im Weizen, ist in *Triticum dicoccoides* mit *TRIDC5AG076840* auf Chromosom 5A ein UDP-Gen im orthologen *Ddw1*-Abschnitt präsent, wobei es sich am proximalen Ende des *Ddw1*-Intervalls befindet.

3.6.2. Hochauflösende Karte des *Ddw1*-Locus in der *R1620 x R347/1* F_{5:6}-Population

Die *Lo7*-Genomsequenz des Roggens und der damit veröffentlichte 600 k-Array eröffnete neue Perspektiven zur Integration von Markern in die hochauflösende Karte von *Ddw1*. Nach der gegenwärtigen Version der hochauflösenden Karte mit drei proximalen und 42 distalen Rekombinationen lässt sich ein 35,3 kb langes Intervall beschreiben, das durch die Marker *MACE3* und *c15679* definiert wird (**Abbildung 18**). Dieses Intervall misst im Weizen auf Chromosom 5AL 582,2 kb und auf Chromosom 4BL 20,7 kb. In diesem Intervall befinden sich, auf neun Contigs verteilt, 42 sogenannte *Poly High Resolution* SNPs des 600 k-Arrays. Dort wurden ferner zwei Genmodelle analog zu den Genen, die auf Grundlage des Chromosom 4BL-Scaffolds vorhergesagt wurden, prognostiziert. Diese Gene konnten mit *c15679* und *c103925* adressiert werden. Ebenso wie in der physikalischen Sequenz von *Aegilops tauschii* liegt in der Roggensequenz kein weiteres Genmodell distal von *Ddw1* vor. Fünf SNP-Marker des Roggenarrays konnten bereits in der genetischen Feinkartierung in die Karte integriert werden. Der in der Feinkartierung mit *Ddw1* absolut gekoppelte Marker *MACE4* wies in der hochauflösenden Karte von *Ddw1* proximal vier Rekombinationen auf. Der Marker *MACE3* zeigte hingegen proximal drei Rekombinationen. Das dazugehörige Genmodell *Sc5Loc00129590.1* auf dem *Lo7 Contig 133145* ist nicht im Intervall des Referenzgenoms *Lo7 x Lo225* abgebildet und wurde dort auch keinem Roggenchromosom zugeordnet.

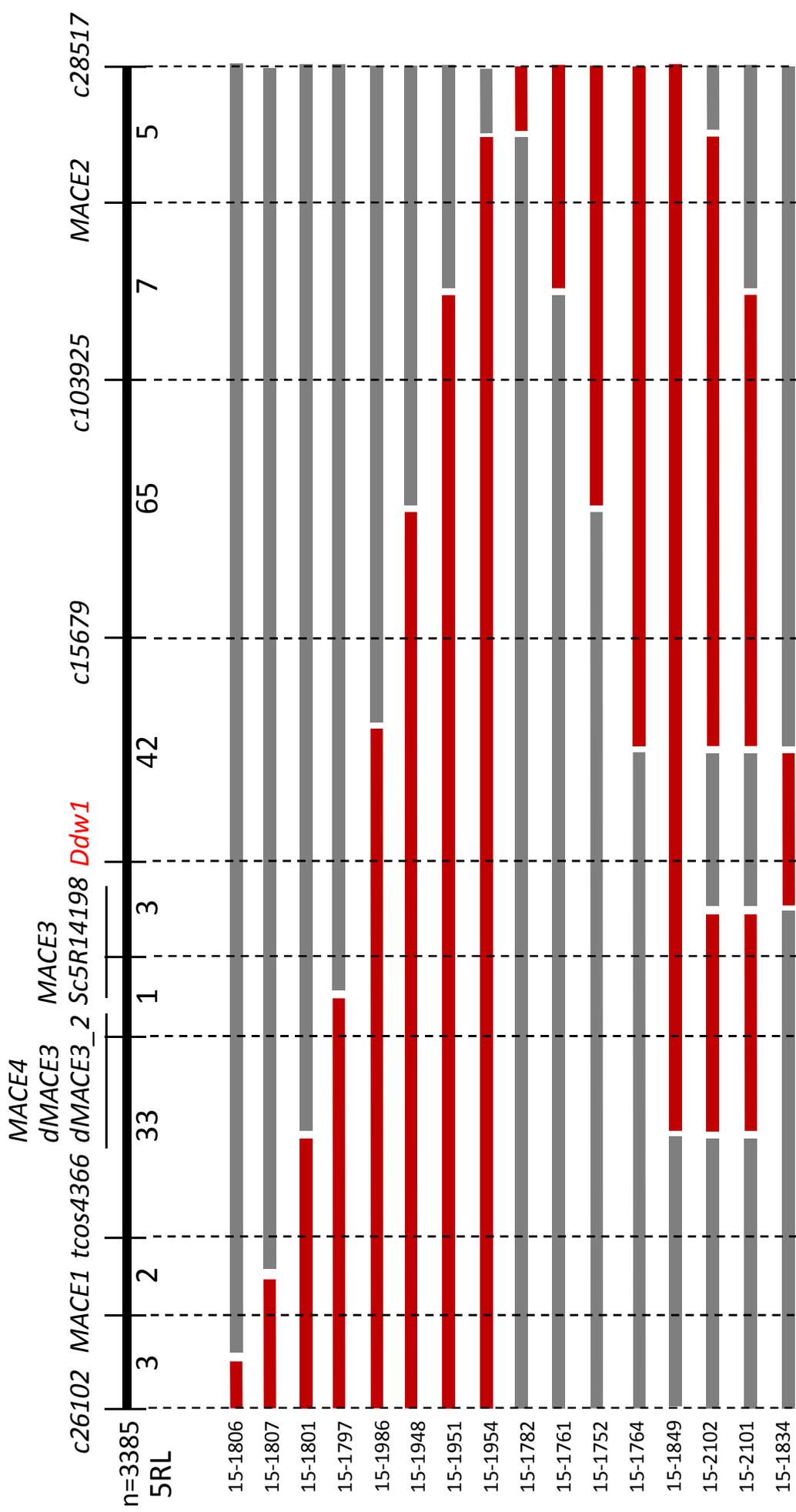


Abbildung 18: Hochauflösende Karte des Gens *Ddw1* auf Chromosom 5R im Roggen.

Die Karte basiert auf 3385 Genotypen der $F_{5,6}$ -Population, die von der Kreuzung 'R1620' x 'R347/1' abstammen. Die Zahl unter der Karte zeigt die Anzahl der beobachteten Rekombinationen. Unter der Karte sind beispielhafte Genotypen abgebildet, die alle Versionen rekombinanter Genotypen darstellen. Diese sind mit einer Ziffernabkürzung auf der linken Seite benannt. Die Genotypen und Phänotypen der Halbzeuge sind rot dargestellt und die normalstrophigen grau.

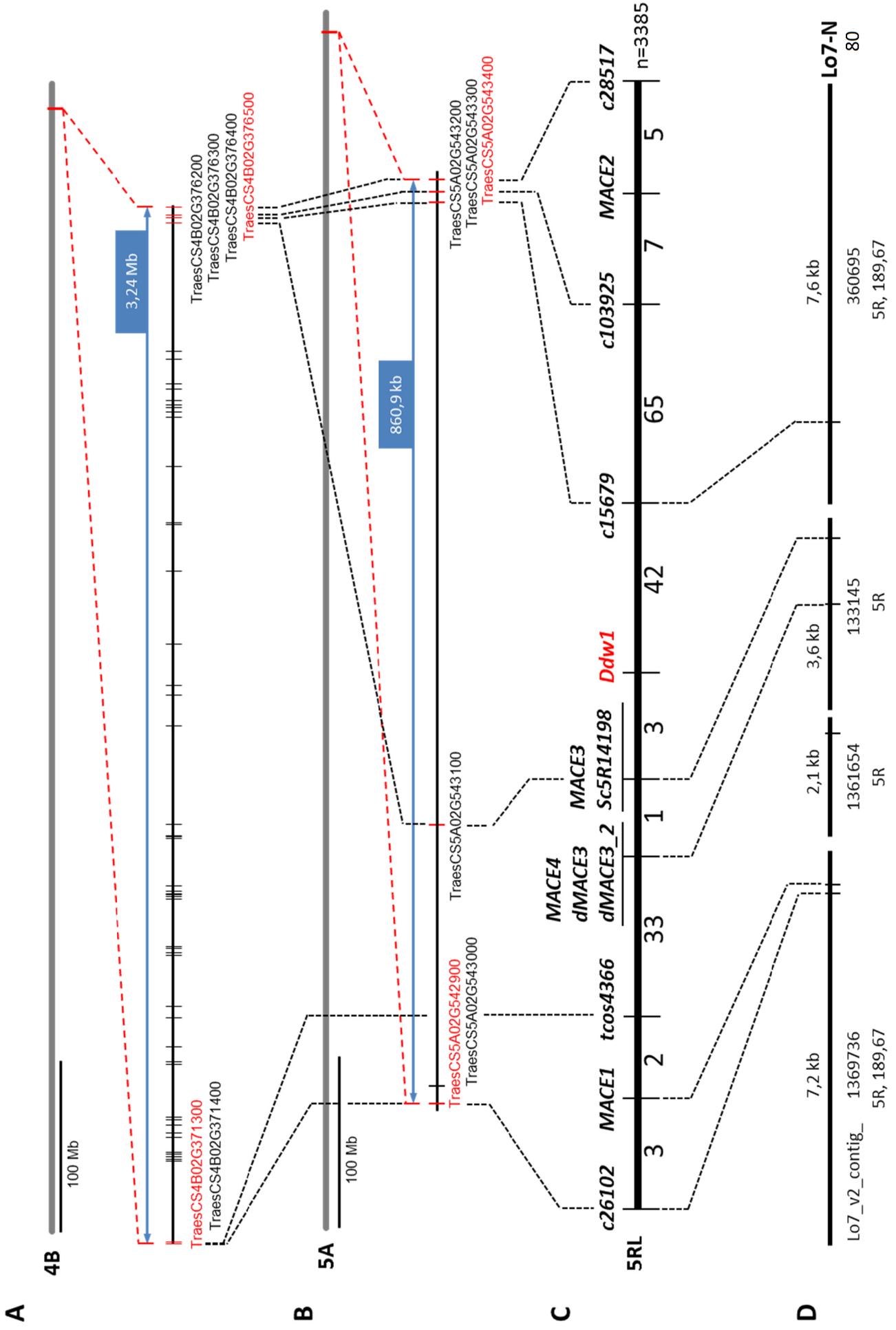


Abbildung 19 Hochauflösende Karte des *Ddw1* Locus auf Chromosom 5R im Roggen und dessen orthologe Bereiche im Weizen.

(A) Position des orthologen Zielintervalls (3,24 Mbp) von *Ddw1* auf Chromosom 4B im Weizengenom. (B) Position des orthologen Zielintervalls (0,86 Mbp) von *Ddw1* auf Chromosom 5A im Weizengenom. Die mit Markern verankerten Gene sind darunter angezeigt. Die Gene sind schematisch als Querstrich abgebildet, wobei die mit Markern verankerten Gene darunter angezeigt sind. Die rot eingefärbten Gene markieren die Intervallgrenze. (C) Hochauflösende Karte des *Ddw1* Locus auf dem langen Arm des Chromosoms 5R im Roggen. Die Karte basiert auf 3385 Genotypen der $F_{6;7}$ -Population, die von der Kreuzung 'R1620' x 'R347/1' abstammen. Die Zahl unter der Karte zeigt die Anzahl der beobachteten Rekombinationen. (D) Integration des *Ddw1*-Locus im Entwurf der Genomreferenzsequenz des Roggens. Die Länge und die Positionsangaben der einzelnen *Lo7*-Roggencontigs sind angegeben. Die Positionen der Contigs sind in der Einheit cM angegeben. Die zwischen den einzelnen Karten gemeinsamen Marker sind mit gestrichelten Linien verbunden.

4. DISKUSSION

4.1. Analyse der Wuchshöhe des *Dominant dwarfing gene Ddw1*

Das *Dominant dwarfing gene 1 (Ddw1)* gilt als das bekannteste Kurzstrohgen des Roggens. Der Phänotyp der Mutante ist durch eine reduzierte Wuchshöhe, eine verzögerte Blüte sowie ein reduziertes TKG gekennzeichnet (Börner et al. 2000). In der vorliegenden Arbeit wurden zum ersten Mal im großen Maßstab *Ddw1*-Einzelpflanzen, die von einer unabhängigen F_1 -Pflanze aus derselben Kreuzung wie die von Korzun et al. (1996) verwendeten F_2 -Population abstammten, hinsichtlich Wuchshöhe und TKG untersucht. Das beobachtete 3:1 Spaltungsverhältnis wich weder in der $F_{4:5}$ - (Braun et al. 2019), noch in der $F_{5:6}$ -Population (**Abbildung 3**), von den Ergebnissen früherer Studien ab und bestätigte die dominante Vererbung eines einzelnen Gens (Korzun et al. 1996; Tenhola-Roininen und Tanhuanpää 2010). Die molekulare Unterscheidung der homozygoten und heterozygoten Halbzwerge war bislang nicht möglich. Dies hatte die Konsequenz, dass dieses Gen in der Roggenzüchtung wenig verwendet wurde. In der Folge konnte das rezessive Allel, das für den normalstrohigen Phänotyp verantwortlich ist, in Populationsorten nicht durch Marker bereinigt werden (McLeod et al. 2000; Tenhola-Roininen und Tanhuanpää 2010).

Durch die Verfügbarkeit von codominanten Markern wurde es nun möglich, die Wirkung von *Ddw1* auf das Merkmal Wuchshöhe zwischen den drei Genotypen (die beiden homozygoten und den heterozygoten) zu vergleichen. Dadurch konnte gezeigt werden, dass trotz des Unterschiedes von 5,5 cm zwischen den heterozygoten und homozygoten Halbzwerge, die Mittelwerte der drei Genotypen als signifikant verschieden eingestuft wurden. Dennoch ist aus den Daten ersichtlich, dass der heterozygote Halbzweig nicht intermediär zwischen den homozygoten Genotypen liegt, sondern näher am homozygoten Halbzweig (**Abbildung 4, Tabelle 5, Tabelle 6**). Deshalb kann konstatiert werden, dass das dominante Allel den Effekt des rezessiven deutlich maskiert, aber *Ddw1* nicht vollständig dominant wirkt. Die Dimension des Effektes wurde durch diese Studie erstmalig offenkundig und ermöglicht Vergleiche zur prozentualen Verkürzung des Halms durch andere Kurzstrohgene in anderen Getreidearten. So wurde im Weizen der Effekt mehrerer *Rht*-Gene untersucht, wobei eine für jedes Gen spezifische Verkürzung und große Bandbreite festgestellt wurden. Beispielsweise reduziert *Rht4* die Wuchshöhe um 17 % und *Rht12* um 45 %, während für *Rht13* eine Reduktion um 37 % beobachtet wurde (Rebetzke et al. 2012). Die prozentuale Reduktion durch *Rht13* ist vergleichbar mit der Wirkung von *Ddw1*.

Neben der Auswirkung der *Ddw1*-Genotypen auf die Wuchshöhe konnte durch Einsatz der neuen codominanten Marker die Wirkung von *Ddw1* auf das TKG untersucht werden. Die Ergebnisse zeigten,

dass ein negativer Zusammenhang zwischen der Kurzstrohigkeit und dem TKG vorliegt (**Abbildung 5, Tabelle 5, Tabelle 6**). Diese Beobachtung stimmt damit mit den Experimenten einer QTL-Studie zu *Ddw1* überein, in der signifikante Korrelationskoeffizienten zwischen TKG und Wuchshöhe berechnet wurden (Börner et al. 2000). Ein negativer Zusammenhang zwischen Kurzstrohigkeit und dem Korngewicht wurde ebenso für *Rht*-Gene im Weizen berichtet (Rebetzke et al. 2012). Bei den meisten dieser Kurzstrohgene wurde das reduzierte Korngewicht durch eine erhöhte Kornanzahl kompensiert. Weiterhin wurden diese Kurzstrohgene generell mit einem signifikant höheren Kornertrag assoziiert, der mit einem gesteigerten Ernteindex und einer höheren Gesamtbiomasse begründet war. Die agronomische Leistung ist der Schlüsselfaktor bei der Bewertung eines Allels, wenn es um dessen Verwertbarkeit in der Züchtung geht. Für *Ddw1* gibt es bislang Erkenntnisse aus der züchterischen Praxis die belegen, dass der Kornertrag nicht negativ beeinträchtigt ist. Die zwei auf *Ddw1*-basierenden kurstrohigen Populationssorten *Talovskaya 12* und *Talovskaya 15*, gezüchtet für die durch Trockenstress geprägte Schwarzerde-Region in Zentralrussland, erzielten einen Ertragszuwachs von 15-20 % und eine gesteigerte Lagerstabilität von 35-40 % (Torop et al. 2003). Zwar zeigte in der kanadischen Prärie von Saskatchewan die kurzstrohige Populationssorte *AC Remington* zu den Vergleichssorten *Kodiak*, *Musketeer*, *Prima* und *AC Rifle* ein vermindertes Korngewicht, jedoch auch einen erhöhten Ertrag (McLeod et al. 2000). In Bezug auf die Züchtung kurzstrohiger Roggenhybride ist anzunehmen, dass diese ein durch *Ddw1* vermindertes TKG durch ihren heterozygoten Genotyp kompensieren. Zweitens ist aus den TKG-Daten der vorliegenden Arbeit ersichtlich, dass unter den heterozygot kurzstrohigen Genotypen auch solche mit hohem TKG vorhanden waren. Eine erste Bestätigung dieser Argumente liefern Hybride, die im Rahmen einer QTL-Studie in sieben Umwelten unter anderem auf Kornertrag und TKG getestet wurden (Hackauf et al. 2017b).

4.2. Erstellung eines Transkriptprofils für *Ddw1*

4.2.1. Vergleich der Expression in verschiedenen Organen der Roggenpflanze

Es existieren bereits Studien zur Kartierung von *Ddw1* in Roggen (Korzun et al. 1996; Tenhola-Roininen und Tanhuanpää 2010). Allerdings gab es bis jetzt keine umfassende Analyse des Expressionsmusters in Pflanzen, die Träger von *Ddw1* sind. Bekannt ist bislang, dass *Ddw1* ein auf GA sensitiv reagierendes Gen ist. Dies wurde anhand des Längenwachstums von Keimlingen nach der Behandlung mit GA₃ gemessen (Börner und Melz 1988). Außerdem ist die *Ddw1*-Mutante mit einem späteren Blütezeitpunkt und einem kürzeren Halm assoziiert (Börner et al. 2000). Wenn man die differentielle Expression des Halbzweggens *sd-1* in Reis betrachtet (Monna et al. 2002), erschien es naheliegend anzunehmen, dass Gene, die für den Unterschied zwischen den normal- und kurzstrohigen Roggenpflanzen verantwortlich sind, ebenso Variation hinsichtlich der Expression aufweisen. Deshalb wurde bei der Datenanalyse angenommen, dass ein Kandidatengen für *Ddw1* die zentrale Komponente

der Wuchshöhenvariation in der untersuchten Kartierungspopulation darstellt, in diesem Genotyp stark exprimiert ist, und somit anhand des Expressionsmusters herausgefiltert werden kann. Die Transkriptome der *Ddw1*-Mutante und des Wildtyps wurden verglichen, um Einzelnukleotid-Polymorphismen zu finden und die Expressionsvariationen zu untersuchen. Nachdem die Verringerung der Halmlänge das charakteristischste äußerliche Merkmal von *Ddw1* ist, wurde daraus abgeleitet, dass diese Eigenschaft unmittelbar durch den Vergleich des Expressionsmusters der normal- und kurzstrohigen Variante beschrieben werden kann. Aus diesem Grund wurde auf das Genexpressionsprofil der Halme besonderes Augenmerk gelegt. Die ebenfalls in der Expressionsanalyse berücksichtigten Wurzeln, Keimblätter, Blätter und Ähren dienten der Erstellung eines Überblicks. Die größten Unterschiede zwischen dem kurz- und normalstrohigen Genotyp wurden im Halm zu Beginn des Schossens und der Blüte, in den Koleoptilen und in den Ähren beobachtet (**Abbildung 8**). Diese Anordnung in der Hauptkomponentenanalyse gab Hinweise auf eine mögliche zeitliche und gewebespezifische Steuerung der Expression von *Ddw1* in den Koleoptilen und auch in den Halmen zu Beginn des Längenwachstums. Die beobachtete Separierung der Expressionsprofile in diesen Geweben spiegelt den Lebenszyklus blühender Pflanzen hinsichtlich des Einflusses von *Ddw1* auf das Längenwachstum und die Entwicklung vom juvenilen zum adulten Stadium wider. Sowohl der Übergang vom vegetativen zum ausgewachsenen, noch nicht produktiven Stadium, als auch zum generativen Stadium werden durch verschiedene Umweltsignale und Gibberelline gesteuert (Bäurle und Dean 2006). Bei Betrachtung der Expressionsprofile wird deutlich, dass die Unterschiede bereits während der Keimung vorhanden sind und während der Verschiebung von der vegetativen Wachstumsphase hin zur reproduktiven Phase im Halm messbar sind. Der unterschiedliche Zeitpunkt, an dem die generative Phase erreicht wird, ist auch aufgrund der unterschiedlichen Expression in der Ähre offensichtlich (Fournier und Andrieu 2000). Das bedeutet, dass Gene, die die Aktivität der Kohlenstoffquelle und Kohlenstoffsenken steuern, einem spezifischen Schema folgen. Es wird angenommen, dass die Bilanz zwischen Assimilationskapazität als Quelle und den Körnern als Senke, in den kurzstrohigen und normalstrohigen Genotypen aufgrund eines unterschiedlichen Assimilattransports in die Ähre zum Zeitpunkt der Blüte zustande kommen. Dies ist in Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass die *Ddw1*-Mutante mit einem späteren Blütezeitpunkt einhergeht (Börner et al. 2000).

4.2.2. Abbildung der Transkriptdaten im Roggengenom

In dieser Studie wurde das an drei Entwicklungsstadien gesammelte Halmmaterial zum Nachweis von differentiell exprimierten Transkripten verwendet (**Abbildung 9, Tabelle A 8**). Der Halm erschien als das ideale Untersuchungsobjekt für das Wachstum von Roggen, da dieses Organ im Gegensatz zur Koleoptile oder Ähre über einen längeren Zeitraum während des Pflanzenwachstums hinweg

beobachtet werden kann. Die Expressionsanalyse bestätigte den in Abschnitt 3.3. erwähnten Unterschied im Halm zu Beginn des Schossens und im Halm zu Beginn der Blüte (**Abbildung 8**). Der im Rahmen der vorliegenden Studie generierte Transkriptdatensatz hat einen Neuigkeitswert für Winterroggen und erweitert das vorhandene Sequenzspektrum. 61,9 % (Haseneyer et al. 2011) bzw. 49,2 % (Khalil et al. 2015) der in dieser Studie erzeugten Transkripte wurden in früher veröffentlichten Transkriptressourcen nicht abgebildet. Dieser Datensatz liefert somit eine Fülle von Informationen für weitere Genexpressionsanalysen, um die Regulationsmechanismen der Halmentwicklung in der *Ddw1*-Mutante aufzudecken. Um sich für die Markerentwicklung auf Transkripte, die möglichst eindeutig auf Chromosom 5R lokalisiert sind zu beschränken, wurde eine Auswahlstrategie durch Abbildung der Transkripte auf genomische Roggensequenzen und andere Gräsergenome angewendet. Die Erstellung von Transkriptomprofilen für den kurz- und normalstrohigen Genotyp war für die effektive Identifizierung von Kandidatengen für *Ddw1* unerlässlich, da die aktuellen genomischen Ressourcen die *Ddw1*-Region nicht detailliert genug darstellen. Darüber hinaus schränkt wie in Abschnitt 3.2.2. beschrieben die gebrochene Kollinearität zwischen Roggen und Gerste in dieser Region die Nutzung der genomischen Ressourcen der Gerste weiter ein (**Tabelle A 5**). Die zusätzliche Nutzung der genomischen Ressourcen trug jedoch wesentlich zur Lokalisierung und Auswahl von DEG und polymorphen Sequenzen auf Chromosom 5RL bei. Die Integration der SNP-tragenden Sequenzen in die hochdichte Karte des Roggens zeigte, dass eine ausgeprägte Sequenzdiversität zwischen den beiden nah-isogenen, normal- und kurzstrohigen Bulks (NIB) aus der Kreuzung *R1620* x *R347/1* am distalen Ende des langen Arms von Chromosom 5R zu beobachten ist (**Abbildung 7**). Dies entspricht der Erwartung, weil beide für die Transkriptomsequenzierung verwendeten NIB phänotypisch und genotypisch ausschließlich im Hinblick auf ihre genetische Disposition am *Ddw1*-Locus auf Chromosom 5RL selektiert worden sind (**Abbildung A 1**). Aufgrund von sechs Selbstungen war eine Restvariation zwischen den NIB zu erwarten. Diese verteilt sich auf alle sieben Roggenchromosomen, wobei eine vermehrte Sequenzvariation auf dem langen Arm von Chromosom 4R beobachtet wurde. Das bedeutet, dass die Verteilung von DEG im Roggen genom auf die genetische Struktur des analysierten Pflanzenmaterials zurückzuführen sein könnte und die genetische Diversität zwischen den RIL über den *Ddw1*-Locus auf Chromosom 5R hinaus widerspiegelt. Eine weitere Erklärung wäre, dass die SNPs auf Chromosom 4R direkt (d.h. über das Gen oder gekoppelte Gene) oder indirekt (trans-Effekte) mit *Ddw1* verbunden sind. Mit anderen Worten, der Phänotyp könnte durch unterschiedliche Expression von Genen hervorgerufen werden. Wie im Abschnitt 3.2.1. beschrieben wurde, konnte für die exemplarisch untersuchten Chromosom 4R-Marker *MACE116* und *MACE153* keine Kopplung mit *Ddw1* festgestellt werden.

Die DEG-Analyse identifizierte Transkripte, die wie die genetische Kartierung zeigte, mit *Ddw1* gekoppelt sind wie z.B. *MACE113*, *MACE110*, *MACETp04*, *MACE3* und *MACE4* (**Abbildung 15**). Durch den experimentellen Ansatz der Genexpressions-Profilierung konnte mit *MACE4* ein co-segregierender Marker von einer DEG-Sequenz abgeleitet werden. Hiermit bestätigte sich die Hypothese, dass der Halm das primäre Zielorgan darstellt, wenn Effekte von *Ddw1* auf die Wuchshöhe untersucht werden sollen. Damit stellt die erwähnte Methode einen sehr effizienten Weg dar, um Gene in einem komplexen Genom, in dem gerade erst genomische Ressourcen entstehen, genau zu kartieren. Ähnliche Erfahrungen mit dem hier vorgestellten Ansatz wurden in anderen Pflanzen berichtet bei denen genetische Kartierung und Transkriptom-Profilierung verwendet wurden, um die Anzahl der einem Locus oder QTL zugrunde liegenden Kandidatengene in kürzerer Zeit zu reduzieren als bei der Verwendung herkömmlicher genetischer Kartierung (Pandit et al. 2010; Ševcikova et al. 2017).

4.2.3. Interpretation der differentiellen Genanalyse in Bezug auf Zwergwuchs

Zwergmutanten sind Pflanzen, die kleiner sind als nicht-mutierte Pflanzen ihrer Spezies. Sie bleiben im ausgewachsenen Zustand kleiner, was auf ein niedrigeres Niveau bioaktiver Wachstumsregulatoren, sehr häufig Gibberelline, oder einer gestörte Weiterleitung und Wahrnehmung der von diesen Substanzen ausgehenden Signale zurückzuführen ist (Hedden und Sponsel 2015). Die Charakterisierung der differentiellen Transkripte zeigte, dass die Genontologien Regulierung der biologischen Qualität (GO:0065008), Regulierung des Hormonspiegels (GO:0010817), Reaktion auf einen endogenen Reiz (GO:0009719), sowie die Reaktion auf ein Hormon (GO:0009725) (Ashburner et al. 2000, The Gene Ontology Consortium 2019) signifikant überrepräsentiert waren (**Tabelle 8, Tabelle A 9, Abbildung 10**). Diese Feststellung erhält dadurch Bedeutung, da Zwergwuchs mit Wachstumsregulatoren zusammenhängt (Hedden und Sponsel 2015). So sind eine Reihe von Genen der GA-Biosynthese oder der GA-Signalübertragung als Ursache des Zwergwuchses bekannt. Einige darunter wurden erfolgreich zur Züchtung von Sorten mit verkürztem Halm verwendet, so zum Beispiel die GA-insensitiven Gene *Rht-B1* und *Rht-D1* im Weizen (Hedden und Sponsel 2015) oder das GA-sensitive Gen *sdw1/denso* in der Gerste (Laurie et al. 2006). *Ddw1* wurde als GA-sensitives Gen eingestuft (Börner und Melz 1988).

Der Zwergwuchs per se von *Ddw1*-Mutanten - die experimentellen Daten dieser Studie zeigen, dass die Wuchshöhe zwischen 33-38 % reduziert war (**Abbildung 4, Tabelle 5, Tabelle 6**), erklärt auch, weshalb bei der Annotation der DEG auch die GO Wachstum (GO:0040007), Entwicklungsprozess (GO:0032502), und Organisation oder Biogenese der Zellwand (GO:0071554) signifikant vertreten waren (**Tabelle 8**). In die Kategorie des Entwicklungsprozesses lässt sich auch die Anwesenheit der GO für Reproduktion und reproduktive Prozesse (GO:0000003, GO:0022414) einordnen (**Abbildung 10**,

Abbildung 11). Ein weiteres Detail, das neben der reduzierten Halmlänge, über *Ddw1* bekannt ist, ist ein verspäteter Blütezeitpunkt der Zwergmutante (Börner et al. 2000). Die Reduktion der Wuchshöhe geht mit einem erhöhten Verhältnis zwischen pflanzlicher Biomasse und Kornertrag einher, was einer Steigerung des Ernteindex entspricht (Hedden 2003). Dazu gibt es experimentelle Evidenz aus einer Studie über das Gen *Rht12* im Weizen (Chen et al. 2013). Hier wurde untersucht, inwiefern der Anteil der Trockenmasse in den Ähren und das Verhältnis dieses Parameters zwischen Ähren und Hauptstängel in den kurzstrohigen Genotypen im Vergleich zu den normalstrohigen Genotypen aussehen. Es wurde festgestellt, dass die durch die Reduzierung der Pflanzenstatur, das Trockengewicht des Haupttriebs und der überirdischen Biomasse der Zwergmutanten signifikant verringert war. Dem gegenüber gestellt war in den Zwergmutanten das Verhältnis zwischen dem Gesamttrockengewicht der Ähren und dem Trockengewicht der Pflanze höher. Die Autoren schlussfolgerten, dass *Rht12* die Verteilung der Trockenmasse in die Ähren während der späten Reproduktionsphase steigern könnte und die Assimilate aus Blättern und Stängel früher in die Ähren transportiert werden (Chen et al. 2013). Auch bei *Ddw1*-induzierten Zwergen lässt sich eine Ertragssteigerung beobachten (Hackauf et al. 2017b). Die beschriebene veränderte Kohlenstoffverteilung in der Pflanze spiegelt sich in der Tatsache wider, dass der Makromolekülmetabolismus (GO:0043170), einschließlich Kohlenhydratstoffwechsel (GO:0005975), Stoffwechsel von Kohlenstoffderivaten (GO:1901135), Lokalisierung (GO:0051179, GO:0051641) und Transport organischer Substanz (GO:0071702), im Verhältnis zu anderen GO einen großen Raum innerhalb der signifikanten GO einnahm (**Tabelle 8, Abbildung 10, Abbildung 11**).

Unter den auf Chromosom 5R lokalisierten DEG war das in der Mutante überexprimierte Transkript *comp31371_c0_seq2*. Es wurde als Homöobox-Leucin-Zipperprotein (HD-ZIP) annotiert und durch den Marker *MACEtp04* genetisch auf Chromosom 5RL kartiert (**Tabelle 7, Tabelle 8**). Die Gruppe der HD-ZIP Proteine kodiert in Getreidearten wie Reis und Weizen Transkriptionsfaktoren, die Einfluss auf die Reproduktion, Alterungsprozesse und das Längenwachstum nehmen (Yue et al. 2018). Darüber hinaus konnte eine Induktion von Reis HD-ZIP-Proteinen in *Arabidopsis thaliana* bei der Anpassung an Trockenstress demonstriert werden (Agalou et al. 2008). Die zum Transkript gehörigen GOs aus den Bereichen Wachstum, Entwicklung und Signalübertragung passen demnach zu diesem Beispiel. Die Kartierung zeigte, dass dieser Marker zwar nicht *Ddw1* repräsentiert, dennoch ist er aufgrund des biologischen Zusammenhangs interessant, insbesondere aufgrund der differentiellen Expression zwischen dem kurzstrohigen und normalstrohigen Genotyp von *Ddw1*. Die erhöhte Expression stützt die Annahme, dass kurzstrohige Genotypen eine höhere Trockentoleranz aufweisen (Lo et al. 2017).

Neben dem HD-ZIP Protein wurde eine DEAD-Box ATPase-abhängige RNA-Helicase auf Chromosom 5R lokalisiert (**Tabelle 8**). Diese wurde durch das Transkript *comp7751_c0_seq1* dargestellt und war in der Mutante unterexprimiert. Die DEAD-Box RNA-Helicase Familie ist die größte Familie der RNA-Helicasen und gehört zur Überfamilie der Helicasen (Huang et al. 2016). Die DEAD-Box RNA-Helicasen fungieren

möglicherweise als Signale für subzelluläre Lokalisierung oder werden als Bindestellen für spezifische Substrate benötigt (Huang et al. 2016). Es gibt experimentelle Hinweise im Reis, die belegen, dass sie an Prozessen beteiligt sind, die Gibberellin-abhängiges Wachstum und Gibberellin-abhängige Entwicklung beeinflussen (Huang et al. 2016). Das in dieser Studie identifizierte Transkript wurde mit der molekularen Funktion der Bindung und dem biologischen Prozess Entwicklung assoziiert. Dieses Ergebnis ist sowohl stimmig mit den experimentellen Hinweisen aus Reis, als auch mit der allgemeinen Funktion der RNA-Helicasen. Die Unterexpression in der Mutante mag die Annahme stützen, dass die Gibberellin-beeinflusste Entwicklung in der Mutante gehemmt ist und auf Grund dessen in geringerem Maß stattfindet.

Das in der *Ddw1* Mutante unterexprimierte Transkript *comp52087_c0_seq1* stellt eine Glykosyltransferase (UGT) dar (**Tabelle 8**). Glykosyltransferasen sind membrangebundene lösliche Enzyme, die an der Kohlenhydratsynthese und Veränderung der Kohlenhydratzusammensetzung der Zellwand beteiligt sein können, und damit Einfluss auf das Wachstum von Pflanzen haben (Lao et al. 2003). Zwergwuchs geht mit einer veränderten Verteilung der Trockenmasse in der Pflanze einher (Chen et al. 2013). Diese Kohlenstoffverteilung kann also Folge des veränderten Gibberellin-Einflusses auftreten. Wie eine Studie in Kartoffeln zeigt, handelt es sich hier um zwei parallele miteinander kommunizierende Stoffwechselwege (Ševcikova et al. 2017). Dies erklärt die Präsenz von GO wie Reaktion auf ein Hormon, Reaktion auf endogene oder biotische Reize, Regulierung des Hormonspiegels (**Abbildung 10**).

Schließlich war auch das als Phospholipase annotierte DEG *comp68387_c0_seq1*, das in der Mutante unterexprimiert ist, *in silico* auf Chromosom 5R kartiert (**Tabelle 8**). Phospholipasen (PL) sind im Allgemeinen Enzyme, die Membranphospholipide hydrolysieren und so Phosphatidsäure (PA) erzeugen. Phospholipase D (PLD) ist an verschiedenen Prozessen in Pflanzen beteiligt (Reaktionen auf abiotischen und biotischen Stress, Pflanzenwachstum, Samenqualität), die durch Signalübermittlung über Phytohormone (Zhao 2015) bewerkstelligt werden. Phospholipase A alpha im Reis, zum Beispiel, spielt eine Rolle beim vegetativen Längenwachstum, wobei deren Überexpression zu Zwergwuchs führt (Liu et al. 2015). Zunächst einmal stehen die beiden GO Hydrolyseaktivität (GO:0016788, GO:0016787) und Lipidmetabolischer Prozess (GO:0006629) in Übereinstimmung mit der Funktion der Phospholipasen, die Membranphospholipide hydrolysieren. Die GO Anatomische Strukturmorphogenese (GO:0009653), Entwicklungsprozess (GO:0032502) und Wachstum (GO:0040007) verkörpern die im Reis beschriebenen Beobachtungen. Allerdings ist die Art der Expression des DEG in der *Ddw1*-Mutante gegensätzlich zu der Expression der Phospholipase A alpha im Reis (Liu et al 2015). An dritter Stelle lässt sich feststellen, dass weitere identifizierte GO, das sind Reaktion auf einen endogenen Stimulus (GO:0009719), Reaktion auf ein Hormon (GO:0009725), sowie Signalübertragungsprozess (GO:0023052), zu den Funktionen der Phospholipasen passen. Neben der

Rolle der GA für Wachstum und Entwicklung stehen diese im Kontext bei Stress-induzierten Reaktionen (Colebrook et al. 2014; Plaza-Wüthrich et al. 2016).

Durch die nähere Betrachtung einzelner DEG und ihrer Annotationen konnte ein erster Einblick in die genspezifische Expression von *Ddw1*-Genotypen gegeben werden. Insgesamt ist jedoch anzumerken, dass Mitglieder einer Genfamilie unterschiedliche Funktion haben können und die genannten Fälle jeweils als beispielhaft gesehen werden müssen (Huang et al. 2015). Die konkrete Funktion der aufgeführten Transkripte muss abschließend experimentell herausgefunden werden. Dennoch geben die Transkripte auf Chromosom 5R, aber auch die DEG auf den anderen Roggenchromosomen interessante Anhaltspunkte, um weitere funktionelle Zusammenhänge in *Ddw1*-Mutanten herauszufinden.

4.3. Strategien zur Feinkartierung des *Dominant dwarfing gene Ddw1*

4.3.1. Markerentwicklung durch Mapping-by-Sequencing und vergleichende Kartierung

Das Hauptziel dieser Studie war die Durchführung einer Feinkartierung und hochauflösenden Kartierung des dominanten Kurzstrohgens *Ddw1* im Winterroggen, wozu eine von der Kreuzung *R1620 x R347/1* (Korzun et al. 1996) abstammende RIL-Population verwendet wurde (**Abbildung A 1**). Die Etablierung von Sequenziertechnologien der nächsten Generation (*next-generation sequencing*, NGS) sowie der Verfügbarkeit vollständig entschlüsselter Referenzgenome (James et al. 2013) haben zu einem erheblichen Fortschritt auf dem Gebiet der Entschlüsselung der genetischen Basis von Phänotypen beigetragen. Durch Kombination der *bulked-segregant* Analyse (Michelmore et al. 1991) und Integration von NGS-Daten aus Genotypenbulks in ein Referenzgenom hat sich die Klonierung von Genen im Wesentlichen auf einen einzelnen Schritt eines computer-gestützten Verfahrens reduziert, sobald eine Kartierungspopulation für das betreffende Merkmalsgen verfügbar ist (Schneeberger und Weigel 2011). Neben der Anwendung in Modelnpflanzen wie *Arabidopsis thaliana* (James et al. 2013) ist dieser Ansatz in anderen Pflanzen, so zum Beispiel für die Genisolation in Gerste, erfolgreich eingesetzt worden (Mascher et al. 2014; Pankin et al. 2014; Hoseinzadeh et al. 2019). Vor diesem Hintergrund war es das Ziel, ergänzend zur Markerentwicklung über einen vergleichenden Ansatz der Genkartierung, enger gekoppelte *Ddw1*-Marker aus Roggen mittels *bulked-segregant* Analyse und NGS zu generieren. Dazu wurden kurz- bzw. normalstrohige Genotypen aus der hochauflösenden F_{5:6}-Kartierungspopulation aufgrund ihrer genetischen Konstitution an den beschriebenen neuen Markern im Zielintervall *tcos4366 – tcos1137* zu Pools zusammengefasst, um polymorphe Sequenzabschnitte im exprimierten Teil des Roggen-genoms mittels der Sequenzierungstechnologie MACE (Zawada et al. 2014) zu identifizieren. Darüber hinaus wurden die Vorteile der verbesserten genomischen Ressourcen

für Roggen (Martis et al. 2013, Bauer et al. 2017) genutzt, um Erkenntnisse zum Genlocus *Ddw1* zu gewinnen, der am distalen Ende von Chromosom 5RL liegt.

Die genomischen Roggenressourcen haben sich als wichtiges Werkzeug erwiesen, um mit erhöhter Genauigkeit Sequenzen aus einem *de novo* generierten Transkriptdatensatz zur Markeranreicherung auszuwählen. Durch die im Gegensatz zu Gerste und Weizen verspätete Entwicklung einer ersten Roggengenomreferenzsequenz ist der Ansatz der vergleichenden Kartierung mit Hilfe dem Roggen nah verwandter Genome wie dem Brotweizen, *Aegilops tauschii*, *Triticum urartu* und *Triticum dicoccoides* ein erfolgversprechender Weg. Zunächst haben die Kartierungsarbeiten gezeigt, dass die Syntäniebeziehungen auf Makroebene bestätigt werden konnten (**Abbildung 16, Tabelle 13**), die von Devos et al. (1993) publiziert wurden. So konnten auf Grundlage der homöologen Chromosomengruppe 4L der Triticeae engere Bereiche auf den Chromosomen 4DL in *Aegilops tauschii*, 4AL-bin in *Triticum urartu* sowie 4BL und 5AL in Emmer und im Weizen identifiziert werden. Trotz dieser erfolgreichen Strategie zur Kartierung neuer molekularer Marker für *Ddw1*, konnte dagegen die Gerste nicht in diesem Maße genutzt werden. Nachdem der Vergleich zwischen Roggen und Gerste zwar 18 syntäne Blöcke identifiziert hat und eine großräumige kollineare Beziehung zwischen den Chromosomen 5RL im Roggen zu 4HL in der Gerste konstatiert wurde, war diese jedoch im Bereich von *Ddw1* gebrochen (Braun et al. 2019). Auch auf Mikroebene zeigte sich, dass *Aegilops tauschii*, *Triticum urartu* und *Triticum dicoccoides* sehr gute Modelle sind, um den *Ddw1*-Locus als Intervall abzubilden (**Abbildung 16, Tabelle 13, Tabelle A 12**). Mit der Hinzunahme von Informationen aus *Aegilops tauschii* (Luo et al. 2017) war es sogar möglich, das gesamte Intervall abzubilden und somit einen Eindruck über weitere mögliche Genmodelle als Anhaltspunkt zur Gen-basierten Markerentwicklung zu bekommen (**Tabelle A 12**). Ebenso zeigte sich, dass auch das B-Genom von Weizen eine gute Referenz für die Kartierung von *Ddw1* darstellt (**Abbildung 17, Abbildung 19, Tabelle 13**). Ein Erklärung ist, dass sich der Roggen erst vor 4 Mio. Jahren $\pm 0,5$ und damit wesentlich später als die Gerste (8,9 Mio. Jahre $\pm 0,9$) von Weizen diversifizierte (Middleton et al. 2014). Im Gegensatz zu den genannten Getreidegenomen ist das Gen *ScGA2ox12*, das durch den Marker *MACE4* repräsentiert wird, zwar in der Roggengenomsequenz existent, dort aber keinem Chromosom zugeordnet (Bauer et al. 2017). Dieser Befund zeigt zum einen die Herausforderungen, die sich beim Ansatz des *mapping-by-sequencing* (Mascher et al. 2014) im bis jetzt nicht vollständig entschlüsselten Roggengenom ergeben. Zum anderen unterstreicht er den Wert des vergleichenden Ansatzes zur Genkartierung im Roggen, zumal auch bekannt ist, dass der distale Bereich von Chromosom 5RL evolutionär bedingt durch eine netzartige Struktur charakterisiert ist und auf das gleiche Vorgängerchromosom zurückgeht wie der distale Bereichs des Chromosoms 4RS und der interkalare Bereich von Chromosom 7R (Martis et al. 2013).

Darüber hinaus wurde in dieser Arbeit die Position von *Ddw1* auf dem langen Arm von Chromosom 5R sowohl durch genetische Kartierung als auch durch die Verwendung von Weizen-Roggen-Additionslinien bestätigt (**Abbildung 15, Tabelle A 13**). Außerdem wird durch die Kollinearität zwischen der hochdichten Karte des Roggens (Bauer et al. 2017) und der Feinkartierung von *Ddw1* in der F_{4:5}-Kartierungspopulation deutlich, dass *Ddw1* distal auf 5R lokalisiert ist (**Abbildung 15, Tabelle 14**). Dies steht in Übereinstimmung mit früheren Studien (Korzun et al. 1996, Tenhola-Roininen und Tanhuanpää 2009), stellt aber gegenüber früheren Kartierungsarbeiten einen hohen technologischen Fortschritt dar, indem das Intervall von vormals 17,1 cM (Korzun et al. 1996) auf 0,4 cM reduziert wurde (Braun et al. 2019). Darüber hinaus wurden für das Gen *Ddw1* flankierende codominante Marker wie *c26102* und *c15679* verfügbar, die für die Züchtung wertvolle Selektionswerkzeuge darstellen, da sie zusätzlich zu den dominanten Markern *dMACE3*, *MACE3*, *Sc5R14198* und *MACE4* eine effiziente Selektion der heterozygoten kurzstrohigen Genotypen ermöglichen (**Tabelle A 13, Tabelle 3**). Zudem stellte die Markersaturierung ideale Voraussetzungen zur Erstellung einer hochauflösenden Karte dar, die wiederum bei einer möglicherweise anstehenden Entschlüsselung des Roggengenoms in der Zukunft zur physikalischen Kartierung des *Ddw1*-Locus einen Beitrag liefern kann. Ferner lassen sich durch die neuen Marker erstmals weitere Vergleiche zu Kartierungen von *Ddw1* in Triticale anstellen. In einer QTL-Studie wurde zur Untersuchung der genetischen Architektur von WH und Biomasse die Linieneigenleistung in Populationen untersucht, die aus DH-Linien entwickelt wurden (Alheit et al. 2014). Die dazu verwendeten DArT-Marker entstammten einer hochdichten genetischen Kopplungskarte. Die Marker *rPt-507664* und *rPt-508266* definierten in einer Population ein 7,9 cM Intervall auf Chromosom 5R, das sowohl einen konstant über die Entwicklung hindurch erhaltenen QTL für WH als auch für Biomassertrag einschloss. Der Vergleich über die gleichen DArT-Marker zwischen der Kartierung in der RIL-Population *L2039-N x DH* zeigte eine kollineare Beziehung (**Tabelle A 14**), jedoch auch gleichzeitig, dass die Position von *Ddw1* in Triticale revidiert werden muss, da die Karte invertiert dargestellt wurde und sich das Gen laut dieser Darstellung auf dem kurzen Arm von 5R befindet (Braun et al. 2019). Die Tatsache, dass jedoch die gleichen DArT-Marker *rPt-507664* und *rPt-508266* in beiden Karten das *Ddw1*-Zielintervall beschreiben unterstützt die Annahme, dass die QTLs *QPh-5R* und *QBm-5R* in Triticale von *Ddw1* kontrolliert werden. Wenn die Beobachtung der invertierten Karte in Triticale auf die Kartierung von QTL in Hybriden des Petkuser Formenkreises zur Prüfung deren Leistung übertragen wird (Miedaner et al. 2012), lässt sich aus der kollinearen Beziehung der gleichen Marker ableiten, dass auch die Kartierung in der Population *Lo115 x L117* invertiert abgebildet wurde. Als Konsequenz lässt sich ableiten, dass eine Identität zwischen dem WH-QTL *QPh8-5R* und *Ddw1* ausgeschlossen werden kann.

4.3.2. Identifizierung einer GA2-Oxidase im Roggen

Zusammenfassend belegen die Kartierungsdaten, dass die Transkriptomsequenzierung erfolgreich für die Kartierung von mit *Ddw1*-gekoppelten Markern und die Quantifizierung von Transkripten genutzt werden konnte. Sowohl durch das Expressionsmuster, die chromosomale Lokalisierung als auch die Kopplungsanalyse wurde eine GA2-Oxidase, bezeichnet als *ScGA2ox12*, identifiziert, die zunächst aufgrund der Cosegregation mit *MACE4* als möglicher Kandidat von *Ddw1* gehandelt wurde (Braun et al. 2019, **Abbildung 15**). Diese Einstufung erscheint plausibel nachdem eine Reihe von Kurzstrohgenen identifiziert wurden, die Teil des GA-Metabolismus oder der Signalkaskade sind (Geiger und Schnell 1970) und über *Ddw1* bekannt ist, dass es sich um ein GA-sensitives Gen handelt (Börner und Melz 1988). Die phylogenetische Analyse zeigte, dass *ScGA2ox12* nah verwandt ist mit *OsGA2ox6* im Reis sowie *TaGA2ox-A9* und *TaGA2ox-A12* (**Abbildung 14**). Diese drei Gene wurden kürzlich in Verbindung mit Zwergwuchs gebracht (Lo et al. 2017; Ford et al. 2018; Sun et al. 2019). Für *OsGA2ox6*-Mutanten wurde gezeigt, dass Transkriptomnetzwerke umprogrammiert wurden und die endogenen GA-Gehalte reduziert waren, was verglichen mit normalstrohigen Pflanzen nicht nur zu einer verringerten Wuchshöhe, sondern auch zu produktiveren Ähren-tragenden Halmen, einem weitläufigerem Wurzelsystem, einer höheren Photosyntheserate und Wassernutzungseffizienz, und einer gesteigerten abiotischen und biotischen Stresstoleranz führte. Das Kurzstrohgen *Rht18* im Weizen ist wie *Ddw1* ein dominant vererbtes und GA-sensitives Gen (Ford et al. 2018). Es stellt hat eine andere Funktion und chromosomale Lokalisation als die in der Züchtung vielfach verwendeten GA-insensitiven Kurzstrohgene *Rht-B1* und *Rht-B1*. Die beiden GA-Oxidase *TaGA2ox-A9* und *TaGA2ox-A12* zeigen eine erhöhte Expression in der *Rht18*-Halbzwergenmutante (Ford et al. 2018; Sun et al. 2019). Eine erhöhte Expression wurde ebenso für *ScGA2ox12* festgestellt und gibt den Hinweis darauf, dass es sich bei *Ddw1* um eine dominante *gain-of-function*-Mutation handeln könnte, wie sie für *Rht18* beschrieben wurde (Ford et al. 2018) [und für *Rht12* vorgeschlagen (Sun et al. 2019)]. In einer anderen Studie wurde von der Erstellung einer hochauflösenden Karte für das Kurzstrohgen *Rht12* am terminalen Ende von Chromosom 5AL berichtet (Sun et al. 2019). Der bioaktive GA-Gehalt ist in den Zwergmutanten reduziert, was durch eine erhöhte Expression von *TraesCS5A01G543100*, das eine GA 2- β -Dioxygenase kodiert (*TaGA2ox-A14*), induziert wird (Sun et al. 2019). *ScGA2ox12* clusterte bei der phylogenetischen Analyse zusammen mit diesem Weizengen, das in dem phylogenetischen Baum als *TaGA2ox-B12* bezeichnet wurde (**Abbildung 14**).

ScGA2ox12 ist nicht in der hochdichten Karte des Roggen-genoms lokalisiert. Dieses Gen wurde in der vorliegenden Studie durch die Verwendung von Weizen-Roggen-Additionslinien sowie einer unabhängigen genetischen Kartierung in der Population *L2039-N x DH* eindeutig dem langen Arm von

Chromosom 5R zugeordnet (**Tabelle A 14**). Auffällig war, dass für das *ScGA2ox12*-Transkript Strukturvarianten auftraten und in der genetischen Kartierung unterschiedliche mit diesem Gen verankerte Marker (**Tabelle 13, Abbildung A 5**). Die Ursachen sind unklar, jedoch könnten Spleißen oder post-transkriptionelle Prozesse dazu geführt haben (Manning und Cooper 2017). Andererseits könnte das co-segregierende Gen ein paraloges Gen von *Ddw1* sein, welches nach der Genduplikation eine neue Funktion erhalten hat und das ursprüngliche *Ddw1*-Gen die Funktion beibehalten hat. Diese Annahme wird gestützt durch Gene, die nach einer Duplikation mit einhergehender Erschaffung einer neuen Genfunktion in Pflanzen beibehalten wurden (Panchy et al. 2016). Die Rekombination zwischen *MACE3* und *MACE 4* legt zumindest nahe, dass mindestens zwei *ScGA2ox12*-Gene existieren, und impliziert damit, dass eine Duplikation stattgefunden haben muss. Dies kann auch die in Abschnitt 3.4.2. erwähnte Variation in den dazugehörigen Markertranskripten Contig *c10497_g1* und Contig *c10497_g2* aus der Sequenzressource von Braun et al. (2019) erklären.

4.3.3. Potential des Kandidatengenansatzes für Gibberelline im Roggen

Die Kartierung des Gens *ScGA2ox12* auf Chromosom 5R im Roggen zeigt, dass bei Bekanntheit der Biologie von Genen und der Verfügbarkeit von genomischen Ressourcen die Suche nach Kandidatengen eine effiziente Strategie ist. Nachdem im Roggen die Zahl der genomischen Ressourcen zugenommen hat (Martis et al. 2013) und eine hochdichte Karte mit 27784 Genen verfügbar wurde (Bauer et al. 2017), konnte die Strategie einer gezielten Zusammenstellung von GA-Genen und einer Markerentwicklung, insbesondere für Gene auf Chromosom 5R, realisiert werden. Der Kandidatengenansatz hat ebenso zu der Detektion von *ScGA2ox12* führte wie die vergleichende Kartierung und die Identifizierung von DEG zwischen dem kurzstrohigen und normalstrohigen Bulk. Die Literaturrecherche und die im Anschluss erfolgte Markerentwicklung, Resequenzierung von Markern und Kartierung einzelner Gene lieferte darüber hinaus Hinweise auf die Existenz einiger Gene, die in der *Lo7*-Sequenz (Bauer et al. 2017) nicht vorhergesagt wurden.

Zum Beispiel konnte mit *ScSLR1* das homologe Gen von *Rht1* (Gen der „Grünen Revolution“) (Hedden und Sponsel 2015) erstmalig beschrieben werden. Auch mit der Verifizierung von *ScGA13ox1* wurde ein weiterer wichtiger Beitrag geleistet. Für GA13-Oxidasen wurde bereits in *Arabidopsis thaliana* nachgewiesen, dass diese im Zusammenhang mit der Steuerung der GA-Homöostase in der Pflanze stehen und die Wuchshöhe beeinflusst wurde (Magome et al. 2013). Darüber hinaus stellen alle nachgewiesenen GA-Gene interessante Angriffstellen für Haplotypstudien bei Roggen dar, weil ein Zusammenhang zwischen Gibberellinen und agronomisch wichtigen Merkmalen bekannt ist. So sind die GA-Gene eine potentielle Quelle für Gene deren Variation zu einer erhöhten abiotischen Stressresistenz beitragen könnte (Colebrook et al. 2014; Hedden und Sponsel 2015; Plaza-Wüthrich et

al. 2016). Es müssten Haplotypstudien bei Roggen durchgeführt werden, die dazu beitragen Variationen auf Sequenzebene aufzuspüren. Für erste Experimente bietet es sich an, die veröffentlichte Genvielfalt (Bauer et al. 2017) zu verwenden und dafür gezielt Marker zu entwickeln. Um eine verbesserte Toleranz von spezifischen GA-Mutanten im Roggen gegenüber abiotischem Stress zu untersuchen und zu belegen, werden parallel dazu phänotypische Daten notwendig sein.

4.4. Hochauflösende Kartierung von *Ddw1*

Durch die Genotypisierung der $F_{5,6}$ -Kartierungspopulation wurden proximal von *Ddw1* drei Rekombinationen in 3385 Pflanzen detektiert (**Abbildung 18**). Durch die Untersuchung dieser zusätzlichen und weitaus höheren Anzahl an Individuen, im Vergleich der für die Feinkartierung verwendeten Genotypen, konnte eine wesentlich höhere Auflösung erreicht werden (Lüpken et al. 2013). Dies ist eine mögliche Erklärung, weshalb für *MACE4* sogar vier Rekombinationen nachgewiesen wurden und sich eine im Vergleich zur Feinkartierung abweichende Anordnung der Marker *Sc5R14198*, *dMACE3*, *MACE3* und *MACE4* ergeben hat (**Abbildung 16**). Durch die hochauflösende Kartierung wurde also gezeigt, dass *ScGA2ox12* aufgrund der Rekombinationen nicht als Kandidat für *Ddw1* in Frage kommt. Dagegen konnte die hier aufgestellte Hypothese (vgl. Abschnitt 4.3.2., **Abbildung A 5**), dass zwei Kopien von *ScGA2ox12* im Roggen existieren, unterstützt werden. *MACE3* und *MACE4*, die bereits zuvor zwei verschiedenen *GA2ox*-Genen zugeordnet wurden, zeigten auch in der hochauflösenden Kartierung eine jeweils andere Anzahl an Rekombination. Trotz 42 distaler Rekombinationen ist die in dieser Arbeit erstellte hochauflösende Karte die bislang fortschrittlichste Karte des *Ddw1*-Locus. Die Tatsache, dass sich die Karte perfekt in die hochdichte Karte integrieren lässt (Bauer et al. 2017) und Kollinearität zu anderen Gräsergenomen gezeigt werden konnte, unterstützt die Validität dieser Karte. Bezugnehmend auf die Nutzung des Weizengenoms hat sich auch gezeigt, dass die physikalischen Abstände zwischen den durch *MACE3*, *c15679* und *c103925* verankerten Genen auf Chromosom 4BL eine ähnliche Länge aufweisen, wie die durch einen Algorithmus vorhergesagten Gene (Stanke et al. 2008) der Weizengenomreferenzsequenz (Mayer et al. 2014; Appels et al. 2018) (vgl. Abschnitt 3.6.1.). Um der Karte weitere Validität zu verleihen, wurde eine integrierte Karte für die sechs Marker *c26102*, *tcos4366*, *MACE3*, *c28517*, *c27051* und *c30002* erstellt und ein Heterogenitätstest durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Die Auswahl der Marker zur Genotypisierung der hochauflösenden Population basierte auf den Ergebnissen der Feinkartierung (**Abbildung 16**). Durch diese zusätzliche Karte wurde gezeigt, dass zwischen den flankierenden Markern perfekte Übereinstimmung besteht und somit eine kollineare Beziehung zwischen der Feinkartierung und der hochauflösenden Karte vorhanden ist.

Eine Herausforderung für die weitere Auflösung des *Ddw1*-Locus stellt gegenwärtig die Referenzgenomsequenz im Roggen dar, da der am engsten gekoppelte Marker *MACE3*, synonym mit

ScGA2ox12, nicht in der hochdichten Karte des Roggengenoms verortet wurde. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Markeranreicherung speziell auf dem langen Arm von Chromosom 5R, das evolutionär gesehen von einer Reihe von Translokationen und Inversionseignissen geformt wurde (Martis et al. 2013), eine bislang nicht überwundene Hürde darstellt, die sich auch in der Kartierung von *Ddw1* widerspiegelt. Vor diesem Hintergrund bietet es sich an, die aktuelle Entwicklung in *Triticum dicoccoides* und Weizen als attraktive Alternative zur Fortsetzung der vergleichenden Kartierung aufzugreifen. Dazu liefern die orthologen Abschnitte auf den Chromosomen 4B und 5A reichlich Ansatzpunkte zur Markeranreicherung, die die Isolierung von *Ddw1* ermöglichen könnten. Das Gen UGT, das in dem 0,838 Mbp Zielintervall auf Chromosom 5A liegt, könnte ein solcher interessanter Kandidat sein, da die Glykosylierung von GA ein Mechanismus zur Steuerung des endogenen GA-Gehaltes ist (Ostrowski und Jakubowska 2014). Im Gegensatz zu dieser Studie zu *Ddw1* im Roggen, wurden in der Expression des Gens *TraesCS5A01G543000*, das UGT kodiert, keine Unterschiede zwischen *Rht12* und *rht12* Linien festgestellt (Sun et al. 2019). Im Gegensatz zur Studie zu *Rht12* (Sun et al. 2019), war die Feinkartierung von *Ddw1* im Fremdbestäuber Roggen auch nicht von niedrigen Rekombinationsraten betroffen. Infolgedessen wurde basierend auf der Weizengenomsequenz *Rht12* innerhalb eines 11,21 Mbp-Segments auf Chromosom 5A (Sun et al. 2019) abgebildet. Dagegen wurde *Ddw1* auf ein 0,838 Mbp großes Intervall innerhalb dieses großen 5A-Segments abgebildet (**Abbildung 17**). Die Marker *MACE3* und *MACE4* basieren auf der genetischen Vielfalt zwischen kurz- und normalstrohigen Genotypen in *ScGA2ox12*, wodurch es möglich wurde, die Beziehung zwischen diesem Gen und *Ddw1* genetisch zu untersuchen. Bemerkenswert ist, dass ein Mangel an Sequenzdiversität in *TraesCS5A01G543100* zwischen den Linien *Rht12* und *rht12*, *TraesCS5A01G543100* als Kandidatengen von *Rht12* ausschließt (Sun et al. 2019). *TraesCS5A01G543100* wurde in der Studie von Sun et al. (2019) *TaGA2ox-A14* genannt. In der vorliegenden Studie wurde das Gen gemäß der Systematik von Pearce et al. (2015) umbenannt. Die *Triticum aestivum* Sequenz *Traes_4BL_57623F302* (Ensembl Plants v. 25) wurde von Pearce et al. (2015) als *GA2ox12*-Gen identifiziert und erhielt in der vorliegenden Arbeit den Namen *TaGA2ox-A12*. Weiterhin wird vorgeschlagen, die Nomenklatur von Pearce et al. (2015) auf die 2-ODD-Gene von Roggen und Weizen anzuwenden, anstatt die Nomenklatur von Sun et al. (2019) fortzusetzen, von denen letztere zu Verwechslungen mit 2-ODD-Genen bei beiden Arten führen kann. *Traes_4BL_57623F302* trägt die Bezeichnung *TraesCS4B02G376200* in der Weizengenomsequenz von Appels et al. (2018). Nach diesem System werden die Orthologen von *ScGA2ox12*, *TraesCS5A01G543100* und *TraesCS4B02G376200* jeweils *TaGA2ox-A12* und *TaGA2ox-B12* genannt. Die Kollinearität zwischen dem *Ddw1*-Locus und einem Teil des *Rht12*-Locus auf dem Weizenchromosom 5A sowie die Überexprimierung von *ScGA2ox12* und *TaGA2ox-A12* in den Halbzweig-Genotypen

unterstützen die These, dass *Ddw1* und *Rht12* funktionell äquivalente Eins-zu-Eins-Orthologe sind (Börner et al. 1996).

4.5. Schlussfolgerung

In dieser Studie wurde die Entwicklung sequenzspezifischer Marker und die Markeranalyse zur rekombinatorischen Verkleinerung des Chromosomensegmentes um das Kurzstroh-Gen *Dominant dwarf 1 (Ddw1)* auf Chromosom 5R beschrieben. Mit den hier aufgeführten molekularen Markern können in Zukunft Selektionsentscheidungen im Hinblick auf das Kurzstrohgen *Ddw1* bei Roggen getroffen werden. Dadurch wird die Entwicklung kurzstrohiger Hybridsorten ermöglicht werden, die wiederum den Bedarf an ertragsreichen Sorten decken und einen Beitrag zu einer zukunftsfähigen Landwirtschaft leisten werden.

Aufbauend auf der publizierten Feinkartierung (Braun et al. 2019) konnte eine höhere Auflösung der genetischen Karte erreicht werden. Diese stellt einen großen technologischen Fortschritt zu anderen Studien zur Kartierung von *Ddw1* da. Bei der Markerentwicklung und der Einordnung der Ergebnisse dienten die Weizengenomsequenz und die Roggengenomsequenz als bedeutende Referenzen. Das mit dem Marker *MACE3* verankerte Genmodell *Sc5Loc00129590.1* auf dem *Lo7 Contig 133145* ist nicht im Intervall des Referenzgenoms *Lo7 x Lo225* abgebildet. Dadurch steht das Ziel, das Gen zu isolieren, ebenso der endgültige Beweis der These einer Genduplikation von *ScGA2ox12*, die durch Rekombination aufgestellt wird, gegenwärtig vor einer Herausforderung.

Neben der Kartierung des GA-sensitiven Gens *Ddw1* hat diese Arbeit die Basis für eine weitere Untersuchung der GA-Gene im Roggen gelegt. Die GA-Gene stellen Ausgangspunkte für weitere Studien zu GA-Funktionen in Getreide dar und könnten, ebenso wie die Nutzung von *Ddw1*, in Zukunft zur Verbesserung des Roggens als Kulturart beitragen. Das Beispiel von *Ddw1* zeigt, dass genetische Ressourcen wertvolle Quellen für die stetige Anpassung des Roggens an den Klimawandel darstellen und mit Hilfe moderner molekularer Methoden wie RNAseq in Kombination mit vergleichender Kartierung nutzbar gemacht werden können.

5. LITERATURVERZEICHNIS

- Achard P, Genschik P (2009) Releasing the brakes of plant growth: how GAs shutdown DELLA proteins. *J Exp Bot* 60:1085–1092
- Appels R, Eversole K, Stein N, Feuillet C, Keller B, Rogers J, Pozniak CJ, Choulet F, Distelfeld A, Poland J, Ronen G, Sharpe AG, Barad O, Baruch K, Keeble-Gagnère G, Mascher M, Ben-Zvi G, Josselin A-A, Himmelbach A, Balfourier F, Gutierrez-Gonzalez J, Hayden M, Koh C, Muehlbauer G, Pasam RK, Paux E, Rigault P, Tibbits J, Tiwari V, Spannagl M, Lang D, Gundlach H, Haberer G, Mayer KFX, Ormanbekova D, Prade V, Šimková H, Wicker T, Swarbreck D, Rimbart H, Felder M, Guilhot N, Kaithakottil G, Keilwagen J, Leroy P, Lux T, Twardziok S, Venturini L, Juhász A, Abrouk M, Fischer I, Uauy C, Borrill P, Ramirez-Gonzalez RH, Arnaud D, Chalabi S, Chalhoub B, Cory A, Datla R, Davey MW, Jacobs J, Robinson SJ, Steuernagel B, van Ex F, Wulff BBH, Benhamed M, Bendahmane A, Concia L, Latrasse D, Bartoš J, Bellec A, Berges H, Doležel J, Frenkel Z, Gill B, Korol A, Letellier T, Olsen O-A, Singh K, Valárik M, van der Vossen E, Vautrin S, Weining S, Fahima T, Glikson V, Raats D, Čížalíková J, Toegelová H, Vrána J, Sourdille P, Darrier B, Barabaschi D, Cattivelli L, Hernandez P, Galvez S, Budak H, Jones JDG, Witek K, Yu G, Small I, Melonek J, Zhou R, Belova T, Kanyuka K, King R, Nilsen K, Walkowiak S, Cuthbert R, Knox R, Wiebe K, Xiang D, Rohde A, Golds T, Čížková J, Akpinar BA, Biyiklioglu S, Gao L, N'Daiye A, Kubaláková M, Šafář J, Alfama F, Adam-Blondon A-F, Flores R, Guerche C, Loaec M, Quesneville H, Condie J, Ens J, Maclachlan R, Tan Y, Alberti A, Aury J-M, Barbe V, Couloux A, Cruaud C, Labadie K, Mangenot S, Wincker P, Kaur G, Luo M, Sehgal S, Chhuneja P, Gupta OP, Jindal S, Kaur P, Malik P, Sharma P, Yadav B, Singh NK, Khurana JP, Chaudhary C, Khurana P, Kumar V, Mahato A, Mathur S, Sevanthi A, Sharma N, Tomar RS, Holušová K, Plíhal O, Clark MD, Heavens D, Kettleborough G, Wright J, Balcárková B, Hu Y, Salina E, Ravin N, Skryabin K, Beletsky A, Kadnikov V, Mardanov A, Nesterov M, Rakitin A, Sergeeva E, Handa H, Kanamori H, Katagiri S, Kobayashi F, Nasuda S, Tanaka T, Wu J, Cattonaro F, Jiumeng M, Kugler K, Pfeifer M, Sandve S, Xun X, Zhan B, Batley J, Bayer PE, Edwards D, Hayashi S, Tulpová Z, Visendi P, Cui L, Du X, Feng K, Nie X, Tong W, Wang L (2018) Shifting the limits in wheat research and breeding using a fully annotated reference genome. *Science* 361:eaar7191
- Agalou A, Purwantomo S, Övernäs E, Johannesson H, Zhu X, Estiati A, de Kam RJ, Engström P, Slamet-Loedin IH, Zhu Z, Wang M, Xiong L, Meijer AH, Ouwerkerk PBF (2008) A genome-wide survey of HD-Zip genes in rice and analysis of drought-responsive family members. *Plant Mol Bio* 66:87-103
- Aken BL, Achuthan P, Akanni W, Amode MR, BeRNAdorff F, Bhai J, Billis K, Carvalho-Silva D, Cummins C, Clapham P, Gil L, Giron CG, Gordon L, Hourlier T, Hunt SE, Janacek SH, Juettemann T, Keenan S, Laird MR, Lavidas I, Maurel T, McLaren W, Moore B, Murphy DN, Nag R, Newman V, Nuhn M, Ong CK, Parker A, Patricio M, Riat HS, Sheppard D, Sparrow H, Taylor K, Thormann A, Vullo A, Walts B, Wilder SP, Zadissa A, Kostadima M, Martin FJ, Muffato M, Perry E, Ruffier M, Staines DM, Trevanion SJ, Cunningham F, Yates A, Zerbino DR, Flicek P (2017) Ensembl 2017. *Nucleic Acids Res* 45:D635-D642
- Akhunov ED, Akhunova AR, Anderson OD, Anderson JA, Blake N, Clegg MT, Coleman-Derr D, Conley EJ, Crossman CC, Deal KR, Dubcovsky J, Gill BS, Gu YQ, Hadam J, Heo H, Huo N, Lazo GR, Luo MC, Ma YQ, Matthews DE, McGuire PE, Morrell PL, Qualset CO, Renfro J, Tabanao D, Talbert LE, Tian C, Toleno DM, Warburton ML, You FM, Zhang W, Dvorak J (2010) Nucleotide diversity maps reveal variation in diversity among wheat genomes and chromosomes. *BMC Genomics* 11:702
- Alheit KV, Bussemeyer L, Liu W, Maurer HP, Gowda M, Hahn V, Weissmann S, Ruckelshausen A, Reif JC, Würschum T (2014) Multiple-line cross QTL mapping for biomass yield and plant height in triticale (*x Triticosecale* Wittmack). *Theor Appl Genet* 127:251-260

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403-410
- Ariyadasa R, Mascher M, Nussbaumer T, Schulte D, Frenkel Z, Poursarebani N, Zhou R, Steuernagel B, Gundlach H, Taudien S, Felder M, Platzner M, Himmelbach A, Schmutzer T, Hedley PE, Muehlbauer GJ, Scholz U, Korol A, Mayer KF, Waugh R, Langridge P, Graner A, Stein N (2014) A sequence-ready physical map of barley anchored genetically by two million single-nucleotide polymorphisms. *Plant Physiol* 164:412-423
- Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, Harris MA, Hill DP, Issel-Tarver L, Kasarskis A, Lewis S, Matese JC, Richardson JE, Ringwald M, Rubin GM, Sherlock G (2000) Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet* 25:25-29
- Avni R, Nave M, Barad O, Baruch K, Twardziok SO, Gundlach H, Hale I, Mascher M, Spannagl M, Wiebe K, Jordan KW, Golan G, Deek J, Ben-Zvi B, Ben-Zvi G, Himmelbach A, MacLachlan RP, Sharpe AG, Fritz A, Ben-David R, Budak H, Fahima T, Korol A, Faris JD, Hernandez A, Mikel MA, Levy AA, Steffenson B, Maccaferri M, Tuberosa R, Cattivelli L, Faccioli P, Ceriotti A, Kashkush K, Pourkheirandish M, Komatsuda T, Eilam T, Sela H, Sharon A, Ohad N, Chamovitz DA, Mayer KFX, Stein N, Ronen G, Peleg Z, Pozniak CJ, Akhunov ED, Distelfeld A (2017) Wild emmer genome architecture and diversity elucidate wheat evolution and domestication. *Science* 357:93-97
- Banaszak Z (2010) Breeding of triticale in DANKO. 61 Tagung der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs, Raumberg-Gumpenstein, pp 65-68
- Bartos J, Paux E, Kofler R, Havrankova M, Kopecky D, Suchankova P, Safar J, Simkova H, Town CD, Lelley T, Feuillet C, Dolezel J (2008) A first survey of the rye (*Secale cereale*) genome composition through BAC end sequencing of the short arm of chromosome 1R. *BMC Plant Biol* 8:95
- Bates D, Maechler M, Bolker B, Walker S (2015) Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *J Stat Softw* 67:1-48
- Bauer E, Schmutzer T, Barilar I, Mascher M, Gundlach H, Martis MM, Twardziok SO, Hackauf B, Gordillo A, Wilde P, Schmidt M, Korzun V, Mayer KF, Schmid K, Schon CC, Scholz U (2017) Towards a whole-genome sequence for rye (*Secale cereale* L.). *Plant J* 89:853–869
- Bäurle I, Dean C (2006) The timing of developmental transitions in plants. *Cell* 125:655-664
- Becker H (2011) Pflanzenzüchtung. 2. Auflage, Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart
- Behre K-E (1992) The history of rye cultivation in Europe. *Veg Hist Archeobot* 1:141-156
- Benjamini Y, Hochberg Y (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc Ser B Methodol* 57:289-300
- Bishnoi UR, Pancholy DK (1980) Comparative salt tolerance in triticale, wheat and rye during germination. *Plant and Soil* 55:491-493
- BMEL (2018) Statistisches Jahrbuch über Ernährung, Landwirtschaft und Forsten der Bundesrepublik Deutschland 2017. In Landwirtschaft BfEu, ed, Landwirtschaftsverlag Münster-Hiltrup
- Börner A, Korzun V, Voylokov AV, Worland AJ, Weber WE (2000) Genetic mapping of quantitative trait loci in rye (*Secale cereale* L.). *Euphytica* 116:203-209
- Börner A, Melz G (1988) Response of rye genotypes differing in plant height to exogenous gibberellic acid application. *Arch Züchtungsforsch* 18:79-82
- Börner A, Plaschke J, Korzun V, Worland AJ (1996) The relationships between the dwarfing genes of wheat and rye. *Euphytica* 89:69-75

- Braun E-M, Tsvetkova N, Rotter B, Siekmann D, Schwefel K, Krezdorn N, Plieske J, Winter P, Melz G, Voylokov AV, Hackauf B (2019) Gene expression profiling and fine mapping identifies a gibberellin 2-oxidase gene co-segregating with the dominant dwarfing gene *Ddw1* in rye (*Secale cereale* L.) Front Plant Sci 10
- Busemeyer L, Ruckelshausen A, Moller K, Melchinger AE, Alheit KV, Maurer HP, Hahn V, Weissmann EA, Reif JC, Wurschum T (2013) Precision phenotyping of biomass accumulation in triticale reveals temporal genetic patterns of regulation. Sci Rep 3:2442
- Busov VB, Brunner AM, Strauss SH (2008) Genes for control of plant stature and form. New Phytol 177:589-607
- Cao G, Zhu J, He C, Gao Y, Yan J, Wu P (2001) Impact of epistasis and QTL×environment interaction on the developmental behavior of plant height in rice (*Oryza sativa* L.). Theor Appl Genet 103:153-160
- Chandler PM, Marion-Poll A, Ellis M, Gubler F (2002) Mutants at the Slender1 locus of barley cv Himalaya. Molecular and physiological characterization. Plant Physiol 129:181-190
- Chen L, Phillips AL, Condon AG, Parry MA, Hu YG (2013) GA-responsive dwarfing gene *Rht12* affects the developmental and agronomic traits in common bread wheat. PloS one 8:e62285
- Cho, YG, Eun MY, McCouch SR, Chae YA (1994) The semidwarf gene, *sd-1*, of rice (*Oryza sativa* L.). II. Molecular mapping and marker-assisted selection. Theor Appl Genet 89:54–59
- Clavijo BJ, Venturini L, Schudoma C, Accinelli GG, Kaithakottil G, Wright J, Borrill P, Kettleborough G, Heavens D, Chapman H, Lipscombe J, Barker T, Lu FH, McKenzie N, Raats D, Ramirez-Gonzalez RH, Coince A, Peel N, Percival-Alwyn L, Duncan O, Trosch J, Yu G, Bolser DM, Namaati G, Kerhornou A, Spannagl M, Gundlach H, Haberer G, Davey RP, Fosker C, Palma FD, Phillips AL, Millar AH, Kersey PJ, Uauy C, Krasileva KV, Swarbreck D, Bevan MW, Clark MD (2017) An improved assembly and annotation of the allohexaploid wheat genome identifies complete families of agronomic genes and provides genomic evidence for chromosomal translocations. Genome Res 27:885-896
- Colebrook EH, Thomas SG, Phillips AL, Hedden P (2014) The role of gibberellin signalling in plant responses to abiotic stress. J Exp Biol 217:67-75
- Collins A, Ke X (2012) Primer1: Primer Design Web Service for Tetra-Primer ARMS-PCR. Open Bioinforma J 6:55-58
- Cui F, Li J, Ding A, Zhao C, Wang L, Wang X, Li S, Bao Y, Li X, Feng D, Kong L, Wang H (2011) Conditional QTL mapping for plant height with respect to the length of the spike and internode in two mapping populations of wheat. Theor Appl Genet 122:1517-1536
- Dai C, Xue H-W (2010) Rice early flowering1, a CKI, phosphorylates DELLA protein SLR1 to negatively regulate gibberellin signalling. EMBO J 29:1916-1927
- Davière J-M, Achard P (2013) Gibberellin signaling in plants. Development 140:1147-1151
- de Mendiburu F (2019) agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research. R Package Version 1.3-0
- Devos KM, Atkinson MD, Chinoy CN, Francis HA, Harcourt RL, Koebner RM, Liu CJ, Masojc P, Xie DX, Gale MD (1993) Chromosomal rearrangements in the rye genome relative to that of wheat. Theor Appl Genet 85:673-680
- Dunnett CW (1955) A Multiple Comparison Procedure for Comparing Several Treatments with a Control. J Am Stat Assoc 50:1096-1121
- FAOSTAT (2018) Statistics database of the Food and Agriculture Organisation of the United Nations (FAO), Production, Crops, URL: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>

- Ford BA, Foo E, Sharwood R, Karafiatova M, Vrana J, MacMillan C, Nichols DS, Steuernagel B, Uauy C, Dolezel J, Chandler PM, Spielmeier W (2018) *Rht18* Semidwarfism in Wheat Is Due to Increased GA 2-oxidaseA9 Expression and Reduced GA Content. *Plant Physiol* 177:168-180
- Fournier C, Andrieu B (2000) Dynamics of the Elongation of Internodes in Maize (*Zea mays* L.): Analysis of Phases of Elongation and their Relationships to Phytomer Development. *Ann Bot* 86:551-563
- Gascuel O (1997) BIONJ: an improved version of the NJ algorithm based on a simple model of sequence data. *Mol Biol Evol* 14:685-695
- Geiger HH, Miedaner T (2009) Rye breeding. In Carena MJ, ed, *Cereals (Handbook of plant breeding)*, 1 edn. Springer New York, pp 151-181
- Geiger HH, Schnell FW (1970) Breeding rye varieties from inbred lines: I. Selfing-proportions in polycross progenies. *Theor Appl Genet* 40:305-311
- Gomi K, Matsuoka M (2003) Gibberellin signalling pathway. *Curr Opin Plant Biol* 6:489-493
- Gowda M, Hahn V, Reif JC, Longin CFH, Alheit K, Maurer HP (2011) Potential of simultaneous improvement of grain and biomass yield in Central European winter triticale germplasm. *Field Crops Res* 121:153-157
- Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, Levin JZ, Thompson DA, Amit I, Adiconis X, Fan L, Raychowdhury R, Zeng Q, Chen Z, Mauceli E, Hacohen N, Gnirke A, Rhind N, di Palma F, Birren BW, Nusbaum C, Lindblad-Toh K, Friedman N, Regev A (2011) Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nat Biotechnol* 29:644-652
- Hackauf B, Bauer E, Korzun V, Miedaner T (2017a) Fine mapping of the restorer gene *Rfp3* from an Iranian primitive rye (*Secale cereale* L.). *Theor Appl Genet* 130:1179-1189
- Hackauf B, Haffke S, Fromme FJ, Roux SR, Kusterer B, Musmann D, Kilian A, Miedaner T (2017b) QTL mapping and comparative genome analysis of agronomic traits including grain yield in winter rye. *Theor Appl Genet* 130:1801-1817
- Hackauf B, Korzun V, Wortmann H, Wilde P, Wehling P (2012) Development of conserved ortholog set markers linked to the restorer gene *Rfp1* in rye. *Mol Breeding* 30:1507-1518
- Hackauf B, Rudd S, van der Voort JR, Miedaner T, Wehling P (2009) Comparative mapping of DNA sequences in rye (*Secale cereale* L.) in relation to the rice genome. *Theor Appl Genet* 118:371-384
- Hackauf B, Wehling P (2005) Approaching the self incompatibility locus *Z* in rye (*Secale cereale* L.) via comparative genetics. *Theor Appl Genet* 110:832-845
- Haque MA, Martinek P, Watanabe N, Kuboyama T (2011) Genetic mapping of gibberellic acid-sensitive genes for semi-dwarfism in durum wheat. *Cereal Res Commun* 39:171-178
- Haseneyer G, Schmutzer T, Seidel M, Zhou R, Mascher M, Schon CC, Taudien S, Scholz U, Stein N, Mayer KF, Bauer E (2011) From RNA-seq to large-scale genotyping - genomics resources for rye (*Secale cereale* L.). *BMC Plant Biol* 11:131
- Hausmann B, Parzies H, Prestler T, Susic Z, Miedaner T (2004) Plant genetic resources in crop improvement. *Plant Genetic Resources* 2:3-21
- Hedden P (2003) The genes of the Green Revolution. *Trends Genet* 19:5-9
- Hedden P, Sponsel V (2015) A Century of Gibberellin Research. *J Plant Growth Regul* 34:740-760
- Hedden P, Thomas SG (2012) Gibberellin biosynthesis and its regulation. *Biochem J* 444:11-25

- Hirano K, Aya K, Hobo T, Sakakibara H, Kojima M, Shim RA, Hasegawa Y, Ueguchi-Tanaka M, Matsuoka M (2008) Comprehensive transcriptome analysis of phytohormone biosynthesis and signaling genes in microspore/pollen and tapetum of rice. *Plant Cell Physiol* 49:1429-1450
- Hoseinzadeh P, Zhou R, Mascher M, Himmelbach A, Niks RE, Schweizer P, Stein N (2019) High Resolution Genetic and Physical Mapping of a Major Powdery Mildew Resistance Locus in Barley. *Front Plant Sci* 10:146
- Hothorn T, Bretz F, Westfall P (2008) Simultaneous inference in general parametric models. *Biom J* 50:346-363
- Hu B, Jin J, Guo A-Y, Zhang H, Luo J, Gao G (2014) GSDS 2.0: an upgraded gene feature visualization server. *Bioinformatics* 31:1296-1297
- Huang CK, Sie YS, Chen YF, Huang TS, Lu CA (2016) Two highly similar DEAD box proteins, OsRH2 and OsRH34, homologous to eukaryotic initiation factor 4AIII, play roles of the exon junction complex in regulating growth and development in rice. *BMC Plant Biol* 16:84
- Huang Y, Wang X, Ge S, Rao GY (2015) Divergence and adaptive evolution of the gibberellin oxidase genes in plants. *BMC Evol Biol* 15:207
- Ikeda A, Ueguchi-Tanaka M, Sonoda Y, Kitano H, Koshioka M, Futsuhara Y, Matsuoka M, Yamaguchi J (2001) slender rice, a constitutive gibberellin response mutant, is caused by a null mutation of the *SLR1* gene, an ortholog of the height-regulating gene *GAI/RGA/RHT/D8*. *Plant Cell* 13:999-1010
- International Rice Genome Sequencing P (2005) The map-based sequence of the rice genome. *Nature* 436:793-800
- James GV, Patel V, Nordstrom KJ, Klasen JR, Salome PA, Weigel D, Schneeberger K (2013) User guide for mapping-by-sequencing in Arabidopsis. *Genome Biol* 14:R61
- Jia J, Zhao S, Kong X, Li Y, Zhao G, He W, Appels R, Pfeifer M, Tao Y, Zhang X, Jing R, Zhang C, Ma Y, Gao L, Gao C, Spannagl M, Mayer KF, Li D, Pan S, Zheng F, Hu Q, Xia X, Li J, Liang Q, Chen J, Wicker T, Gou C, Kuang H, He G, Luo Y, Keller B, Xia Q, Lu P, Wang J, Zou H, Zhang R, Xu J, Gao J, Middleton C, Quan Z, Liu G, Wang J, International Wheat Genome Sequencing C, Yang H, Liu X, He Z, Mao L, Wang J (2013) *Aegilops tauschii* draft genome sequence reveals a gene repertoire for wheat adaptation. *Nature* 496:91-95
- Jia Q, Zhang J, Westcott S, Zhang X-Q, Bellgard M, Lance R, Li C (2009) GA-20 oxidase as a candidate for the semidwarf gene *sdw1/denso* in barley. *Funct Integr Genomic* 9:255-262
- Kalih R, Maurer HP, Hackauf B, Miedaner T (2014) Effect of a rye dwarfing gene on plant height, heading stage, and Fusarium head blight in triticale (*×Triticosecale* Wittmack). *Theor Appl Genet* 127:1527–1536
- Kantarek Z, Masojc P, Bienias A, Milczarski P (2018) Identification of a novel, dominant dwarfing gene (*Ddw4*) and its effect on morphological traits of rye. *PLoS one* 13:e0199335
- Khalil HB, Ehdaei MR, Xu Y, Laroche A, Gulick PJ (2015) Identification and characterization of rye genes not expressed in allohexaploid triticale. *BMC Genomics* 16:281
- Kibbe WA (2007) OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Res* 35:W43-46
- Kicherer S, Backes G, Walther U, Jahoor A (2000) Localising QTLs for leaf rust resistance and agronomic traits in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor Appl Genet* 100:881-888
- Kilian B, Özkan H, Pozzi C, Salamini F (2009) Domestication of the Triticeae in the Fertile Crescent. In Muehlbauer GJ, Feuillet C, eds, *Genetics and Genomics of the Triticeae*. Springer US, New York, NY, pp 81-119

- King RW, Wardlaw IF, Evans LT (1967) Effect of assimilate utilization on photosynthetic rate in wheat. *Planta* 77:261-276
- Kobylyanski VD (1972) On the genetics of the dominant factor of short-strawed rye. *Genetika* 8:12-17
- Kobylyanski VD, Babudzhina DI (2007) International Symposium on Rye Breeding & Genetics, pp 62-65
- Korzun V, Börner A, Melz G (1996) RFLP mapping of the dwarfing (*Ddw1*) and hairy peduncle (*Hp*) genes on chromosome 5 of rye (*Secale cereale* L.). *Theor Appl Genet* 92:1073-1077
- Korzun V, Röder M, Worland AJ, Börner A (1997) Intrachromosomal mapping of genes for dwarfing (*Rht12*) and vernalization response (*Vrn1*) in wheat by using RFLP and microsatellite markers. *Plant Breeding* 116:227-232
- Kosambi DD (1943) The estimation of map distances from recombination values. *Ann Eugen* 12:172-175
- Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biol Evol* 33:1870-1874
- Laidig F, Piepho HP, Rentel D, Drobek T, Meyer U, Huesken A (2017) Breeding progress, variation, and correlation of grain and quality traits in winter rye hybrid and population varieties and national on-farm progress in Germany over 26 years. *Theor Appl Genet* 130:981-998
- Lancashire PD, Bleiholder RH, Langelüddecke EP, Stauss R, van den Boom T, Weber E, Witzemberger KA (1991) An uniform decimal code for growth stages of crops and weeds. *Ann Appl Biol* 119:561-601
- Lao NT, Long D, Kiang S, Coupland G, Shoue DA, Carpita NC, Kavanagh TA (2003) Mutation of a family 8 glycosyltransferase gene alters cell wall carbohydrate composition and causes a humidity-sensitive semi-sterile dwarf phenotype in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* 53:647-661
- Laurie DA, Pratchett N, Romero C, Simpson E, Snape J (2006) Assignment of the denso Dwarfing Gene to the Long Arm of Chromosome 3(3H) of Barley by Use of RFLP Markers. *Plant Breeding* 11:198-203
- Law CN, Snape JW, Worland AJ (1978) The genetic relationship between height and yield in wheat. *Heredity* 40:15-20
- Limin AE, Fowler DB (1987) Cold hardiness of forage grasses grown on the Canadian prairies. *Can J Plant Sci* 67:1111-1115
- Ling HQ, Zhao S, Liu D, Wang J, Sun H, Zhang C, Fan H, Li D, Dong L, Tao Y, Gao C, Wu H, Li Y, Cui Y, Guo X, Zheng S, Wang B, Yu K, Liang Q, Yang W, Lou X, Chen J, Feng M, Jian J, Zhang X, Luo G, Jiang Y, Liu J, Wang Z, Sha Y, Zhang B, Wu H, Tang D, Shen Q, Xue P, Zou S, Wang X, Liu X, Wang F, Yang Y, An X, Dong Z, Zhang K, Zhang X, Luo MC, Dvorak J, Tong Y, Wang J, Yang H, Li Z, Wang D, Zhang A, Wang J (2013) Draft genome of the wheat A-genome progenitor *Triticum urartu*. *Nature* 496:87-90
- Liu G, Zhang K, Ai J, Deng X, Hong Y, Wang X (2015) Patatin-related phospholipase A, pPLAIIIalpha, modulates the longitudinal growth of vegetative tissues and seeds in rice. *J Exp Bot* 66:6945-6955
- Liu W, Gowda M, Reif JC, Hahn V, Ruckelshausen A, Weissmann EA, Maurer HP, Würschum T (2014) Genetic dynamics underlying phenotypic development of biomass yield in triticale. *BMC Genomics* 15:458
- Lo SF, Ho TD, Liu YL, Jiang MJ, Hsieh KT, Chen KT, Yu LC, Lee MH, Chen CY, Huang TP, Kojima M, Sakakibara H, Chen LJ, Yu SM (2017) Ectopic expression of specific GA2 oxidase mutants promotes yield and stress tolerance in rice. *Plant Biotechnol J* 15:850-864

- Love MI, Huber W, Anders S (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 15:550
- Lundqvist A (1956) Self-incompatibility in rye. *Hereditas* 42:293-348
- Luo MC, Gu YQ, Puiu D, Wang H, Twardziok SO, Deal KR, Huo N, Zhu T, Wang L, Wang Y, McGuire PE, Liu S, Long H, Ramasamy RK, Rodriguez JC, Van SL, Yuan L, Wang Z, Xia Z, Xiao L, Anderson OD, Ouyang S, Liang Y, Zimin AV, Pertea G, Qi P, Bennetzen JL, Dai X, Dawson MW, Muller HG, Kugler K, Rivarola-Duarte L, Spannagl M, Mayer KFX, Lu FH, Bevan MW, Leroy P, Li P, You FM, Sun Q, Liu Z, Lyons E, Wicker T, Salzberg SL, Devos KM, Dvorak J (2017) Genome sequence of the progenitor of the wheat D genome *Aegilops tauschii*. *Nature* 551:498-502
- Lüpken T, Stein N, Perovic D, Habekuss A, Kramer I, Hahnel U, Steuernagel B, Scholz U, Zhou R, Ariyadasa R, Taudien S, Platzer M, Martis M, Mayer K, Friedt W, Ordon F (2013) Genomics-based high-resolution mapping of the BaMMV/BaYMV resistance gene *rym11* in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor Appl Genet* 126:1201-1212
- Madeira F, Park YM, Lee J, Buso N, Gur T, Madhusoodanan N, Basutkar P, Tivey ARN, Potter SC, Finn RD, Lopez R (2019) The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Res* 47:W636-W641
- Magome H, Nomura T, Hanada A, Takeda-Kamiya N, Ohnishi T, Shinma Y, Katsumata T, Kawaide H, Kamiya Y, Yamaguchi S (2013) CYP714B1 and CYP714B2 encode gibberellin 13-oxidases that reduce gibberellin activity in rice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 110:1947-1952
- Manning KS, Cooper TA (2017) The roles of RNA processing in translating genotype to phenotype. *Nat Rev Mol Cell Biol* 18:102-114
- Martis MM, Zhou R, Haseneyer G, Schmutzer T, Vrana J, Kubalaková M, König S, Kugler KG, Scholz U, Hackauf B, Korzun V, Schon CC, Dolezel J, Bauer E, Mayer KF, Stein N (2013) Reticulate evolution of the rye genome. *Plant Cell* 25:3685-3698
- Mascher M, Gundlach H, Himmelbach A, Beier S, Twardziok SO, Wicker T, Radchuk V, Dockter C, Hedley PE, Russell J, Bayer M, Ramsay L, Liu H, Haberer G, Zhang XQ, Zhang Q, Barrero RA, Li L, Taudien S, Groth M, Felder M, Hastie A, Simkova H, Stankova H, Vrana J, Chan S, Munoz-Amatriain M, Ounit R, Wanamaker S, Bolser D, Colmsee C, Schmutzer T, Aliyeva-Schnorr L, Grasso S, Tanskanen J, Chailyan A, Sampath D, Heavens D, Clissold L, Cao S, Chapman B, Dai F, Han Y, Li H, Li X, Lin C, McCooke JK, Tan C, Wang P, Wang S, Yin S, Zhou G, Poland JA, Bellgard MI, Borisjuk L, Houben A, Dolezel J, Ayling S, Lonardi S, Kersey P, Langridge P, Muehlbauer GJ, Clark MD, Caccamo M, Schulman AH, Mayer KFX, Platzer M, Close TJ, Scholz U, Hansson M, Zhang G, Braumann I, Spannagl M, Li C, Waugh R, Stein N (2017) A chromosome conformation capture ordered sequence of the barley genome. *Nature* 544:427-433
- Mascher M, Jost M, Kuon JE, Himmelbach A, Assfalg A, Beier S, Scholz U, Graner A, Stein N (2014) Mapping-by-sequencing accelerates forward genetics in barley. *Genome Biol* 15:R78
- Masojc P, Milczarski P, Kruszona P (2017) Comparative analysis of genetic architectures for nine developmental traits of rye. *J Appl Genet* 58:297-305
- Matsumoto T, Tanaka T, Sakai H, Amano N, Kanamori H, Kurita K, Kikuta A, Kamiya K, Yamamoto M, Ikawa H, Fujii N, Hori K, Itoh T, Sato K (2011) Comprehensive sequence analysis of 24,783 barley full-length cDNAs derived from 12 clone libraries. *Plant Physiol* 156:20-28
- Mayer KF, Martis M, Hedley PE, Simkova H, Liu H, Morris JA, Steuernagel B, Taudien S, Roessner S, Gundlach H, Kubalaková M, Suchanková P, Murat F, Felder M, Nussbaumer T, Graner A, Salse J, Endo T, Sakai H, Tanaka T, Itoh T, Sato K, Platzer M, Matsumoto T, Scholz U, Dolezel J, Waugh R, Stein N (2011) Unlocking the barley genome by chromosomal and comparative genomics. *Plant Cell* 23:1249-1263

- Mayer K, Rogers J, Dolezel J, Pozniak C, Eversole K, Feuillet C, Gill B, Friebe B, Lukaszewski AJ, Sourdille P, Tr E, Kubaláková M, Cíhalíková J, Dubska Z, Vrana J, Sperkova R, Simkova H, Febrer M, Catchpole L, Praud S (2014) A chromosome-based draft sequence of the hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum*) genome (IWGSC). *Science* 345:1251788
- McLeod G, Gan YT, Payne JF (2000) AC Remington winter rye. *Can J Plant Sci* 80:605-607
- Medrano RF, de Oliveira CA (2014) Guidelines for the tetra-primer ARMS-PCR technique development. *Mol Biotechnol* 56:599-608
- Melz G (1989) Beiträge zu Genetik des Roggens (*Secale cereale* L.). Akad d Landwirtschaftswiss d DDR, Berlin, Dissertation
- Michelmore RW, Paran I, Kesseli RV (1991) Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:9828-9832
- Middleton CP, Senerchia N, Stein N, Akhunov ED, Keller B, Wicker T, Kilian B (2014) Sequencing of chloroplast genomes from wheat, barley, rye and their relatives provides a detailed insight into the evolution of the Triticeae tribe. *PLoS one* 9:e85761
- Miedaner T, Haffke S, Siekmann D, Fromme FJ, Roux S, Hackauf B (2018) Dynamic quantitative trait loci (QTL) for plant height predict biomass yield in hybrid rye (*Secale cereale* L.). *Biomass Bioenergy* 115:10-18
- Miedaner T, Hubner M, Korzun V, Schmiedchen B, Bauer E, Haseneyer G, Wilde P, Reif JC (2012) Genetic architecture of complex agronomic traits examined in two testcross populations of rye (*Secale cereale* L.). *BMC Genomics* 13:706
- Miedaner T, Müller BU, Piepho H-P, Falke C (2011) Genetic architecture of plant height in winter rye introgression libraries. *Plant Breeding* 130:209-216
- Milach S, Federizzi L (2001) Dwarfing genes in plant improvement. *Adv Agron* 73:35-63
- Milach S, Rines HW, Phillips RL (1997) Molecular genetic mapping of dwarfing genes in oat. *Theor Appl Genet* 95:783-790
- Monna L, Kitazawa N, Yoshino R, Suzuki J, Masuda H, Maehara Y, Tanji M, Sato M, Nasu S, Minobe Y (2002) Positional cloning of rice semidwarfing gene, *sd-1*: rice "green revolution gene" encodes a mutant enzyme involved in gibberellin synthesis. *DNA Res* 9:11-17
- Mugwira LM, Elgawhary SM, Patel KI (1976) Differential Tolerances of Triticale, Wheat, Rye, and Barley to Aluminum in Nutrient Solution. *Agronomy J* 68:782-787
- Nalborczyk E, Nalborczyk T, Wawrzonowska B (1981) Models of photosynthetic activity in cereals. In Akoyunoglou G, ed, *Photosynthesis, VI Photosynthesis, Productivity and Environment*. Balaban International Science Services, Philadelphia, USA, pp 97-106
- Nota B (2017) Gogadget: An R Package for Interpretation and Visualization of GO Enrichment Results. *Mol Inform* 36
- Ostrowski M, Jakubowska A (2014) Udp-Glycosyltransferases of Plant Hormones. *Advances in Cell Biology* 4:43
- Panchy N, Lehti-Shiu M, Shiu SH (2016) Evolution of Gene Duplication in Plants. *Plant Physiol* 171:2294-2316
- Pandit A, Rai V, Bal S, Sinha S, Kumar V, Chauhan M, Gautam RK, Singh R, Sharma PC, Singh AK, Gaikwad K, Sharma TR, Mohapatra T, Singh NK (2010) Combining QTL mapping and transcriptome profiling of bulked RILs for identification of functional polymorphism for salt tolerance genes in rice (*Oryza sativa* L.). *Mol Genet Genom* 284:121-136

- Pankin A, Campoli C, Dong X, Kilian B, Sharma R, Himmelbach A, Saini R, Davis SJ, Stein N, Schneeberger K, von Korff M (2014) Mapping-by-sequencing identifies HvPHYTOCHROME C as a candidate gene for the early maturity 5 locus modulating the circadian clock and photoperiodic flowering in barley. *Genetics* 198:383-396
- Pearce S, Huttly AK, Prosser IM, Li YD, Vaughan SP, Gallova B, Patil A, Coghill JA, Dubcovsky J, Hedden P, Phillips AL (2015) Heterologous expression and transcript analysis of gibberellin biosynthetic genes of grasses reveals novel functionality in the GA3ox family. *BMC Plant Biol* 15:130
- Peng J, Richards DE, Hartley NM, Murphy GP, Devos KM, Flintham JE, Beales J, Fish LJ, Worland AJ, Pelica F, Sudhakar D, Christou P, Snape JW, Gale MD, Harberd NP (1999) 'Green revolution' genes encode mutant gibberellin response modulators. *Nature* 400:256-261
- Piepho HP, Möhring J (2007) Computing heritability and selection response from unbalanced plant breeding trials. *Genetics* 177:1881-1888
- Plaza-Wüthrich S, Blösch R, Rindisbacher A, Cannarozzi G, Tadele Z (2016) Gibberellin deficiency confers both lodging and drought tolerance in small cereals. *Front Plant Sci* 7
- R Core Team (2017) R: A language and environment for statistical computing, Version 3.4.1, ed R Foundation for Statistical Computing, <https://www.R-project.org>, Vienna, Austria
- Rebetzke GJ, Ellis MH, Bonnett DG, Mickelson B, Condon AG, Richards RA (2012) Height reduction and agronomic performance for selected gibberellin-responsive dwarfing genes in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Field Crops Res* 126:87-96
- Rozen S, Skaletsky H (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 132:365-386
- R Studio Team (2016) RStudio: Integrated Development for R. Version 1.0.153, ed RStudio Inc., Boston, MA, USA
- Sasaki A, Ashikari M, Ueguchi-Tanaka M, Itoh H, Nishimura A, Swapan D, Ishiyama K, Saito T, Kobayashi M, Khush GS, Kitano H, Matsuoka M (2002) Green revolution: a mutant gibberellin-synthesis gene in rice. *Nature* 416:701-702
- Sato K, Shin IT, Seki M, Shinozaki K, Yoshida H, Takeda K, Yamazaki Y, Conte M, Kohara Y (2009) Development of 5006 full-length cDNAs in barley: a tool for accessing cereal genomics resources. *DNA Res* 16:81-89
- Schlicker A, Domingues FS, Rahnenfuhrer J, Lengauer T (2006) A new measure for functional similarity of gene products based on Gene Ontology. *BMC Bioinform* 7:302
- Schneeberger K, Weigel D (2011) Fast-forward genetics enabled by new sequencing technologies. *Trends Plant Sci* 16:282-288
- Schwechheimer C (2012) Gibberellin signaling in plants - the extended version. *Front Plant Sci* 2:107
- Schwechheimer C (2014) Gibberellin – Mechanism of Action. In eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester
- Schwefel K (2015) Entwicklung von PCR-Primern zur Amplifikation und Kartierung von Genen der Gibberellinbiosynthese und –signaltransduktion im Winterroggen (*Secale cereale* L.). Institut für Biowissenschaften, Abteilung Pflanzengenetik, Universität Rostock, Masterarbeit
- Sencer HA, Hawkes JG (2008) On the origin of cultivated rye. *Biol J Linn Soc* 13:299-313
- Ševčíková H, Mašková P, Tarkowská D, Mašek T, Lipavská H (2017) Carbohydrates and gibberellins relationship in potato tuberization. *Journal of plant physiology* 214:53-63
- Spielmeyer W, Ellis MH, Chandler PM (2002) Semidwarf (*sd-1*), "green revolution" rice, contains a defective gibberellin 20-oxidase gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:9043-9048

- Stanke M, Diekhans M, Baertsch R, Haussler D (2008) Using native and syntenically mapped cDNA alignments to improve de novo gene finding. *Bioinformatics* 24:637-644
- Stein N, Herren G, Keller B (2001) A new DNA extraction method for high-throughput marker analysis in a large-genome species such as *Triticum aestivum*. *Plant Breeding* 120:354-356
- Sue M, Nakamura C, Nomuar T (2011) Dispersed Benzoxazinone Gene Cluster: Molecular Characterization and Chromosomal Localization of Glucosyltransferase and Glucosidase Genes in Wheat and Rye. *Plant Physiol* 157:985-997
- Sun L, Yang W, Li Y, Shan Q, Ye X, Wang D, Yu K, Lu W, Xin P, Pei Z, Guo X, Liu D, Sun J, Zhan K, Chu J, Zhang A (2019) A wheat dominant dwarfing line with *Rht12*, which reduces stem cell length and affects gibberellic acid synthesis, is a 5AL terminal deletion line. *Plant J* 97:887-900
- Supek F, Bošnjak M, Škunca N, Šmuc T (2011) REVIGO summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms. *PloS one* 6:e21800
- Sutka J, Kovács G (1987) Chromosomal Location of Dwarfing Gene *Rht12* in Wheat. *Euphytica* 36:521-523
- Tambussi EA, Bort J, Guiamet JJ, Nogués S, Araus JL (2007) The Photosynthetic Role of Ears in C3 Cereals: Metabolism, Water Use Efficiency and Contribution to Grain Yield. *Crit Rev Plant Sci* 26:1-16
- Tamura K, Nei M (1993) Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol* 10:512-526
- Tenhola-Roininen T, Tanhuanpää P (2010) Tagging the dwarfing gene *Ddw1* in a rye population derived from doubled haploid parents. *Euphytica* 172:303-312
- The Gene Ontology Consortium (2019) The Gene Ontology Resource: 20 years and still GOing strong. *Nucleic Acids Res* 47:D330-D338
- Thomas WTB, Powell W, Wood W (1984) The chromosomal location of the dwarfing gene present in the spring barley variety Golden Promise. *Heredity* 53:177-183
- Tian X, Wen W, Xie L, Fu L, Xu D, Fu C, Wang D, Chen X, Xia X, Chen Q, He Z, Cao S (2017) Molecular Mapping of Reduced Plant Height Gene *Rht24* in Bread Wheat. *Front Plant Sci* 8:1379-1388
- Torop AA, Dedyayev VG, Tschaykin VV, Dokuchaev VV (2003) The results of rye breeding in the Central-Chernosem Region of Russia. *Plant Breed Seed Sci* 47:69-75
- Van Ooijen JW (2006) JoinMap[®] 4: Software for the calculation of genetic linkage maps in experimental populations. In B.V. K, ed, Wageningen, Netherlands
- Vogel JP, Garvin DF, Mockler TC, Schmutz J, Rokhsar D, Bevan MW, Barry K, Lucas S, Harmon-Smith M, Lail K, Tice H, Schmutz J, Grimwood J, McKenzie N, Bevan MW, Huo N, Gu YQ, Lazo GR, Anderson OD, Vogel JP, You FM, Luo M-C, Dvorak J, Wright J, Febrer M, Bevan MW, Idziak D, Hasterok R, Garvin DF, Lindquist E, Wang M, Fox SE, Priest HD, Filichkin SA, Givan SA, Bryant DW, Chang JH, Mockler TC, Wu H, Wu W, Hsia A-P, Schnable PS, Kalyanaraman A, Barbazuk B, Michael TP, Hazen SP, Bragg JN, Laudencia-Chingcuanco D, Vogel JP, Garvin DF, Weng Y, McKenzie N, Bevan MW, Haberer G, Spannagl M, Mayer K, Rattei T, Mitros T, Rokhsar D, Lee S-J, Rose JKC, Mueller LA, York TL, Wicker T, Buchmann JP, Tanskanen J, Schulman AH, Gundlach H, Wright J, Bevan M, Costa de Oliveira A, da C. Maia L, Belknap W, Gu YQ, Jiang N, Lai J, Zhu L, Ma J, Sun C, Pritham E, Salse J, Murat F, Abrouk M, Haberer G, Spannagl M, Mayer K, Bruggmann R, Messing J, You FM, Luo M-C, Dvorak J, Fahlgren N, Fox SE, Sullivan CM, Mockler TC, Carrington JC, Chapman EJ, May GD, Zhai J, Ganssmann M, Guna Ranjan Gurazada S, German M, Meyers BC, Green PJ, Bragg JN, Tyler L, Wu J, Gu YQ, Lazo GR, Laudencia-Chingcuanco D, Thomson J, Vogel JP, Hazen SP, Chen S, Scheller HV, Harholt J, Ulvskov P, Fox SE, Filichkin SA, Fahlgren N, Kimbrel JA, Chang JH, Sullivan CM, Chapman EJ, Carrington JC,

- Mockler TC, Bartley LE, Cao P, Jung K-H, Sharma MK, Vega-Sanchez M, Ronald P, Dardick CD, De Bodt S, Verelst W, Inzé D, Heese M, Schnittger A, Yang X, Kalluri UC, Tuskan GA, Hua Z, Vierstra RD, Garvin DF, Cui Y, Ouyang S, Sun Q, Liu Z, Yilmaz A, Grotewold E, Sibout R, Hematy K, Mouille G, Höfte H, Michael T, Pelloux J, O'Connor D, Schnable J, Rowe S, Harmon F, Cass CL, Sedbrook JC, Byrne ME, Walsh S, Higgins J, Bevan M, Li P, Brutnell T, Unver T, Budak H, Belcram H, Charles M, Chalhoub B, Baxter I, The International Brachypodium I, Principal i, sequencing DNA, assembly, Pseudomolecule a, sequencing BACe, Transcriptome s, analysis, Gene a, annotation, Repeats a, Comparative g, Small RNAa, Manual a, gene family a (2010) Genome sequencing and analysis of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Nature* 463:763-768
- Voorrips RE (2002) MapChart: software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *The J Hered* 93:77-78
- Wang S, Wong D, Forrest K, Allen A, Chao S, Huang BE, Maccaferri M, Salvi S, Milner SG, Cattivelli L, Mastrangelo AM, Whan A, Stephen S, Barker G, Wieseke R, Plieske J, International Wheat Genome Sequencing C, Lillemo M, Mather D, Appels R, Dolferus R, Brown-Guedira G, Korol A, Akhunova AR, Feuillet C, Salse J, Morgante M, Pozniak C, Luo MC, Dvorak J, Morell M, Dubcovsky J, Ganai M, Tuberosa R, Lawley C, Mikoulitch I, Cavanagh C, Edwards KJ, Hayden M, Akhunov E (2014) Characterization of polyploid wheat genomic diversity using a high-density 90,000 single nucleotide polymorphism array. *Plant Biotechnol J* 12:787-796
- Wheelan SJ, Church DM, Ostell JM (2001) Spidey: a tool for mRNA-to-genomic alignments. *Genome Res* 11:1952-1957
- Wicker T, Sabot F, Hua-Van A, Bennetzen JL, Capy P, Chalhoub B, Flavell A, Leroy P, Morgante M, Panaud O, Paux E, SanMiguel P, Schulman AH (2007) A unified classification system for eukaryotic transposable elements. *Nat Rev Genet* 8:973-982
- Wickham H (2016) ggplot2: Elegant graphics for data analysis. Springer-Verlag New York
- Wolski T, Gryka J (1996) Semidwarf Winter Triticale. In Guedes-Pinto H, Darvey N, Carnide VP, eds, *Triticale: Today and Tomorrow*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 581-587
- Worland AJ, Korzun V, Röder MS, Ganai MW, Law CN (1998) Genetic analysis of the dwarfing gene *Rht8* in wheat. Part II. The distribution and adaptive significance of allelic variants at the *Rht8* locus of wheat as revealed by microsatellite screening. *Theor Appl Genet* 96:1110-1120
- Wricke G (1969) Investigations on the inheritance of self-fertility in rye (*Secale cereale*). *Theor Appl Genet* 39:371-378
- Würschum T, Liu W, Alheit KV, Tucker MR, Gowda M, Weissmann EA, Hahn V, Maurer HP (2014a) Adult plant development in triticale (x *Triticosecale* Wittmack) is controlled by dynamic genetic patterning of regulation. *G3* 4:1585-1591
- Würschum T, Liu W, Busemeyer L, Tucker MR, Reif JC, Weissmann EA, Hahn V, Ruckelshausen A, Maurer HP (2014b) Mapping dynamic QTL for plant height in triticale. *BMC Genet* 15:59
- You FM, Huo N, Gu YQ, Luo MC, Ma Y, Hane D, Lazo GR, Dvorak J, Anderson OD (2008) BatchPrimer3: a high throughput web application for PCR and sequencing primer design. *BMC Bioinform* 9:253
- Young MD, Wakefield MJ, Smyth GK, Oshlack A (2010) Gene ontology analysis for RNA-seq: accounting for selection bias. *Genome Biol* 11:R14
- Yue H, Shu D, Wang M, Xing G, Zhan H, Du X, Song W, Nie X (2018) Genome-Wide Identification and Expression Analysis of the HD-Zip Gene Family in Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Genes* 9
- Zawada AM, Rogacev KS, Muller S, Rotter B, Winter P, Fliser D, Heine GH (2014) Massive analysis of cDNA Ends (MACE) and miRNA expression profiling identifies proatherogenic pathways in chronic kidney disease. *Epigenetics* 9:161-172

Zhao J (2015) Phospholipase D and phosphatidic acid in plant defence response: from protein-protein and lipid-protein interactions to hormone signalling. *J. Exp. Bot* 66:1721-1736

6. ANHANG

6.1. Abbildungen

Schritt	Prozess	Beschreibung
1	R1620 <i>ddw1ddw1</i> x R347/1 <i>Ddw1Ddw1</i>	Kreuzung einer langen Wildtyp-EP mit einer Halbzweig-EP
2	F1 (X) <i>Ddw1ddw1</i>	Selbstung
3	F2 SP (X) <i>Ddw1Ddw1 Ddw1/ddw1 ddw1ddw1</i>	Selbstung von Halbzweig F2 EP
4	F3 L (X) <i>Ddw1Ddw1 Ddw1/ddw1 ddw1ddw1</i>	Selbstung von Halbzweig F3 EP
A 5	F4 L (X) <i>Ddw1Ddw1 Ddw1/ddw1 ddw1ddw1</i>	MAS von <i>Ddw1ddw1</i> und Selbstung von F4 EP
6	F5 L (X) <i>Ddw1Ddw1 Ddw1/ddw1 ddw1ddw1</i>	RIL Kartierungspopulation MAS und Selbstung von F5 EP
7	F6 L (X) <i>Ddw1Ddw1</i> F6 L (X) <i>ddw1ddw1</i>	Selbstung von F6 EP
8	F7 NIB <i>Ddw1Ddw1</i> F7 NIB <i>ddw1ddw1</i>	Probenahme und Expression Profiling
B 5	F4 L (X) <i>Ddw1Ddw1 Ddw1/ddw1 ddw1ddw1</i>	RIL Kartierungspopulation, N = 697 MAS und Selbstung von F4 EP
6	F5 L (X) <i>Ddw1ddw1</i>	MAS von <i>Ddw1ddw1</i> und Selbstung von F5 EP
7	F6 L (X) <i>Ddw1Ddw1 Ddw1/ddw1 ddw1ddw1</i>	RIL Kartierungspopulation, N = 3929 MAS und Selbstung der rekombinanten und Kontroll F6 EP
8	F7 L (X) <i>Ddw1Ddw1 Ddw1/ddw1 ddw1ddw1</i>	Selbstung von F7 EP

Abbildung A 1 Schematische Übersicht über die Entwicklung der *R1620 x R347/1* Population. (A) Entwicklung zweier nah-isogener Bulks (NIB) als Träger und Nichtträger des Gens *Ddw1* und der NIL-Population ausgehend von der F_1 -Generation der Kreuzung einer langen Wildtyp-Pflanze mit einer Halbzweig-Pflanze. (B) Schritte zum Aufbau der Kartierungspopulation. Die Selektionsschritte erfolgten sowohl phänotypisch, als auch Marker-gestützt. Die Schrift in roter Farbe stellt jeweils die selektierten Nachkommen dar. *Ddw1Ddw1*, *Ddw1ddw1*, *ddw1ddw1* repräsentieren dabei das homozygote Mutanten-, heterozygote Mutanten- oder homozygote Wildtyp-Allel des *Dominant dwarf1 (Ddw1)* Gens. Kreise mit einem Kreuz symbolisieren die Selbstung einer Einzelpflanze. FxEP, FxL repräsentiert eine Einzelpflanze (EP) bzw. Linie (L) in der x-ten Generation.

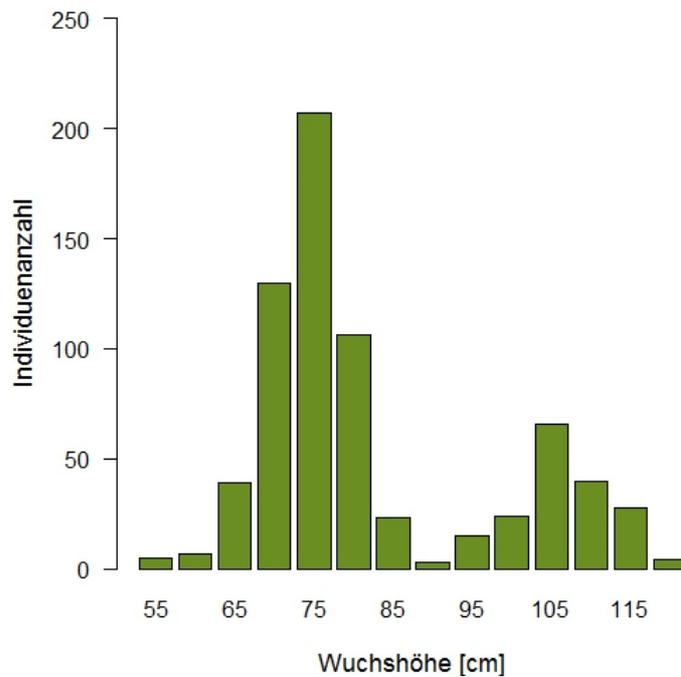


Abbildung A 2 Häufigkeitsverteilung in der für das *Ddw1*-Gen spaltenden $F_{4:5}$ -Population (N = 697) für das Merkmal Wuchshöhe (Abbildung adaptiert aus Braun et al. 2019). Die Population entstammt der Kreuzung *R1620 x 'R347/1*.

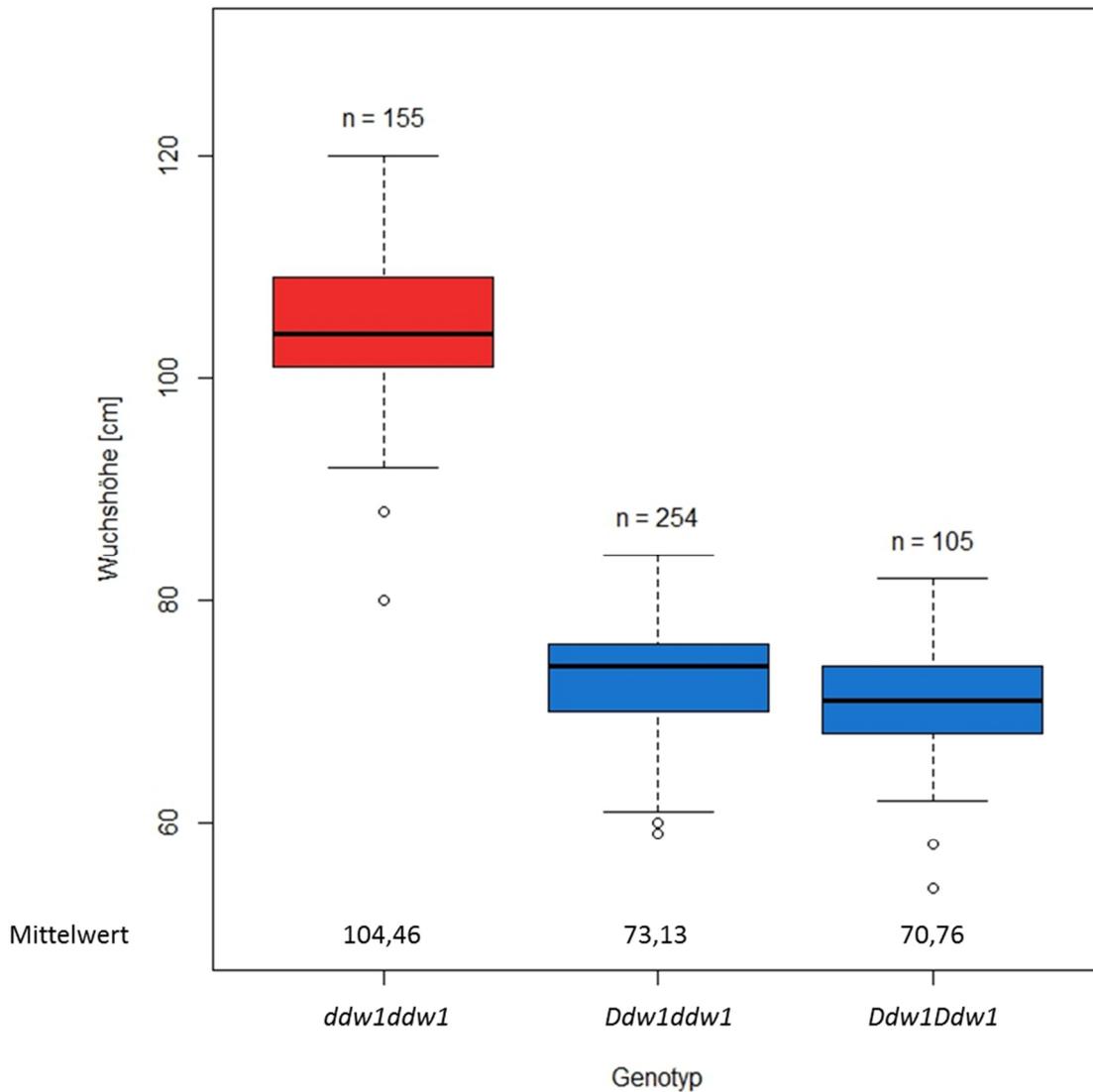


Abbildung A 3 Effekt des Gens *Ddw1* auf die Wuchshöhe in der *R1620 x R347/1* $F_{4:5}$ -Population (adaptiert aus Braun et al. 2019). Die Boxplots zeigen den Median, das obere und untere Quartil und die Whisker der homo- (*Ddw1Ddw1*) und heterozygoten (*Ddw1ddw1*) Halbzwerge, sowie der homozygoten normalwüchsigen (*ddw1ddw1*) Genotypen. Die genetische Konstitution am *Ddw1*-Locus wurde mit den flankierenden Markern *tcos4366* und *c28517* ermittelt. Die Genotypen mit unterschiedlichen Kennbuchstaben (a, b, c) unterscheiden sich auf dem Signifikanzniveau $p < 0,05$.

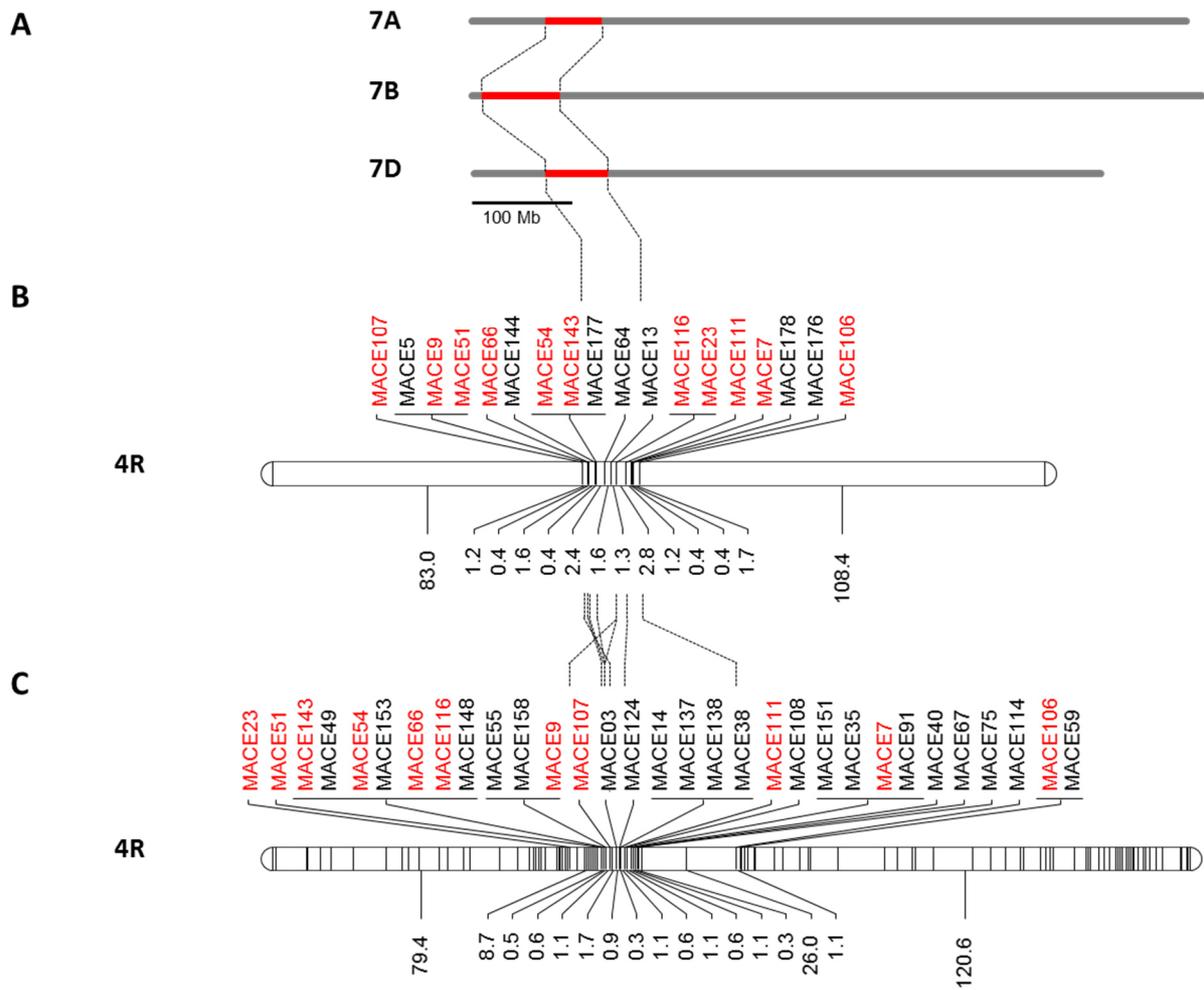


Abbildung A 4 Vergleichende Kartierung der auf Grundlage der Roggentranskripte entwickelten Marker durch Sequenzähnlichkeit **(A)** auf den kurzen Armen der Chromosomen der Gruppe 7 im Weizen, **(B)** auf dem langen Arm des Chromosoms 4R in der hochdichten Karte des Roggens, **(C)** sowie auf Chromosom 4R in der Population *L2039-N x DH* (Martis et al. 2013). Die in beiden Karten identischen Marker sind rot hervorgehoben.

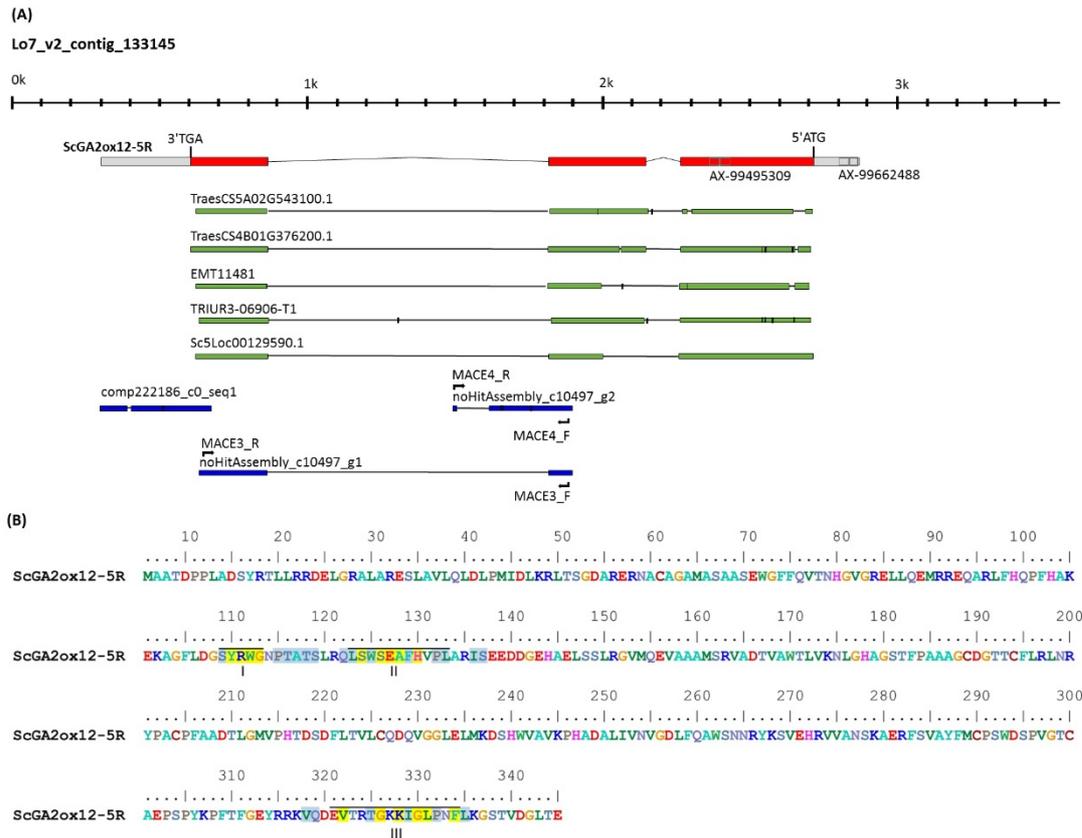


Abbildung A 5 Sequenzalignment für *ScGA2ox12* auf dem *Lo7* Contig 133145 (aus Braun et al. 2019). (A) Eingezeichnet sind Start- und Stopcodon, sowie die Position der SNP-Marker aus dem 600k-Array und die Markerpositionen der *Ddw1*-Marker *MACE3* und *MACE4*. Die grünen Balken repräsentieren die Alignments der cDNA-Sequenzen aus Weizen (*TraesCS5A02G543100* und *TraesCS4B02G376200*), *Aegilops tauschii* (*EMT11481*), *Triticum urartu* (*TRIUR3-06906-T1*) und Roggen (*Sc5Loc00129590.1*). Die blauen Balken stellen die Roggentranskripte dar, die durch Massensequenzierung von cDNA zweier naher-isogener bulks (NIB) aus kurzstrohigen und normalstrohigen *Ddw1*-Genotypen identifiziert wurden. (B) Vorhergesagte Aminosäuresequenz von *ScGA2ox12*. Die römischen Ziffern geben hinweis auf konservierte Motive mit essentieller Funktion bei C20 GA2-Oxidasen, die nach Lo et al. (2017) die Wuchshöhe beeinflussen. Identische und konservierte Aminosäuren sind in gelb und blau hervorgehoben.

6.2. Tabellen

Tabelle A 1 Beobachtete und erwartete Anzahl an Halbzweig- und normalen Phänotypen, sowie ermittelter Chi-Quadrat Wert und dessen Signifikanz basierend auf 9 F_{4:5}-Linienfamilien (R1620 x R347/1).

NIL	N	Beobachteter Phänotyp (n_i)		Erwarteter Phänotyp ($n_{i, Mend}$)		χ^2 -Wert	Signifikanz
		kurz-strohig	normal-strohig	kurz-strohig	normal-strohig		
11-1581	35	27	8	26	9	0,77	ns
11-1582	86	67	19	65	22	0,53	ns
11-1583	71	53	18	53	18	0,95	ns
11-1585	58	45	13	44	15	0,65	ns
11-1586	23	19	4	17	6	0,40	ns
11-1588	116	85	31	87	29	0,67	ns
11-1590	104	78	26	78	26	1,00	ns
11-1591	113	79	34	85	28	0,21	ns
11-1592	91	64	27	68	23	0,30	ns
Σ	697	517	180	523	174	0,60	

NIL: nah-isogene Linie; N: Anzahl; n_j : beobachtete Häufigkeit; $n_{j, Mend}$: erwartete Häufigkeit; Signifikanzlevel

$p < 0,05$; ns: nicht signifikant

Tabelle A 2 Beobachtete und erwartete Anzahl an kurzstrohigen und normalstrohigen Phänotypen, sowie ermittelter Chi-Quadrat Wert und dessen Signifikanz basierend auf 38 F_{5:6}-Linienfamilien (R1620 x R347/1).

NIL	N	Beobachtete Anzahl (n _i)		Erwartete Anzahl (n _{i, Mend})		χ ² -Wert	Signifikanz
		kurz-strohig	normal-strohig	kurz-strohig	normal-strohig		
13-1403	138	48	90	104	35	0,00	ns
13-1404	224	175	49	168	56	0,28	ns
13-1405	139	100	39	104	35	0,41	ns
13-1406	139	108	31	104	35	0,46	ns
13-1407	133	95	38	100	33	0,34	ns
13-1408	130	95	35	98	33	0,61	ns
13-1409	90	70	20	68	23	0,54	ns
13-1410	145	104	41	109	36	0,36	ns
13-1411	101	80	21	76	25	0,33	ns
13-1412	169	135	34	127	42	0,14	ns
13-1413	65	47	18	49	16	0,62	ns
13-1414	105	82	23	79	26	0,46	ns
13-1415	79	60	19	59	20	0,85	ns
13-1416	67	53	14	50	17	0,44	ns
13-1417	169	126	43	127	42	0,89	ns
13-1418	91	70	21	68	23	0,67	ns
13-1419	115	84	31	86	29	0,63	ns
13-1420	85	64	21	64	21	0,95	ns
13-1421	129	95	34	97	32	0,72	ns
13-1422	15	7	8	11	4	0,01	ns
13-1423	91	62	29	68	23	0,13	ns
13-1424	60	40	20	45	15	0,14	ns
13-1425	170	123	47	128	43	0,43	ns
13-1426	87	67	20	65	22	0,66	ns
13-1427	149	113	36	112	37	0,81	ns
13-1428	139	100	39	104	35	0,41	ns
13-1429	94	69	25	71	24	0,72	ns
13-1430	124	96	28	93	31	0,53	ns
13-1431	74	64	10	56	19	0,02	ns
13-1432	53	45	8	40	13	0,10	ns
13-1433	89	67	22	67	22	0,95	ns
13-1434	25	19	6	19	6	0,91	ns
13-1435	93	65	28	70	23	0,26	ns
13-1436	133	91	42	100	33	0,08	ns
13-1437	140	107	33	105	35	0,70	ns
13-1438	81	56	25	61	20	0,22	ns
Σ	3929	2881	1048	2948	983	0,47	

NIL: nah-isogene Linie; N: Anzahl; n_i: beobachtete Häufigkeit; n_{i, Mend}: erwartete Häufigkeit; Signifikanzlevel

p < 0,05; ns: nicht signifikant

Tabelle A 3 Mittelwerte der Wuchshöhe (WH) und Ergebnisse der Mittelwertvergleiche (Tukey's-Test) der *Ddw1*-Genotypen aus den $F_{4;5}$ -Linienfamilien. Die Genotypen wurden mit den Markern *tocs4366* und *c28517* ausgewählt.

A						
Merkmal	Genotyp	N	M \pm SD	t-Wert	Pr(> t)	Signifikanz
WH (cm)	<i>ddw1ddw1</i>	155	104,46 \pm 0,43	243,82	<2e-16	***
WH (cm)	<i>Ddw1ddw1</i>	254	73,13 \pm 0,54	186,2	<2e-16	***
WH (cm)	<i>Ddw1Ddw1</i>	105	70,76 \pm 0,67	193,84	<2e-16	***

B						
Merkmal	Genotyp 1	Genotyp 2	Mittlere Differenz	p_{adj}	Untergrenze	Obergrenze
WH (cm)	<i>Ddw1Ddw1</i>	<i>ddw1ddw1</i>	-33,7 ^a	0	-35,28	-32,11
WH (cm)	<i>Ddw1ddw1</i>	<i>ddw1ddw1</i>	-31,33 ^b	0	-32,61	-30,1
WH (cm)	<i>Ddw1ddw1</i>	<i>Ddw1Ddw1</i>	2,37 ^c	0	0,91	6,31

Ddw1Ddw1: homozygoter Halbzweig, *Ddw1ddw1*: heterozygoter Halbzweig, *ddw1ddw1*: homozygoter Wildtyp

A) N = Anzahl der analysierten Individuen der *R1620 x R347/1* Kartierungspopulation, M = Mittelwert \pm SD = Mittelwert \pm Standardfehler für die Merkmale Wuchshöhe (WH) im adulten Stadium, Pr(>|t|) = p-Werte der Varianzanalyse, *** Differenz zwischen den Mittelwerten signifikant bei $p < 0,001$.

B) Mittlere Differenz: Unterschied zwischen zwei Genotypen, p_{adj} : adjustierter P-Wert, Untergrenze und Obergrenze des zweiseitigen 95 % Konfidenzintervalls, Kennbuchstaben (^{a, b, c}): Signifikanzniveau bei $p < 0,05$.

Tabelle A 4 Dunnett-Vergleich der Daten zu Wuchshöhe (WH) der MACE3-Rekombinanten ($F_{6:7}$ -Nachkommenschaft) gegen die (A) homozygot kurze und (B) normalstrohige Kontrollgruppe (Vergleich). Die Übersicht über die Phänotypen der 20 Linien basiert auf einer Auswahl mit den *Ddw1*-Markern *c28517*, *c26102* und *MACE3*.

$F_{6:7}$ EPs	N	WH (cm)	Phänotyp	Vergleich	t Wert	Schätzung	Std.fehler	z Wert	Pr(> z)	Signifikanz	Gruppe	Untergrenze	Obergrenze	Mittelwert	
														kurz	kurz
15/1824	16	50,3	kurz	kurz	-0,179	-0,8272	4,6113	-0,179	1		ab	-17,8673	16,2129		
15/1827	16	51,0	kurz	kurz	-0,03	-0,1397	4,6113	-0,03	1		ab	-17,1798	16,9004		
15/1818	4	56,8	Het kurz	kurz	0,325	2,3899	7,3427	0,325	1		ab	-24,7436	29,5234		
15/1948	16	57,1	kurz	kurz	1,298	5,9853	4,6113	1,298	1		ab	-11,0548	23,0254		
15/1822	16	58,3	kurz	kurz	1,542	7,1103	4,6113	1,542	1		ab	-9,9298	24,1504		
15/1816	16	58,4	kurz	kurz	1,569	7,2353	4,6113	1,569	1		ab	-9,8048	24,2754		
15/1817	16	60,6	Het kurz	kurz	2,043	9,4228	4,6113	2,043	1		ab	-7,6173	26,4629		
15/1828	16	64,8	Het kurz	kurz	2,965	13,6728	4,6113	2,965	0,596107		ab	-3,3673	30,7129		
15/1823	16	65,9	Het kurz	kurz	3,196	14,7353	4,6113	3,196	0,281963		ab	-2,3048	31,7754		
15/1831	9	74,4	normal	kurz	3,789	21,1931	5,5928	3,789	0,032472	*	a	0,526	41,8603		
15/1834	16	75,4	Het kurz REK	kurz	5,256	24,2353	4,6113	5,256	3,50E-05	***	a	7,1952	41,2754		
15/1829	16	78,8	normal	kurz	6,001	27,6728	4,6113	6,001	4,72E-07	***	a	10,6327	44,7129		
15/1836	16	79,1	normal	kurz	6,069	27,9853	4,6113	6,069	3,12E-07	***	a	10,9452	45,0254		
15/1830	16	79,9	normal	kurz	6,245	28,7978	4,6113	6,245	1,04E-07	***	a	11,7577	45,8379		
15/1833	16	81,2	normal	kurz	6,516	30,0478	4,6113	6,516	1,79E-08	***	a	13,0077	47,0879		
15/1797	16	86,4	normal	kurz	7,655	35,2978	4,6113	7,655	5,14E-12	***	a	18,2577	52,3379		
15/1840	9	86,9	normal	kurz	5,798	32,4256	5,5928	5,798	1,61E-06	***	a	11,7585	53,0928		
15/1835	16	87,3	normal	kurz	7,831	36,1103	4,6113	7,831	1,34E-12	***	a	19,0702	53,1504		
15/2102	15	95,1	normal REK	kurz	9,337	43,6744	4,6774	9,337	< 2e-16	***	a	26,39	60,9588		
15/2101	16	95,7	normal REK	kurz	9,661	44,5478	4,6113	9,661	< 2e-16	***	a	27,5077	61,5879		

Fortsetzung Tabelle A 4

F _{6,7} EPs		Mittelwert											
N	WH (cm)	Phänotyp	Vergleich	t Wert	Schätzung	Std.fehler	z Wert	Pr(> z)	Signifikanz	Gruppe	Untergrenze	Obergrenze	
15/1824	16	50,31	kurz	lang	-7,138	-32,7356	4,5861	-7,138	2,53E-10	***	a	-49,6932	-15,778
15/1827	16	51,00	kurz	lang	-6,988	-32,0481	4,5861	-6,988	7,02E-10	***	a	-49,0057	-15,0905
15/1818	4	56,75	Het kurz	lang	-4,029	-29,5185	7,327	-4,029	0,006954	**	a	-56,6108	-2,4262
15/1948	16	57,13	kurz	lang	-5,653	-25,9231	4,5861	-5,653	2,99E-06	***	a	-42,8807	-8,9655
15/1822	16	58,25	kurz	lang	-5,407	-24,7981	4,5861	-5,407	1,16E-05	***	a	-41,7557	-7,8405
15/1816	16	58,38	kurz	lang	-5,38	-24,6731	4,5861	-5,38	1,33E-05	***	a	-41,6307	-7,7155
15/1817	16	60,56	Het kurz	lang	-4,903	-22,4856	4,5861	-4,903	0,000155	***	a	-39,4432	-5,528
15/1828	16	64,81	Het kurz	lang	-3,976	-18,2356	4,5861	-3,976	0,008541	**	a	-35,1932	-1,278
15/1823	16	65,88	Het kurz	lang	-3,745	-17,1731	4,5861	-3,745	0,02096	*	a	-34,1307	-0,2155
15/1831	9	74,44	normal	lang	-1,923	-10,7153	5,5721	-1,923	1		ab	-31,3188	9,8883
15/1834	16	75,38	Het kurz REK	lang	-1,673	-7,6731	4,5861	-1,673	1		ab	-24,6307	9,2845
15/1829	16	78,81	normal	lang	-0,924	-4,2356	4,5861	-0,924	1		ab	-21,1932	12,722
15/1836	16	79,13	normal	lang	-0,855	-3,9231	4,5861	-0,855	1		ab	-20,8807	13,0345
15/1830	16	79,94	normal	lang	-0,678	-3,1106	4,5861	-0,678	1		ab	-20,0682	13,847
15/1833	16	81,19	normal	lang	-0,406	-1,8606	4,5861	-0,406	1		ab	-18,8182	15,097
15/1797	16	86,44	normal	lang	0,739	3,3894	4,5861	0,739	1		ab	-13,5682	20,347
15/1840	9	86,89	normal	lang	0,093	0,5172	5,5721	0,093	1		ab	-20,0864	21,1208
15/1835	16	87,25	normal	lang	0,916	4,2019	4,5861	0,916	1		ab	-12,7557	21,1595
15/2102	15	95,07	normal REK	lang	2,529	11,766	4,6526	2,529	0,938186		ab	-5,4374	28,9694
15/2101	16	95,69	normal REK	lang	2,756	12,6394	4,5861	2,756	0,538273		ab	-4,3182	29,597

N = Anzahl der analysierten Individuen der R1620 x R347/1-Kartierungspopulation

kurzer Phänotyp = Homozygote Allele von *Ddw1*, Het kurz = heterozygote Allele, normaler Phänotyp = homozygote Allele von *ddw1*

REK = Rekombinante für *MACE3*

Signifikanzniveau für die Differenz zwischen den Mittelwerten: p < 0,001 (***), p < 0,01 (**) oder p < 0,05 (*)

Kennbuchstaben (a, b) = Signifikanzniveau p < 0,05

Tabelle A 5 Expressionsprofile des Mutanten und Wildtyp *Ddw1* Genotyps im Roggen. Für jedes Contig sind die Ergebnisse der differentiellen Genanalyse angegeben. Die einzelnen Sequenzen sind zwei Kollektionen von Roggen-cDNA, der Roggen-Referenzgenomsequenz, Genen aus *Aegilops tauschii*, *Triticum urartu* und Gerste zugeordnet. Ferner ist die chromosomale Lokalisierung durch Roggen *whole-chromosome-arm* (WCA) *shotgun*-Sequenzen, die Roggen-Referenzgenomsequenz und im Weizengenom vermerkt.

Aufgrund der Länge der Tabelle ist Tabelle A 5 nicht hier abgedruckt, sondern verfügbar in Braun et al. (2019) als Supplementary Table 4:

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2019.00857/full#supplementary-material>

Tabelle A 6 Primer für die Kartierung in Weizen-Roggen-Additionslinien und in der Population L2039-N x DH auf Chromosomen 4R, 6R und 7R. Marker mit der Abkürzung MACE entstammen der Transkriptomsequenzierung der *Ddw1-N1B*. Die restlichen Marker wurden durch vergleichende Kartierung in der cDNA-Kollektion von Haseneyer et al. (2011) identifiziert.

Primer	Sequenzbezeichnung	F-Primer (5'→3')	R-Primer (5'→3')	Tm [°C]	MgCl ₂ [mM]	Zyklen	Polymorphismus RE ^b W-R-ADL ^a	Polymorphismus RE ^b L2039-Nx ^c DH
MACE03	comp11656_c0_seq1	GGAGGAGGTGGAAGTGTGA	GAAAGTCCAGCAATCAAGC	58	1,5	35	dominant	dominant
MACE05	comp12430_c0_seq1	GCTGCGTTGCCTGACAGAT	TGGAGATGTAGGGAAACCAAA	55	1,5	35	dominant	
MACE06	comp128201_c0_seq1	GCAGATGTTCCAGGATGTTG	ATTGTCTCCTCCACTGAGCA	60	1,5	35	dominant	
MACE07	comp13255_c0_seq1	TGGAGGTCAAAGGACCAAAAG	CTGAGCTTTTCGAGATCTGATG	63	2,5	35		codominant (<i>Hinf</i> I + <i>Hind</i> III)
MACE09	comp13679_c0_seq1	TGGACAGTCAGGTGCAACA	TGGTTTGACGGGTCAAGATT	60	1,5	35		dominant
MACE106	comp30935_c0_seq1	AAGCTAGCAGCCTAGCATGG	AAAACAATTCGCCGAGGTTG	55	2,5	35		codominant (<i>Hae</i> III + <i>Dra</i> I)
MACE107	comp24551_c0_seq1	GCTTGTCAATGCTTCCAA	TTTGGGAACGGGAGGAAGTAA	55	1,5	35	dominant	
MACE108	comp34783_c0_seq9	GGACATCACCACCAAGATCC	TAGTTGCCGTGAGAACAATGC	60	1,5	35		codominant (<i>Taq</i> I)
MACE111	comp14694_c0_seq1	CACCGTACGTGTGAGCAGAG	TGCAGTAGTGGCAGAAGGTG	55	1,5	35	dominant	
MACE111	comp34930_c0_seq1	CACCCTCAGGCACAACAATA	ATTGTTTCATCATCGCACCAA	55	1,5	35		codominant (<i>Hin</i> PI + <i>Eco</i> RI)
MACE114	comp35126_c1_seq1	TACGATGCTGTGGAATTGGA	ATCCGTTCTCCAAAAGAGCA	60	2,5	35	dominant	dominant
MACE116	comp24880_c0_seq1	ATATCACAAGCGCACCATCA	CAGAGAAAGATGCGCAAAATG	55	1,5	35	dominant	InDel
MACE12	comp154661_c0_seq1	CCAGTGCGAGCAACATATAA	CAAATGCTTGTTCGGTGAAA	53	2,5	35	dominant	
MACE120	comp35442_c0_seq1	TCCCATGCAGTGTGATG	GGCATAGACATCCCCCTCTG	55	2,5	35	dominant	
MACE124	comp31427_c0_seq1	GGGAATGATAAACCCGTTGAA	CGGGGATTTCAATTTTTTCTC	55	1,5	35	dominant	codominant (<i>Hae</i> III + <i>Dra</i> I)
MACE127	comp18119_c0_seq1	ACGTCAGGTTCTTCAAGAGC	GCGAACATGGGAATGCTATTA	60	1,5	35	dominant	
MACE13	comp1551_c0_seq1	ATCGAGATGAACACCCCGATG	CCGCGGAAAGATATTAGTG	55		35	dominant	

Fortsetzung Tabelle A6

Primer	Sequenzbezeichnung	F-Primer (5'→3')	R-Primer (5'→3')	Tm [°C]	MgCl ₂ [mM]	Zyklen	Polymorphismus RE ^b	Polymorphismus RE ^b
MACE137	comp26532_c0_seq1	CGTGCCTCAGAAAAAGACAC	GCTTGTTTTGCCCTGTTTTG	55	1,5	35	W-R-ADL ^a	Polymorphismus RE ^b L2039-Nx ^c
MACE139	comp20024_c0_seq1	GGAGAACGAGAACGAGAACG	CGCACAGAAAAGTAGCAACG	63	2,5	35	dominant	codominant (HaeIII + DraI)
MACE14	comp159280_c0_seq1	AGAGCCAGGTACAGGGGAGA	AGCCACTCAAAGCTTGAACA	60	1,5	35	dominant	codominant (RsaI + XbaI)
MACE144	comp32183_c0_seq1	AGACCGTCATCGGCAACTAC	GGCTCATGTACCCCTCAAAA	55	2,5	35	dominant	
MACE153	comp28676_c0_seq1	CGAGCTCGCAAAATATATGGTC	TAGCCACATTCACGAACTG	58	1,5	35	dominant	codominant (Taq ^{II})
MACE158	comp36388_c0_seq1	CCACCGTTATGCGTATCTC	ACGTCTGGAGGGAAGCTACA	60	1,5	35	codominant (HinP1I + EcoRI)	codominant (HinP1I + EcoRI)
MACE176	noHitAssembly_c12049_g1_i1	GTC AACCTCATCGTGGATCA	GTACGGAATGGCTTGTTCG	60	1,5	35	dominant	
MACE177	noHitAssembly_c13723_g1_i1	CTGCATCAAGGAGTTTGCTG	CTAATTTACTCGCAGGCCAGA	55	2,5	35	dominant	
MACE18	comp18079_c0_seq1	TCTTCGTCGCCAAATTCAC	TGAGCATCTCGCTACAGACAA	60	1,5	35	codominant (HinP1I + EcoRI)	
MACE19	comp36398_c0_seq1	GAGGAGATGCTGGAACAAGG	TGTAGCTCACGGGGTAGATCA	60	1,5	35	codominant (HinP1I + EcoRI)	
MACE23	comp36502_c0_seq1	CTGGTCACAATGAGGTGGAA	CATTTGCCGAAGTGATCAAA	55	1,5	35	dominant	
MACE26	comp36646_c0_seq2	GCAGCAAAGTCTGTGTCCGTA	ATACACGCAGGCTGCAAAC	55	1,5	35	dominant	
MACE28	comp4677_c0_seq1	AGACCCGCAGAACTACGTGA	GAGCAATTTGGTGTGAGCAA	55	2,5	35	dominant	dominant
MACE34	comp9422_c0_seq1	GTCGTATCTGGCCCTCT	TGCTAATCCACTGGTGCTCA	60	1,5	35	dominant	
MACE35	comp36762_c0_seq3	GACTGGATCCGGAGATCAGA	GGCTCCAAGAAAAATGGTGA	55	2,5	35	dominant	codominant (HinP1I + HindIII)
MACE40	comp37163_c0_seq1	TTGATGTGCTGGAGGTTGAC	GAATGGCCCTGAATTTGCTA	60	1,5	35	codominant (HinP1I + EcoRI)	codominant (RsaI + XbaI)
MACE41	comp37400_c0_seq3	GGGTTTCAGGAAGGTGTTTC	CACGAGGGATGTTTTGAAGC	60	1,5	35	dominant	
MACE42	comp37544_c0_seq4	CGCTCTACATGGAACACTGTC	TTTTTTGCAACCGAACAAG	60	1,5	35	dominant	
MACE53	comp62520_c0_seq1	CGGGGGTTCTCTCTGATAA	CTGACAAATTATCTCCCGTCAA	55	1,5	35	dominant	

Fortsetzung Tabelle A6

Primer	Sequenzbezeichnung	F-Primer (5'→3')	R-Primer (5'→3')	T _m [°C]	MgCl ₂ [mM]	Zyklen	Polymorphismus (RE ^b) W-R-ADL ^a	Polymorphismus (RE ^b) L2039-Nx ^c DH ^c
MACE56	comp93476_c0_seq1	GAGCTGCTGAGCGAGTTTG	GAAGAAACAACCCCAAGCAACC	55	1,5	35	codominant (RsaI + XbaI)	
MACE59	noHitAssembly_c8895_g1_i1	CAGAAATCGGCAACGATGA	TCGCACAAAAGAGTTCATCCA	60	1,5	35	dominant	codominant (HinfI + HindIII)
MACE64	noHitAssembly_c11228_g1_i1	TGATGGAAACAAGCATCACC	ATCAACCGATGTGCAACAGA	60	2,5	35	codominant (RsaI + XbaI)	
MACE65	noHitAssembly_c12049_g1_i1	GTC AACCTCATCGTGGATCA	GTACGGAATGGCTTGTTTCG	55	1,5	35	dominant	
MACE66	noHitAssembly_c12819_g1_i1	CAGGACGCCCTTACTTACA	ATGCTCGTACACTTCGATGC	55	1,5	35		codominant (HaeIII + DraI)
MACE67	noHitAssembly_c13567_g1_i1	CCGCCAACAACTCTAGTCT	CTCAGCAAAATCAACCAAGCA	55	1,5	35		codominant (HinfI + EcoRI)
MACE70	noHitAssembly_c13954_g1_i2	CGAGATTGTCGTGATGCTGT	ACAAAAGGAATGCAGGACCA	55	2,5	35		codominant (HinfI + HindIII)
MACE75	comp33147_c0_seq1	GTGGTCAGCGGACAAAATCAG	AGGAACTGGAAGGTGCAATG	60	1,5	35	dominant	codominant (HaeIII + DraI)
MACE91	comp29998_c0_seq2	ACTGGCTTGGTGATCTTTGC	CGCTTTGCAAGGAATAGTCA	55	1,5	35		codominant (HinfI + EcoRI)
MACE97	comp30257_c0_seq1	AGAGCATCCACCATTCAAC	TTCATAGTGC GTGTGTGCAA	55	1,5	35	dominant	
MACE98	comp24327_c0_seq1	TTATGTTGTTCTGGGCTTGG	CCAAATGTTGGGCACTATCC	55	1,5	35	dominant	
MACE99	comp34554_c0_seq1	CAACACTTCGGGTTTTTCGAG	CTCACAGTCACAGGCCACAT	60	2,5	35	codominant (RsaI + XbaI)	

^a W-R-ADL: Weizen-Roggen-Additionslinien, ^b RE: Restriktionsenzym, ^c Ressource RIL Population: Martis et al. (2013), T_m: Schmelztemperatur, F-Primer: Vorwärtsprimer, R-Primer: Rückwärtsprimer

Tabelle A 7 Zuordnung der in dieser Studie auf Chromosom 4RL kartierten Roggenmarker zu Chromosomen (Chr.) von *Aegilops tauschii* und Gerste (*Hv*).

Marker	W-R-ADL ^a	L2039-NxDH	Lo7-Contig ^c	Lo7-cds ^c	WCA Chr. ^b	Lo7xLo225 Chr. ^c	Pos. cM ^c	Atauschii cds	Atauschii Chr.	Hv Genmodell	Hv Chr.
MACE107		4RL	Lo7_v2_contig_2869897	Sc0Loc01446804.2	4R	4R	82,97	EMT13108		HORVU7Hr1G037070	7H
MACE05	4R;4RL		Lo7_v2_contig_1394348		4R	4R	84,19				
MACE09		4RL	Lo7_v2_contig_1354980	Sc4Loc00235764.5	1R, 4R	4R	84,19	EMT10376			
MACE51		4RL	Lo7_v2_contig_1354980		1R, 2R, 4R	4R	84,19				
MACE66		4RL	Lo7_v2_contig_262667		4R	4R	85,39	EMT02607		HORVU7Hr1G035450	7H
MACE144	4R;4RL		Lo7_v2_contig_1351869		4R	4R	86,20			HORVU7Hr1G035350	7H
MACE143		4RL	Lo7_v2_contig_1378136		1R, 4R	4R	86,61	EMT03242	7D	HORVU7Hr1G034860	7H
MACE177	4R;4RL		Lo7_v2_contig_532		4R	4R	86,61	EMT24752		HORVU6Hr1G084940	6H
MACE54		4RL	Lo7_v2_contig_1378136			4R	86,61				
MACE64	4R;4RL		Lo7_v2_contig_1369440	Sc4Loc00339297.2	4R, 5R	4R	89,01	EMT30437		HORVU7Hr1G032420	7H
MACE13	4R;4RL		Lo7_v2_contig_67264		4R, 6R	4R	90,63				
MACE116	4R;4RL	4RL	Lo7_v2_contig_2871397			4R	91,85				
MACE23, MACEtp09-4R	4R;4RL	4RL	Lo7_v2_contig_1390521	Sc4Loc00442254.1	1R, 2R, 3R, 4R, 5R, 6R, 7R	4R	91,85	EMT14663	7D	HORVU7Hr1G030380	7H
MACE111		4RL	Lo7_v2_contig_266038		4R	4R	94,69	EMT06005		HORVU7Hr1G028590	7H
MACE07		4RL	Lo7_v2_contig_1370519		4R	4R	95,90	EMT32879	7D	HORVU7Hr1G027580	7H
MACE178			Lo7_v2_contig_2885913		4R	4R	96,31	EMT27491	7D	HORVU7Hr1G027490	7H
MACE176	4R;4RL		Lo7_v2_contig_68693	Sc4Loc02028316.1	4R	4R	96,72	EMT27418		HORVU7Hr1G027370	7H
MACE106		4RL	Lo7_v2_contig_2870359			4R	98,35				
MACE03		4RL	Lo7_v2_contig_70604		4R			EMT23675		HORVU7Hr1G030220	7H
MACE06	4R;4RL		Lo7_v2_contig_1420524		4R						
MACE102	4R;4RL				4R					HORVU7Hr1G032340	7H
MACE108		4RL			4R, 6R					HORVU7Hr1G028610	7H
MACE11	4R;4RL		Lo7_v2_contig_1403922		4R			EMT31260			
MACE114	4R;4RL	4RL		Sc4Loc01353365.1	4R			EMT18998	7D	HORVU7Hr1G025910	7H
MACE12	4R;4RL		Lo7_v2_contig_74781		4R						
MACE120	4R;4RL		Lo7_v2_contig_1349928	Sc4Loc00192350.4	3R, 4R			EMT27152		HORVU7Hr1G036920	7H
MACE127	4R;4RL		Lo7_v2_contig_1361922	Sc4Loc00289951.1	4R					HORVU0Hr1G019640	0H
MACE137	4R;4RL	4RL	Lo7_v2_contig_2880144		4R						

Marker	W-R-ADL ^a	L2039-NxDH	Lo7-Contig ^c	Lo7-cds ^c	WCA Chr. ^b	Lo7xLo225 Chr. ^c	Pos. cM ^c	Atauschii cds	Atauschii Chr.	Hv Genmodell	Hv Chr.
MACE138		4RL	Lo7_v2_contig_127711		3R, 4R						
MACE139	4R;4RL		Lo7_v2_contig_1353047	Sc6Loc00277372.3	1R, 4R, 6R			EMT20491		HORVU7Hr1G036160	7H
MACE14	4R;4RL	4RL	Lo7_v2_contig_5982		4R, 5R						
MACE148		4RL	Lo7_v2_contig_64178		4R						
MACE151		4RL	Lo7_v2_contig_1597023		4R						
MACE153	4R;4RL	4RL	Lo7_v2_contig_1450682		4R						
MACE158	4R;4RL	4RL	Lo7_v2_contig_1350090		4R, 7R						
MACE18	4R;4RL		Lo7_v2_contig_263736		4R, 5R					HORVU7Hr1G034640	7H
MACE19	4R;4RL		Lo7_v2_contig_60914	Sc4Loc01935731.2	4R						
MACE26	4R;4RL				4R						
MACE35	4R;4RL	4RL			1R, 2R, 3R, 4R, 5R, 6R, 7R						
MACE38		4RL								HORVU7Hr1G029600	7H
MACE41	4R;4RL				4R					HORVU7Hr1G030780	7H
MACE42	4R;4RL				4R, 5R			EMT26555		HORVU7Hr1G031100	7H
MACE43, MACEtp11-4R	4R;4RL				4R, 5R					HORVU7Hr1G031100	7H
MACE55		4RL	Lo7_v2_contig_6476		1R, 4R			EMT05637		HORVU7Hr1G036060	7H
MACE56	4R;4RL		Lo7_v2_contig_61903		4R						
MACE59	4R;4RL	4RL	Lo7_v2_contig_63123		3R, 4R						
MACE67		4RL	Lo7_v2_contig_83555		4R					HORVU7Hr1G027530	7H
MACE70		4RL	Lo7_v2_contig_92691	Sc4Loc01396662.1	4R						
MACE75	4R;4RL	4RL	Lo7_v2_contig_71778		3R, 4R						
MACE91		4RL			1R, 4R, 6R					HORVU7Hr1G027870	7H
MACE99			Lo7_v2_contig_2911199	Sc4Loc01595600.1	4R			EMT02530	7D	HORVU7Hr1G032340	7H
MACE34	4R;4RL		Lo7_v2_contig_60880	Sc4Loc01935265.2	4R			EMT29869	7D		
MACE97	4R;4RL		Lo7_v2_contig_12255		4R			EMT16979			
MACE124	4R;4RL	4RL	Lo7_v2_contig_60247		4R						
MACE40	4R;4RL	4RL	Lo7_v2_contig_8332	Sc4Loc02114756.5	1R, 4R					HORVU7Hr1G028240	7H
MACE53	4R;4RL		Lo7_v2_contig_63120		4R					HORVU7Hr1G029920	7H

^a W-R-ADL: Weizen-Roggen-Additionslinien, ^b Ressource: Martis et al. (2013), WCA: whole-chromosome-arm shotgun ^c Ressource: Bauer et al. (2017)

Tabelle A 8 Spaltungsanalyse der Marker *MACE153* und *MACE116* in der *Ddw1* F_{5,6}-Linienfamilie 11-1582.

Pop. 11-1582	A.B.	aaBB	AAbb	aabb	N	
beobachtet	43	9	10	1	63	
erwartet (9:3:3:1)	35,4	11,8	11,8	3,9		
Differenz	-7,6	2,8	1,8	2,9		
d ² /e	1,6	0,7	0,3	2,2		Chi ² = 4,75 ns
						Chi ² _(3,0,05) = 7,81
Locus A	MACE153-4RL					
Locus B	Ddw1-5RL					
Pop. 11-1582	A.B.	aaBB	AAbb	aabb	N	
beobachtet	42	15	13	1	71	
erwartet (9:3:3:1)	39,9	13,3	13,3	4,4		
Differenz	-2,1	-1,7	0,3	3,4		
d ² /e	0,1	0,2	0,0	2,7		Chi ² = 2,99 ns
						Chi ² _(3,0,05) = 7,81
Locus A	MACE116-4RL					
Locus B	Ddw1-5RL					

Tabelle A 9 Differentiell in normal- und kurzstrohigen *Ddw1* nah-isogenen bulks (NIB) exprimierte Gene (DEG) im Vergleich zu der Roggengenomreferenzsequenz, der hochdichten Karte *Lo225 x Lo225* und den Roggen *whole-chromosome-arm* (WCA) *shotgun*-Sequenzen. Aufgrund der Länge der Tabelle ist Tabelle A 9 nicht hier abgedruckt, sondern als Supplementary Table 4 enthalten in Braun et al. (2019): <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2019.00857/full#supplementary-material>

Tabelle A 10 Gene der Gibberellinbiosynthese und des Gibberellinsignaltransduktionswegs im Roggen (Bauer et al. 2017) und deren orthologen Gene in Reis (Hirano et al. 2008; Huang et al. 2015) und Weizen (Pearce et al. 2015; Clavijo et al. 2017), sowie Roggentranskripte und chromosomale Lokalisation der GA-Biosynthese- und Signaltransduktionsgene im Roggen. Aufgrund der Länge und Komplexität von Tabelle A 10, ist diese online als Supplementary Table 3 verfügbar (Braun et al. 2019): <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2019.00857/full#supplementary-material>

Tabelle A 11 Primer für die Kartierung und Sequenzierung der Gene des GA-Biosynthesewegs und der GA-Signaltransduktion in Weizen-Roggen-Additionslinien (W-R-ADL) und in L2039-N x DH.

Primer	Kandidatengen	F-Primer (5'→3')	R-Primer (5'→3')	T _m [°C]	MgCl ₂ [mM]	Zyklen	W-R-ADL	L2039-N x DH ^a
rGA1	ScEL1, ScEL2	AATTGGCTCGAAACCTAGA	GGAACCTCCGTACACACAGCA	60	1,5	35		
rGA10	ScKGM1	TGGTTTGACCTGATGATCCA	TTCACACCGACCTCTTTTCC	55	2,5	35	Taq ^{q1}	
rGA14	ScKS1, ScKSL6	ACGGTTTTGTACGGCAGAAG	AACGTCTCGACCACAAGAGG	60	1,5	35		
rGA15	ScKS1	CCCGACACAATACAATGCTG	GGTGGGTGAAAGAAAAACAGG	60	1,5	35	HaeIII + DraI	
rGA16	ScKS1, ScKSL6	TTCTGCCGTGCAAAATTGTAG	GTTTCGCCCTTTTACGGATGA	55	1,5	35		
rGA18	ScSPY	AGCTTCGGCATAACAATGGTC	TTGCTGATGCTCTCCAGTTG	55	1,5	40	HinP11 + EcoRI	
rGA19	ScSPY	CGGCTTTGTCGAGATTATCC	CCACTATGCGCCTGCTTATT	53	4	35		
rGA2	ScEL2	AAGGGTTTCCTGGTCTCAT	TGCGTAGCTTCTTCAGCAAA	53	4	35	HinfI + HindIII	HinfI + HindIII
rGA21	ScGA13ox1	GGGCTGGAGAGTGGTGATAG	TGCAGGATACGAGAGCACAG	60	1,5	35		
rGA22	ScGA13ox1	ATATCCAGGCCACACTTTCC	TCCAGCAGATTCCCAATCAC	55	1,5	35		
rGA23	ScCPS1, ScCPS2	CTTCTCACGACGCTCAACAA	TGCAAAAAGAGGACATTTCTCG	60	1,5	35	HinfI + HindIII	
rGA25	ScKS1	TAACCCCTCCGCAACATAGG	TGTTGAATTACCCCGTCTC	55	2,5	35		
rGA27	ScKS1	GGACAACGATGTGTTTTCTG	CGGTGGTTCTCTGTCCGTAG	60	1,5	35		
rGA29	ScGIDL2	AATTGGACAGAATGGCAGAC	GGGTAGGGGAAGCCTGTACT	60	1,5	35		HinfI + HindIII
rGA3	ScEL1, ScEL2	GTTCTTCTCCCATTTGCTCCA	TCTGCGGATGTTCTGAGTTG	60	1,5	35		HinP11 + EcoRI
rGA31	ScKAO	AAGGGCCCAACACTATCG	AACGATCTGCCAAGCTG	60	1,5	35		Indel
rGA32	ScEUIL1	TGCTGACAAAATGTTGCTTCG	GATCGTCGAGGTCAAAAACG	55	2,5	40	RsaI + XbaI	
rGA33	ScKAO	AGTTGGCGAGATCGTTG	CTGAAAACAATGGCAGGTG	55	1,5	35	RsaI + XbaI	
rGA34	ScD1	CAGATCAGCACATCCACAGG	AGCACATCCTCCTTTGTTGG	50	4	35	HinP11 + EcoRI	
rGA35	ScD1	TTGGAGGCAGGTTGGATTAC	TTGAGGAAACAGCATGAACGA	60	1,5	35		HinP11 + EcoRI
rGA36	ScGIDL6	CCTCCATTGAGCAGAAAGGAA	CACAGCTCAGGTTATCAGC	55	2,5	35		
rGA37	ScGIDL6	AGGTGGCCAAAGACAGTTGAC	ACGGTCTGGAGAGTTGAGGA	60	1,5	35	Taq ^{q1}	Taq ^{q1}
rGA4	ScEL1, ScEL2	ATGCTTGAATGGAGGTGGAC	ATGCTTGGTCTAGCCTCTG	60	1,5	35		
rGA40	ScCPS1, ScCPS2	TGGGACAATCAACTCAAGCA	TTCAAAAATGCAAGCGACAG	53	4	35	HinP11 + EcoRI	

Fortsetzung Tabelle A 11

Primer	Kandidatengen	F-Primer (5'→3')	R-Primer (5'→3')	T _m [°C]	MgCl ₂ [mM]	Zyklen	W-R-ADL	L2039-N x DH ^a
rGA41	ScKO	GGCTTCATCTGTAGCTGTGC	CTCCCCAAACTCCTTCACAT	55	1,5	40	HaeIII + DraI	
rGA42	ScKO	TGGCAGAGAAAGGCACTGAC	GTGGTCTCATGGACGAACCT	55	1,5	35		
rGA43	ScK55	CAAAGTGGTGGCTCTATGTCC	GCTGATTTGGAGTTTGAGAGG	60	1,5	35		
rGA44	ScKSL4	CCTGGTTACAGAGAGAGGAGGA	GGCCTGCCAGTTACTTATG	60	1,5	35	HinP11 + EcoRI	
rGA45	ScK55	TTTTATGCCACACTCGAACG	GGGGAATATGTAGCAGAAGC	60	1,5	35		Hinfi + HindIII
rGA46	ScCPS1, ScCPS2	TCAAGAGGATCCGATGGAG	GTCAACCGGTAAACATTTGG	55	1,5	35	HaeIII + DraI	
rGA47	ScCPS1, ScCPS2	TGATGGAACGGTTTATGCAC	CACCTGAATGGTATGTGCATCC	55	1,5	35	Hinfi + HindIII	
rGA48	ScGA13ox1	AATTCTGCGCAAACACTGC	CTAGCACGTTTGGCTTGGAC	60	1,5	35		
rGA49	ScGA20ox4	CATAATGTGTTGGCATGGTG	GAGCCGGGATTTGTTCTG	55	1,5	40	RsaI + XbaI	
rGA50	ScCPS1, ScCPS2, ScCPSL3	ATTTCAATCGCTGCCAAGTC	CCCATGCAAGTCGTTCTGT	55	2,5	40	Taq ^{q1}	
rGA54	ScGID1	TGTTTGCCTGGGGTTAAGAC	AAAACCGAATGGATGGATCA	55	1,5	35	RsaI + XbaI	
rGA55	ScGA20ox6	CAAGGCGTTCAACTACGATG	CGGTGCTGGCTATAAGATG	55	1,5	40		
rGA57	ScSLR1	TGATCCCCGAAGTTTTGAAC	TGGATGGGAACACCATGAAC	55	1,5	35		
rGA58	ScEL1, ScEL2	ACCACTGGAGCCAGAAAGAGA	CTAAGGATAGCACGGCGAAC	55	1,5	35		
rGA59	ScEL1, ScEL2	CCCCAGTAACCATGTGAAGG	GTCGGTTACCAAAGGTTGC	55	1,5	35		
rGA6	ScSPY	AGTCCCAGCATATGGAAACG	GGCCTGCTCCTATTCAGGTT	53	4	35	HinP11 + EcoRI	HinP11 + EcoRI
rGA60	ScGA20ox1	GCTGAGGCTGAGGAAAGAGA	AAGATGCCTTCCTTGGTTGA	60	1,5	35		
rGA61	ScGA20ox1	CTTGAAGGCTTGAGCCAGAC	AGCGGTGCATCTCTTGCTAT	55	2,5	40		
rGA66	ScGA3ox2	AACACGGACGACCTGATCTC	AGCCGGTGATCTAGTTCAATT	60	1,5	35		
rGA67	ScGA2ox9	CATTTCCAAACGCTCTCATC	TCATTTTGAGACAGGGGAGT	55	1,5	40	HaeIII + DraI	RsaI + XbaI
rGA69	ScKAO	TGTACCCTGACCCCAAGAAG	TTGCAGGAAACAGTTGACAAG	60	1,5	35		Hinfi + HindIII
rGA7	ScSPY	GTTTCCGAGGTCAAGAACCA	GTGGCCTGGAATCTGCATAC	60	1,5	35		
rGA70	ScKAOL4	TCACCATCATGTCCCATCAC	TCACTGAACGCATCTCCATC	55	1,5	35	HaeIII + DraI	
MACE3	ScGA2ox12a, ScGA2ox12b	TCAACGTCGGTGATCTGTTC	TTGAGAAAAGTTGGGGAGACC	55	1,5	40		

Fortsetzung Tabelle A 11

Primer	Kandidatengen	F-Primer (5'→3')	R-Primer (5'→3')	T _m [°C]	MgCl ₂ [mM]	Zyklen	W-R-ADL	L2039-N x DH ^a
rGA73	ScGAMYBL2	CCTCATCGTGGATCATCTCC	TCTTCCAAGGACAAAACATTCCG	55	2,5	35		
rGA74	ScGAMYBL2	CGCACTGTTGACATGATTA	GGTCCATGATCCGCATAAAC	55	1,5	35	HaeIII + Drall	
rGA9	ScKGM1	CTTGGAACACCTTTGCCCTA	ATGGAGCACACCCCTCTATGC	55	2,5	35		

^a Ressource RIL Population: Martis et al. (2013)

Tabelle A 12 Orthologer Bereich des *Ddw1*-flankierenden Segments abgebildet auf Chromosom 4D von *Aegilops tauschii*. Die in Weizen-Roggen-Additionslinien, in Population *R1620 x R347/1* und *L2039-N x DH* kartierten *Ddw1*-Marker sind aufgeführt.

Gen ^a	Start (bp) ^a	Stop (bp) ^a	Gen ^b	Scaffold ^b	bin ^b	cM ^b	<i>Ddw1</i> -Marker (<i>R1620 x R347/1</i>)	<i>Ddw1</i> -Marker (<i>L2039-N x DH</i> ^c)	Weizen-Roggen- Additionslinien
AE74Gv20850500	516822842	516825087	EMT27437	scaffold12030	bin142	91,777		c9152	c9152
AE74Gv20851000	516850082	516854507	EMT27438	scaffold12030	bin142	91,777			
AE74Gv20851100	516854544	516856320	EMT27439	scaffold12030	bin142	91,777			
AE74Gv20851300	516870343	516874703							
AE74Gv20851400	516877526	516883734	EMT27440	scaffold12030	bin142	91,777			c68163
AE74Gv20851500	516888610	516890569	EMT27441	scaffold12030	bin142	91,777			
AE74Gv20851700	516996510	516999894	EMT16106	scaffold39588	bin143	92,716			
AE74Gv20851800	517000151	517002551	EMT16105	scaffold39588	bin143	92,716			
AE74Gv20851900	517009532	517009831							
AE74Gv20852000	517013380	517018375	EMT16104	scaffold39588	bin143	92,716			
AE74Gv20852100	517019811	517024313	EMT16103	scaffold39588	bin143	92,716		c132523	
AE74Gv20852200	517171080	517171670	EMT04360	scaffold96824	bin142	91,777			
AE74Gv20852600	517202155	517210195	EMT04361	scaffold96824	bin142	91,777		c124937, c26102	c16091
AE74Gv20852800	517209538	517214088	EMT04362	scaffold96824	bin142	91,777		tcos4366, MACE1	c10570
AE74Gv20852900	517219835	517221946							
AE74Gv20853000	517230410	517235874	EMT04363	scaffold96824	bin142	91,777			
AE74Gv20853100	517243907	517246441	EMT04364	scaffold96824	bin142	91,777			
AE74Gv20853200	517394270	517396553	EMT21439	scaffold25320	bin142	91,777			
AE74Gv20853400	517719766	517723982							
AE74Gv20853600	517800373	517802326	EMT11481	scaffold55152	bin143	92,716		MACE3, MACE4	MACE3
AE74Gv20853800	517899029	517902527	EMT10608	Scaffold58803				c15679	
AE74Gv20853900	517904340	517911147	EMT10609	Scaffold58803				c103925	
AE74Gv20854100	517913267	517914959						MACE2	
AE74Gv20854200	517919632	517920414							
AE74Gv20854400	517954277	517955485							

Fortsetzung Tabelle A 12

Gen ^a	Start (bp) ^a	Stop (bp) ^a	Gen ^b	Scaffold ^b	bin ^b	cM ^b	Ddw1-Marker (R1620 x R347/1)	Ddw1-Marker (L2039-N x DH ^c)	Weizen-Roggen- Additionslinien
AET4Gv20854500	517986120	517987336							
AET4Gv20854600	518032928	518037472	EMT15738	scaffold40614	bin144	93,022			
AET4Gv20854700	518040573	518041299	EMT15739	scaffold40614	bin144	93,022		c14842, c91370	c14842
AET4Gv20854800	518081215	518082416	EMT15740	scaffold40614	bin144	93,022			
AET4Gv20854900	518097952	518101901							
AET4Gv20855100	518138524	518139504							
AET4Gv20855200	518143226	518144544							
AET4Gv20855300	518157982	518159379							
AET4Gv20855400	518293887	518296899							
AET4Gv20855500	518298783	518300499							
AET4Gv20855600	518305887	518306609	EMT00456	Scaffold235204					
AET4Gv20855700	518307084	518311500	EMT00457	Scaffold235204					
AET4Gv20855800	518320290	518324128	EMT00458	Scaffold235204				c27051	
AET4Gv20855900	518325106	518325680	EMT00459	Scaffold235204				c30002	
AET4Gv20856100	518350609	518350866							
AET4Gv20856200	518370522	518374572							
AET4Gv20856500	518528290	518532597	EMT26767	scaffold13344	bin144	93,022			
AET4Gv20856800	518533757	518536159	EMT26768	scaffold13344	bin144	93,022			
AET4Gv20857000	518537089	518539979	EMT26769	scaffold13344	bin144	93,022			
AET4Gv20857100	518537123	518538434							
AET4Gv20857200	518540192	518543335	EMT26771	scaffold13344	bin144	93,022			c25606
AET4Gv20857300	518540362	518544752							
AET4Gv20857400	518545326	518547613	EMT26772	scaffold13344	bin144	93,022			
AET4Gv20857500	518661330	518661674							
AET4Gv20857600	518662809	518663054							
AET4Gv20857700	518666098	518667989	EMT32329	scaffold2827	bin144	93,022			

Fortsetzung Tabelle A 12

Gen ^a	Start (bp) ^a	Stop (bp) ^a	Gen ^b	Scaffold ^b	bin ^b	cM ^b	Ddw1-Marker (R1620 x R347/1)	Ddw1-Marker (L2039-N x DH ^c)	Weizen-Roggen- Additionslinien
AE74Gv20857800	518669073	518671589	EMT32330	scaffold2827	bin144	93,022		c16271, c1751	c1751
AE74Gv20857900	518675924	518678775	EMT32331	scaffold2827	bin144	93,022			
AE74Gv20858000	518679428	518679537	EMT32332	scaffold2827	bin144	93,022			
AE74Gv20858300	518707418	518708508	EMT32333	scaffold2827	bin144	93,022			
AE74Gv20858400	518710434	518712129	EMT32334	scaffold2827	bin144	93,022			
AE74Gv20858500	518719659	518721084	EMT32335	scaffold2827	bin144	93,022			
AE74Gv20858600	518760122	518761407	EMT32336	scaffold2827	bin144	93,022		c36819	

^a Luo et al. (2017); ^b Jia et al. (2013) ; ^c Martis et al. (2013); cM = centiMorgan ; bp = Basenpaar

Tabelle A 13 Primer für den langen Arm von Chromosom 5R im Winterroggen. Die *Ddw1*-Marker sind durch die Spalte *R1620 x R347/1* gekennzeichnet. Die physikalische Kartierung mittels Weizen-Roggen Additionslinien ist durch die Spalte *W-R-ADL* und die genetische Kartierung in der Population *L2039-N x DH* durch eine weitere Spalte dokumentiert.

Primer	Sequenzbezeichnung	F- und R-Primer (5'→3')	T _m [°C]	MgCl ₂ [mM]	Zyklen	R1620 x R347/1	W-R-ADL ^a	L2039-N x DH ^b
AX-99254733	<i>Lo7_v2_contig_1345025</i>	F: GCAGTCATTCTCTTGTTGTAATAGCACCCCTGA R: TTCTTTGGAAAAGCTGCTCACCTTGTTG	60	2,5	35	<i>Fnu4HI</i>		
AX-99274311	<i>Lo7_v2_contig_1369736</i>	F: AGTGTGTCTAATGATGCGTGCAGTTTCAC R: ACAAGATGCCAACCAAGTTCTCTAAAGGG	60	2,5	35	<i>FauI</i>		
AX-99278562	<i>Lo7_v2_contig_1369736</i>	F: AATGGGGTGTCTCAGCTCATTTACATGGC R: ATGGCAATACCTCCCTGATCTGCAACTG	60	1,5	35			
AX-99387651	<i>Lo7_v2_contig_2870544</i>	F: GAGCAAGAAAAGGAATACAAGAAAAACCGGA R: ATCTGCACATCTGTTCTTTTCCACAGCACC	55	2,5	35	dominant		
AX-99519118	<i>Lo7_v2_contig_1345025</i>	F: AGCAGCTTTTCCAAAAGAAAGTATGGATC R: TACCAGCACCACTAGTACTCAAGGATCA	60	1,5	35	<i>HinPII</i>		
<i>c10570</i>	<i>Scce_Assembly02_c10570</i>	F: TGGAAGGCCGTAAGAAAAACA R: TACAAAGCAATGCCAACAGC	55	1,5	35		InDel	
<i>c124937</i>	<i>Scce_Assembly02_c124937</i>	F: TGGGGTGTCTCAGCTCATTA R: CATCGATAACCGCAAAATGTC	55	4	35	<i>HaeIII + DraI</i>		
<i>c132523</i>	<i>Scce_Assembly02_c132523</i>	F: CATCCACCGTACCTGAAG R: CGTCTTCCACTGCTTGCTC	60	1,5	35			<i>HaeIII + DraI</i> dominant
<i>c14842</i>	<i>Scce_Assembly02_c14842</i>	F: TCCAGGATGCCTACATCCAC R: AGGTCGTCATTCAGCTCGTC	65	1,5	35			dominant
<i>c15353</i>	<i>Scce_Assembly02_c15353</i>	F: ACCACCGTCAAGAAATTTCA R: GGCTGCTGAACTTTTCCCTTG	55	4	35			dominant
<i>c15679</i>	<i>Scce_Assembly02_c15679</i>	F: GGTATGGAGCCACGAATAC R: TTCAGGCAGAACACAGTTGC	50	1,5	35	<i>HpaII</i>		
<i>c16091</i>	<i>Scce_Assembly02_c16091</i>	F: CGGTCTTTCAGGAGAGAGCTG R: CGAGCCATTTTGGAGTGTGA	60	1,5	35		<i>RsaI + XbaI</i>	

Fortsetzung Tabelle A 13

Primer	Sequenzbezeichnung	F- und R-Primer (5'→3')	T _m [°C]	MgCl ₂ [mM]	Zyklen	R1620 x R347/1	W-R-ADL ^a	L2039- N x DH ^b
c16271	Scce_Assembly02_c16271	F: GCGAGGAGCTCTCTTACC R: ATCTGCCCTCCGTTCCGTACC	60	1,5	35		RsaI + XbaI	RsaI + XbaI
c1751	Scce_Assembly02_c1751	F: TGAACCCATCTCTTGGTGG R: GACATCCTGTTGGTGGAGA	60	1,5	35		InDel	InDel
c20754	Scce_Assembly02_c20754	F: AGGAGACCCTGCTTCCAC R: TTCACCGCTGACTTCTCCT	55	1,5	35	codominant: HaeIII + DraI		
c25606	Scce_Assembly02_c25606	F: CGGGCTTTATCAAAGAGAGC R: TGCAGAAATCCTCCAGTAGC	55	1,5	35			dominant
c26078	Scce_Assembly02_c26078	F: ACTCCATCTCCATGCACCTC R: TTCCTGCATGGTGACAGCTA	60	1,5	35	codominant: HinP1I + EcoRI		
c26102	Scce_Assembly02_c26102	F: AGCAGGGCCTTCATCATAGA R: AGATCAGCTTACACACTAGGC	55	1,5	35	codominant: RsaI + XbaI		
c27051	Scce_Assembly02_c27051	F: ATCGGAGAAGAGTGGGAGAA R: GAGACGACCAGAAAGCAAGC	60	1,5	35	codominant: HaeIII + DraI		
c28517	Scce_Assembly02_c28517	F: AGATCTCGCCGCCATATAC R: CTCTAGGAAGGATCATAACAGGC	55	1,5	35	codominant: Taq ^{a1}		
c30002	Scce_Assembly02_c30002	F: TGCACCTCATCTGTGGATT R: TGTAGGCGTCTCTCCACTCC	55	1,5	35	codominant: HaeIII + DraI		
c103925	F: Scce_Assembly02_c3251 R: Scce_Assembly02_c103925	F: AAGTTCCTGGGATTCATGTG R: CCCAGGATGCTTAGTTACG	55	1,5	35	codominant: HinP1I + EcoRI		
c36819	Scce_Assembly02_c36819	F: CGACGAGCTCCAGACGAG R: AGACGGAAACACTTTATTGAATG	58	1,5	35			Taq ^{a1}
c5051	Scce_Assembly02_c5051	F: TGCAGATTGCTGGACTCAAC R: GGAACAAGGGGAAATGAACC	55	1,5	35		HinI + HindIII	
c67906	Scce_Assembly02_c67906	F: CAGAAGCCATAAAGGTGCAG R: AAGCCATCTCTGGACTGTATCC	60	1,5	35		InDel	
c68163	Scce_Assembly02_c68163	F: ACCCACCAGGAAATCAGTTAC R: GCTAATGTCGTTTGTGCTG	60	2,5	35		HinP1I + EcoRI	
c69423	Scce_Assembly02_c69423	F: GGCTTAATCTCATTGGTGTG R: CTGTATCCACGGGGTCAAAC	55	1,5	35		HinP1I + EcoRI	

Fortsetzung Tabelle A 13

Primer	Sequenzbezeichnung	F- und R-Primer (5'→3')	T _m [°C]	MgCl ₂ [mM]	Zyklen	R1620 x R347/1	W-R-ADL ^a	L2039- N x DH ^b
c91370	Scce_Assembly02_c91370	F: GTACATGGGGACGCACGAC R: GTGTCGACAAAAGTTGGGTTG	60	2,5	35			Taq ^{a1}
c9152	Scce_Assembly02_c9152	F: GCAAAGACCTGCCTGGTAGA R: GGGGATGTTAAAGTTGCTG	60	1,5	35	InDel	InDel	dominant
dMACE3	MACE3	F: GCGTTTTAAGTTTTCAACTCC R: ACACCGTTGATCATCTACCTTG	55	2,5	35	codominant: HinfI + HindIII		
dMACE3_2	MACE3	F: CGACGGGCACATGAAGTAG R: AAACCTTAAACGCATGGCCAC	62	1,5	35	dominant		
MACE08	comp13332_c0_seq1	F: TATTGATTCGGCGGACATTC R: CATCAGGCGAACAACTTAACC	60	1,5	35	InDel	InDel	InDel
MACE1	comp29006_c0_seq1	F: GCATGGACCAGACGACAAGAC R: AATTTGGAACGGAGGGAGTAG	60	1,5	35	dominant		dominant
MACE110	comp24863_c0_seq1	F: AAGAAGAAGAGCGGAGAGG R: TTTGGCGCCTTAATATCCA	55	1,5	35	InDel	InDel	
MACE113	comp24863_c0_seq2	F: GAACCCATTTCGGACATCAG R: TTTGGCGCCTTAATATCCA	55	2,5	35	codominant: HinfI + HindIII	InDel	
MACE118	comp31371_c0_seq1	F: ATGAGCCTGGAAGAAAAGCA R: CCCCATGCCTAGAGCTAAC	60	1,5	35	InDel		
MACE2	comp36011_c0_seq2	F: AGGATGCAGCAGAATGAAITGA R: GGAGCGAGGAAAAGAAATGG	55	1,5	35	dominant		dominant
MACE27	comp36659_c0_seq1	F: AAGAGTCAGCGGTGAAGAGC R: GAATCCCAAAACCTCGAACA	60	2,5	35	InDel	InDel	
MACE3	noHitAssembly_c10497_g1_i1	F: TCAACGTCGGTGATCTGTTCC R: TTGAGAAAAGTTGGGGAGACC	55	1,5	40	dominant		dominant
MACE4	noHitAssembly_c10497_g1_i2	F: TCAACGTCGGTGATCTGTTCC R: CATGTGAATGATCGCAATAAAA	55	2,5	35	codominant: Taq ^{a1}		
MACEtp01A-5R	comp30448_c0_seq1	F: CGAGATCGTCGTACTACCGGACAGTA R: CGACATCTGCCAAGTTGTGTATCGTACA	55	1,5	35		InDel	
MACEtp01B-5R	comp30448_c0_seq1	F: GAGATAGGAGGAGGTTGATAAGGTCATT R: CGACATCTGCCAAGTTGTGTATCGTACA	55	1,5	35		InDel	

Fortsetzung Tabelle A13

Primer	Sequenzbezeichnung	F- und R-Primer (5'→3')	Tm [°C]	MgCl2 [mM]	Zyklen	R1620 x R347/1	W-R-ADL ^a	L2039-N x DH ^b
MAcEtp04	comp31371_c0_seq2	F1: GGAGATCTCAAAAATTGGTGGAAAGAGGGCCA F2: GGACAGCAGCGTCCACTGCCTGGACT R1: GACCCCGGTGCTAGAACTAACGCTACAA R2: TCACACGAAAGGACCAAGTTGACGAAGCAAAG	58	1,5	35	dominant		
MAcEtp05-5R	comp18600_c0_seq1	F: ATCGTCATTAAAGTGGTGCTCAA R: CAAATCGACGCCGATAACCT	55	1,5	35		InDel	
MAcEtp15	noHitAssembly_c10806_g1_i1	F1: GCTGGACAGGAAAGCGACACAGATCA F2: TGAAGAGTTCTTGAAGAAACAGACTCCC R1: GGTAGTCGAAGAGCACACCGTGGTTCA R2: CTGTGCACAGGAAACATCGAGGCA	58	2,5	35	InDel		
Sc5R14198	EMT14198	F: ACAAGCAGGCTAAGCCATTA R: ACGCTTCTACGGTGAGACTGA	62	1,5	35	dominant		
Sc95436_5	Lo7_v2_contig_95436	F: ATCTGTGTCGCTTTCCTGTC R: GATTACTGTTTCACCCAGTCACC	55	2,5	35			
tcos1137	BE444820	F: ACTCCATCTCCATGCACCTC R: AGCTTCATCATTCCGGTGT	55	1,5	35	codominant: HinP1I + EcoRI	InDel	codominant: HinP1I + EcoRI
tcos3110	CD452925	F: TTTGGCGAGCCTTCTCTTA R: CCCCAGAAATTGCTGTTACC	55	1,5	35		InDel	codominant: HinfI + HindIII
tcos4366	BE495011	F: GAATTCATCTCACTCGCGG R: TAAGCTGCTGAACCCGTTCTCT	55	1,5	35	codominant: RsaI + XbaI	InDel	codominant: RsaI + XbaI

^a W-R-ADL: Weizen-Roggen Additionslinien, ^b Ressource Population: Martis et al. (2013)

Tabelle A 14 Hochdichte Kopplungskarte von Chromosom 5R in der Population *L2039-N x DH*.

Aufgrund der Länge ist Tabelle A 14 nicht hier aufgeführt, sondern verfügbar als Supplementary Table 7 in Braun et al. (2019) und online unter

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2019.00857/full#supplementary-material>

Tabelle A 15 Vorhergesagte Genmodelle im Chromosom 4B-Scaffold *TGACv1_scaffold_320553_4BL* im Weizen und deren entsprechendes Gen.

Vorhergesagte ^c kodierende Sequenz ^a für <i>TGACv1_scaffold_320553_4BL</i>	Weizengen ^b
<p>>TGACv1_scaffold_320553_4BL:g8.t1</p> <p>atgccggcctccggcgagggtggcaccacctccgacccccctctggtgacagctatcgacagctgctccgcaaagg aggtggcgacggctttgtccggcgctggcggccgagagcctggccgtgctggagtgcgacctccgatgatcgact tggagcgctgatgatggcgacgctagggagagggcgctgtgtatggacgcatggcgagcggcgctggagt gggcttctccaggtgatcaaccacggcgtggggcaggagctcctggaggagatgaggcgggagcaggcgggta tttcaccagcgttcaatatcaaggagaaggccggactcctcaacgggtcgtaccgggtgggggaccccgacggcgac gtcgctccggcagctctcgtggcggaggccttccagctccgctcgaagcatctctggggaagacgactgcgggca tgcagagctcagctccctgaggggagtgatgcaggaggtggcggccgcatgtcggggtggcggacacgggtggcc gggacgctggcgaagaacctgggacagctcgcgctcccgggcggcgggggtgcgacgggacgactgcttcc tgcggctgaacaggtaccggcgctgccgttcggcgggacacgctcggcatggtgcccacacggacagcactc ctacccgtcctttgccaggaccaggttggggcctggagatcatgaaggactcccactgggtcgtgtgaaacccac gcccacgctcatggtcaacgtcggcgatttgttccaggcgtggagcaacaacagatacaagagcgtggagcaca ggggtgggccaactccaaggcggagcgttctccgtcgcctacttcatgtcccgcggtgactcggcgtcgga catgcccagcgtcggcgtacaagcgttacctcggggagtacaggcgcgaaggtgcaggaaatgtcacgcg aacggggaagaagattggtctgtccaactttcacaaggttctaccttgacggcctggctgaatga</p>	<p><i>TraesCS4B02G376200</i></p>
<p>>TGACv1_scaffold_320553_4BL:g9.t1</p> <p>atggactcggatgacgaggaagtgtcgcggcgtgctggaggaggaagccgaggccgactccaggaagaagag catctcatggtgctcggcgtctcggcagctgctggcgagcaatgaaaagccgcgagggtggctcggcgccggg gccgggtgaaagcaagaaccgtcatcgtctcgaaggctactgcatgctcactccgactctcggatgctccact tcacggcgacagaacatttcggcgccgttatcggatgaacagaaagctttcctcgggattgtgaattccatccggga gttcgaactacttcaaatgcaagatgaattgcaccggcaacttgattcacctccatccagaaatgcacgacag cgatgaggatgcttcatacggagctcccagtgactcacaggacgactatggcgcatggcggagtcaccagcata gagtgttttacaagtctcggcgagtggggatgtacaaggcggcaaaaggcgggttgagtggtgacttgaggc ggtggccacacaggacctcggatttggcactccttcttggatgccaggaaactcataatgacatcaactgctgca tgctctcgtctttgccaagcttgtgaaggtcattctcctccggtgaactcagatcaatggcgggcagtaaca aggggtactatctagctgatggcatctatccgagatggtcgacatttgaagacctcaaaaacctgtgcctggag gcaagaacgcctggtttgcaagatttag</p>	<p><i>TraesCS7B02G495500</i></p>
<p>>TGACv1_scaffold_320553_4BL:g10.t1</p> <p>atgcgcatgcccgggtgctcggcgctcagcttcagcttcagaccgcccggcggcggcggctgagccggcggcggctgct cctcgggtgctcggccccggctccggcgccggctgcgacctacgggtgactcaacatctacgacatctcccca tcaacaactactctactggttcggcctcggcatcttccactccgctccaagtgcatggtatggagttgggtatgg agcccacgaatacgcgaccagcggaggttccaagtagaacgaaagctgtcctggcttattctcaggcgtcctc gtgtatgggaccaccaatattcggggcgaagtcggcgttctcctagaggatctggcagaggattatcatgggga cacctatcacttgattgcaagaactgtaaccattcacagctgacgtctgtaagcgttgactggaaagccaactcct ggatgggtgaatcacttgcagattaggttccgtctgcaactgtgttctgctgaaaacatcaagtttcagcggctca gagatgaaactgcacacctgaaatttctgatgatgattggagtcggacacatcgatcatcgacagcagatcggtg atctagatcacctctcacaacgcaaacgcgacgtcgtacctccgaaagacaagacgttaactcctggaagagat agcttghtaa</p>	<p><i>TraesCS4B02G376300</i></p>

Fortsetzung Tabelle A 15

>TGACv1_scaffold_320553_4BL:g11.t1*TraesCS4B02G376400*

atggactccaaggaggagcaccgcccgcgcccgaagccaatggcctctccgacctcaacaaggagaccgtcgatc
 tggagcacatcccgtggaggaggctctcgacacctcaggtgcaccaaggaggcctcaccaccgagggcgccca
 gcagagggtcgagatcttcggatacaacaagctcgaagagaaaaatgagagcaagatcctcaagtctctgggcttc
 atgtggaacccgctctctgggtcatggaggccggcaatcatggcgatcgccctcgccacaatggaacggacct
 caggggaaggccgatgagatagactaccagatttctggaatcgtcattctcttggctgcaactccaccatcag
 ctctgtagaggagaacaacgcccgaatcgcgcccgccttatggcccctcgaccaaaggctaaggctctgc
 gtgatggcacctggaatgaatagatgcactgttgggtccgggtgataatcagtaataagcttgagacatcat
 tctgtgatgcgcccctctcgaggcgatccgctgaagattgatcagctgcactgacaggagaatcactgcccgt
 aactaagcatcccgggggtggagtttactctggttcgactgtaagcagggtgaaatagaagcagttgttattgccac
 cgggatccatacctcttggaaaagctctcacctcgttgagtcaaccaccacgtcggccacttccagaaggttctc
 acatcgatcgaaactctgcatcttctccattggcattgggatgactatcgagtaattgtgatggcggtgttcaaca
 cagaccgtaccgacagcttgataacctctggtgcttctcattggagggtccaattgcgatgcccacggttctg
 tctgtaaccatggctattggatcacacaagcttgacagcagggtgctattaccaagagaatgactgcaattgaaga
 gatggccggaatggacgtcttgcagtgacaaaacaggaacattgacactcaaaaactgactgtagacaacaat
 ataattgaggttttactagaggttacgaaaagagtgatgctgttgatggccgcaaggcctcaagactggagaat
 caggatgctattgattcgctattgttccatgctccagaccaaaaggcagctgctggcatcgaagaagtcatt
 tccttccatttaaccaacggacaagcgacagctctcactgacttggatgataagggtaaaatgcacagggtagc
 aaagggtctcctgaacagattctgaaactggcagcaataaatctgagatcgaagaaaggtccatcaagtaattg
 acaatttctgtagaggggctcggctcgttctgttgcatacaggaagttcctgaaggtaccaaggaaagtctg
 gtggacctggcaatttattggctctcccactcttctgatctcccgcctgatagtgcgaaaccatacgcgagct
 ctgacctggagtcagtgaaaatgattacaggtgatcagttggctattggtaaggaaactggcgagggtagg
 aatggccaccaacatgtatcctcatcatcttctggtgacaaaatagatagtgacatcgcggtctaccagtggac
 gaactgattgagcaggcagatggtttccggaggttccctgagcaaaaatgaaattgtcaagggtccaagc
 cagaaagcacatgcccggatgacaggagatggagtaacgatgcacctgctcgaagatatacgtgtttctataa
 ccatccgtattgtctgttttctcttggcgtgcccctggaagttgactccctcaataatggttctctgatagc
 catcctaatgatgggaccatcatgaccatccaaagataaggtaagccgtctccgtgctcagacagttggaagct
 agcagagatctcgaacaggggtgactggggcttactggccgtaacaaccgtttgttctctggcggttat
 cagaccgacttttccgagacacttccatgtgcgcacgttgaatgtacacagatcagataaagaagacatggatgcg
 gtcgagggaaacagagatgctggcctcgcggtgacctccaagtgagcaccatcagccaggccctcatattcgtg
 acggtgctgagaggctgctcctcacggagagggcctggttctctgcttattgttgcgttctgcttggctcagctgatcg
 gctctgtctgctcctggcagatctgggagctggccagcatcagaggcatcggatggggctggacgggctcatctg
 gactgtacaacatcgtcatcatctcctggaccgatcaagttcgcgtgagggctcaggggagggcctg
 gaacctgctcaccgacaagaaggtggcgttttgaaccagaagaacttgggaaggaggcgtcagggcggtgg
 gcgacagcagcgcacgctgcacgggtggagtcggcgccggggcgaggagaaggcggtcctatggagctgggg
 cacatggcgaggagaccaagcggcgccggagatcacaggctcggggcggtgcgacgctcaagggcaaggt
 ggagaacgcccatactcaagggtcgcacctggacaacatcaacaaccagcattacaccgtgta

>TGACv1_scaffold_320553_4BL:g12.t1

atggaagctctgggctccttactcgggggacatggcagcctgaaaactctgttggctcatagagatgacagaaa
 gcttcaggagcagcagtgatcatttctgggatggcttggcgcctccccactgctcagaggttcagattctctcggc
 gcagggctacatgttcgacggatccaacatggatggggcaactggcaacctctgcatcttgaagatcgccgtg
 ggggactgctgaggtatggttgacatcctcagaggactgcagccctcactgctctgctgctgacgtcagtcga
 cgccggtcagctgggtgtgttggacctaa

>TGACv1_scaffold_320553_4BL:g13.t1*TraesCS4B02G376500*

atgtccgccaagcggccccggcggtcgcggggcccttgacaggccggcgagcctccgcccggccgcccgcg
 cgctggccgcttcgcccccccgtcggccttctccggccccgcagcggaggcggcggtccgcccgtg
 cgcaacctccgaccttccgcccactacgcccgtgatccagttggcgctgctgctggcctccctcgccccgccac
 cgccctcatgcttctcatggccctccaaggcctgctcctacggggccctcctccgccccttccccgctc
 cgctcctccgcccctcctcagccgcccctcgtcgcgctctctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctc
 ccggggcgctgcccactcctctcgcctcggcaggcggccccgctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctc
 cgacgacctcagccccggggcgccgctccgcccacaacggcgccggggggaggaggaggaggccaggggtg
 cgtgtggagaagaaggaggacggcgacatggagaccggccgacgcccgtcctcggcacggccgcccgaagtc
 ctg

^a Mayer et al. (2014); ^b Appels et al. (2018); ^c Stanke et al. (2008)

7. DANKSAGUNG

Frau Prof. Dr. Chris-Carolin Schön möchte ich an dieser Stelle für die Zusage ihrer Betreuung meiner Arbeit, die sehr gute fachliche Beratung und ihre wissenschaftlichen Anregungen, sowie ihre Unterstützung, die mich stets sehr motivierte die Arbeit fortzusetzen, herzlich danken.

Herrn apl. Prof. Dr. Volker Mohler und Herrn Prof. Dr. Ralph Hückelhoven gilt mein Dank für ihr Mitwirken im Prüfungskomitee.

Herrn Dr. habil. Peter Wehling gilt mein Dank für die Überlassung der Forschungsinfrastruktur am Julius Kühn-Institut zur Durchführung der experimentellen Arbeiten. Herrn Dr. Bernd Hackauf gilt mein besonderer Dank für die Konzeption des interessanten Themas, die Betreuung der Arbeit, für seine wissenschaftlichen Anregungen, die Begleitung bei den Experimenten und den Austausch über das Forschungsthema.

Für ihre engagierte Mithilfe bei der Versuchsdurchführung am Julius Kühn-Institut (JKI) in Groß Lüsewitz danke ich Marion Hos, Fanny Breski, Rita Friedrich und Gunda Kölzow. Ebenso danke ich dem Versuchsfeldteam am JKI, dabei insbesondere Heidi Jürß und Grit Waldbauer. Mein großer Dank gilt Konrad Schwefel für seine experimentellen Arbeiten am JKI zur Kartierung von Gibberellinen im Roggen im Rahmen seiner Masterarbeit.

Für stets sehr wertvolles fachliches Feedback zu Ergebnissen und beim Verfassen der Publikation danke ich ganz besonders Frau Dr. Eva Bauer. Frau Dr. Monika Frey danke ich sehr herzlich für das Korrekturlesen dieser Arbeit und ihre sehr wertvollen Tipps zur Fertigstellung der Dissertation.

Darüber hinaus danke ich Frau Dr. Dörthe Siekmann (HYBRO Saatzucht GmbH & Co. KG) für die sehr gute Zusammenarbeit bei der Durchführung des Projekts und den Gedankenaustausch über die Getreidezüchtung.

Darüber hinaus möchte ich die finanzielle Unterstützung durch Mittel des Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) über die Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (ptble) als Projektträger des BMEL für das Förderprogramm Deutsche Innovationspartnerschaft Agrar erwähnen, wodurch das Projekt OPTIMALL (Förderkennzeichen 2814IP001) ermöglicht wurde.

Martin Breun und dem Team der Firma Saatzucht Breun sei Dank für die sehr angenehme Zusammenarbeit, die mich motivierte die Doktorarbeit neben dem Beruf fertig zu stellen. Frau Dr. Anja Hanemann danke ich außerdem für das Korrekturlesen der Arbeit.

Ich bedanke mich bei Frau Dr. Wiltrud Erath für den langjährigen Austausch und ihre hilfreichen Anmerkungen zu dieser Arbeit.

Meinen Eltern danke ich für ihre fortwährende, großartige Unterstützung und ihr Verständnis während der Zeit. Meiner Schwester Alexandra danke ich für ihre Hilfe bei Problemen und Erfolgen, sowie ihre Tipps, die zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen.