

Legends for Supporting Information

Supplementary figure S1: Design and efficiency of guide RNAs for *CiGAS*.

(a) Alignment of the *CiGAS* exon 4 sequences with differences shaded. The positions of the five sgRNAs are underlined and the PAM sequences of each are labelled and shown in bold. (b) Quantification of the indels generated by each sgRNA.

Supplementary figure S2: Sequence of the cassette carrying three guide RNAs.

The Arabidopsis U6 promoter is shown in italics, the tRNA sequences are in bold and the guide RNAs are underlined and are in order (sgRNA1, sgRNA 1.1, sgRNA 1.2).

Supplementary figure S3: Mutations in the *CiGAS* genes of regenerated chicory plants. The indel mutations present in all of the lines analyzed for STL content are shown. For each gene the target site is shown underlined with the mutations present in each allele. Alleles without indels are indicated as wild type (WT). Inserted nucleotides are underlined.

Supplementary figure S4. Molar mass distributions of inulin (in 0.1 M NaOH) against Pullulan standards for chicory lines PL4, PL6 and RN12.

Supplementary figure S5: Comparison of mass spectrum of a.) authentic squalene standard to b.) the mass spectrum of squalene produced by chicory.

Supplementary figure S6: Correlation of radical scavenging activity (IC50 values) and total content of sesquiterpene lactones STLs (A and C) and phenolic compounds PCs (B and D) in chicory lines PL4, PL6 and RN12. Leaf samples (A, B) and root samples (C, D).

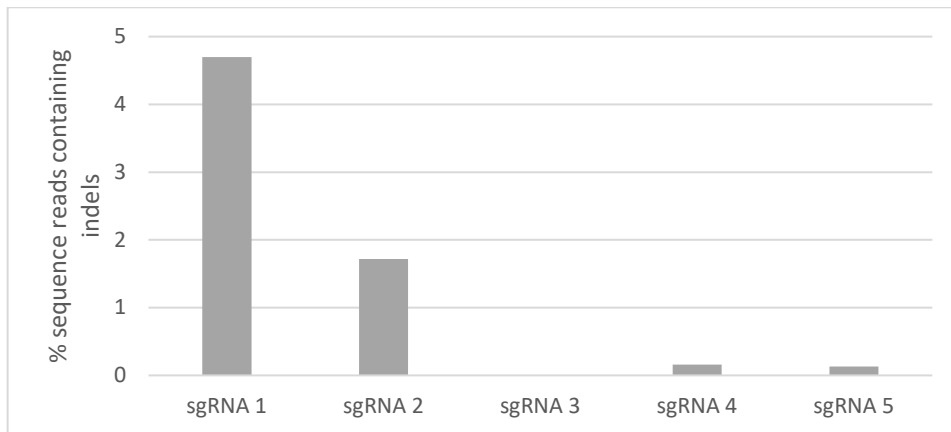
Supplementary table S1: Primers used for genotyping.

Supplementary figure S1

a.)

| | | |
|--------|---|--------|
| | sgRNA1 | sgRNA2 |
| GAS-S1 | GTGGTGAAGGATATGAGGTTCCAGGAACTACT CCT TACATAAGGGATAGAGT CCA GAGATT | |
| GAS-S2 | GTGGTGAAGGATATGAGGTTCCAGGAACTACTCCTTACATAAGGGATAGAGTACCAGAGATT | |
| GAS-S3 | GTGGTGAAGGATATGAGGTTCCAAGAACTACTCCTTATAAGGGATAGAGTACC CG GAGAT C | |
| GAS-L | GTGGTGAAGGATATGCAATTCCAACAATCCGTCCTTACATAAGAGATAGAGTACC GG GAGATA | |
| | sgRNA3 | sgRNA5 |
| GAS-S1 | <u>TACTTATGGATATTGGGATTGTACTTTGAGCCTCGTTACTCCTTGGCACGAATCATCGCCACAA</u> | |
| GAS-S2 | TACTTATGGATATTGGGATTGTACTTTGAGCCTCGTTACTCCTTGGCACGAATCATCGCCACAA | |
| GAS-S3 | TACTTATGGATATTAGGATTGTACTTTGAGCCTCGTTACTCCTTGGCACGAATCATCGCCACAA | |
| GAS-L | TACCTATGGATTTTGGGGTTATATTTTCGAGCCGTATTACTCTCGGGCACGTATCATAGCCACTA | |
| | sgRNA4 | |
| GAS-S1 | <u>AAATAACATTGTTTCTGGTGGTGCTAGATGACACATATGATGCGTACGCTACCATTGAAGAGAT</u> | |
| GAS-S2 | AAATTACATTGTTCTGGTGGTCTAGATGACACATATGATGCATACGCTACCATTGAAGAGAT | |
| GAS-S3 | AAATTACATTGTTTGGTGGTCTAGACGACACATATGATGCATGCTACAATTGAAGAAAT | |
| GAS-L | AAATCACGTTGTTCTGGTGGTTTTGGACGATACATATGACGCGTATGCTACAATTGACGAGAT | |
| GAS-S1 | TCGACTTCTAACAGATGCCATAAACAG | |
| GAS-S2 | TCGACTTCTGACAGATGCCATAAACAG | |
| GAS-S3 | TCGTCCTTTAACTGATGCCATAAATAG | |
| GAS-L | CCGATCGATCACAGATGCGATTAAATAG | |

b.)



Supplementary figure S2

GGAGTGATCAAAAAGTCCCACATCGATCAGGTGATATATAGCAGCTTAGTTTATATAATGATAGAGTCGAC
ATAGCGATTGAACAAAGCACCAGTGGTCTAGTGGTAGAATAGTACCCTGCCACGGTACAGACCCGGGTTC
GATTCCCGGCTGGTGCA*GGTACTCTATCCCTTATGTAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAG*
GCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCAACAAAGCACCAGTGGTCTAGTGGTAG
AATAGTACCCTGCCACGGTACAGACCCGGGTTCGATTCCCGGCTGGTGCA*GGTACTCTATCCCTTATATA*
GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGT
CGGTGCAACAAAGCACCAGTGGTCTAGTGGTAGAATAGTACCCTGCCACGGTACAGACCCGGGTTCGATT
CCCGGCTGGTGCA*GGTACTCTATCTCTTATGTAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTA*
GTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTTTT

Supplementary figure S3

Mutations in the GAS genes of regenerated chicory plants

| RN4 GAS-S1 (-5/-11) | RN4 GAS-S2 (-9/-9) | RN4 GAS-S3 (-7/ins) | RN4 GAS-L |
|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| <u>GGTACTCTATCCCTTATGTAAGG</u> | <u>GGTACTCTATCCCTTATGTAAGG</u> | <u>GGTACTCTATCCCTTATATAAGG</u> | <u>GGTACTCTATCTCTTATGTAAGG</u> |
| GGTACTCTATC-----TGTAAGG | GGTACTC-----TGTAAGG | GGTACTCTAT-----ATAAGG | GGTACTCTATCTCTTATGTAAGG |
| GGTACTC-----TAAGG | GGTACTC-----TGTAAGG | Insertion | GGTACTCTATCTCTTATGTAAGG |
| | | | |
| RN5 GAS-S1 (-12/-9) | RN5 GAS-S2 (WT) | RN5 GAS-S3 (WT) | RN5 GAS-L (WT) |
| <u>GGTACTCTATCCCTTATGTAAGG</u> | <u>GGTACTCTATCCCTTATGTAAGG</u> | <u>GGTACTCTATCCCTTATATAAGG</u> | <u>GGTACTCTATCTCTTATGTAAGG</u> |
| GG-----TATGTAAGG | GGTACTCTATCCCTTATGTAAGG | GGTACTCTATCCCTTATATAAGG | GGTACTCTATCTCTTATGTAAGG |
| GGTACTC-----TGTAAGG | GGTACTCTATCCCTTATGTAAGG | GGTACTCTATCCCTTATATAAGG | GGTACTCTATCTCTTATGTAAGG |
| | | | |
| RN6 GAS-S1 (-4/-19) | RN6 GAS-S2 (WT) | RN6 GAS-S3 (-4/WT) | RN6 GAS-L (WT) |
| <u>GGTACTCTATCCCTTATGTAAGG</u> | <u>GGTACTCTATCCCTTATGTAAGG</u> | <u>GGTACTCTATCCCTTATATAAGG</u> | <u>GGTACTCTATCTCTTATGTAAGG</u> |
| GGTACTCTATCC----TGTAAGG | GGTACTCTATCCCTTATGTAAGG | GGTACTCTATCCC---ATAAGG | GGTACTCTATCTCTTATGTAAGG |
| -----TAAGG | GGTACTCTATCCCTTATGTAAGG | GGTACTCTATCCCTTATATAAGG | GGTACTCTATCTCTTATGTAAGG |
| | | | |
| RN7 GAS-S1 (-4/-17) | RN7 GAS-S2 (-11/-11) | RN7 GAS-S3 (-2/-7) | RN7 GAS-L (WT) |
| <u>GGTACTCTATCCCTTATGTAAGG</u> | <u>GGTACTCTATCCCTTATGTAAGG</u> | <u>GGTACTCTATCCCTTATATAAGG</u> | <u>GGTACTCTATCTCTTATGTAAGG</u> |
| GGTACTCTATCC----TGTAAGG | GGTACTCT-----AAGG | GGTACTCTATCCCTTA--TAAGG | GGTACTCTATCTCTTATGTAAGG |
| GGT-----AAGG | GGTACTCT-----AAGG | GGTACTCTAT-----ATAAGG | GGTACTCTATCTCTTATGTAAGG |
| | | | |
| RN8 GAS-S1 (-7/-14) | RN8 GAS-S2 (-10/-13) | RN8 GAS-S3 (-2/WT) | RN8 GAS-L (WT) |
| <u>GGTACTCTATCCCTTATGTAAGG</u> | <u>GGTACTCTATCCCTTATGTAAGG</u> | <u>GGTACTCTATCCCTTATATAAGG</u> | <u>GGTACTCTATCTCTTATGTAAGG</u> |
| GGTACTC-----TATGTAAGG | GGTACTCTAT-----AAGG | GGTACTCTATCCCT--TATAAGG | GGTACTCTATCTCTTATGTAAGG |
| GG-----TGTAAGG | GGT-----TGTAAGG | GGTACTCTATCCCTTATATAAGG | GGTACTCTATCTCTTATGTAAGG |
| | | | |
| RN9 GAS-S1 (-9/-9) | RN9 GAS-S2 (-10/WT) | RN9 GAS-S3 (-4/-4) | RN4 GAS-L (WT) |
| <u>GGTACTCTATCCCTTATGTAAGG</u> | <u>GGTACTCTATCCCTTATGTAAGG</u> | <u>GGTACTCTATCCCTTATATAAGG</u> | <u>GGTACTCTATCTCTTATGTAAGG</u> |
| GGTACTCTA-----TAAGG | GGTACTC-----GTAAGG | GGTACTCTATCCC---ATAAGG | GGTACTCTATCTCTTATGTAAGG |
| GGTACTCTA-----TAAGG | GGTACTCTATCCCTTATGTAAGG | GGTACTCTATCCC---ATAAGG | GGTACTCTATCTCTTATGTAAGG |

RN10 GAS-S1 (-3/-5) RN10 GAS-S2 (-6/-3) RN10 GAS-S3 (-7/WT) RN10 GAS-L (WT)

GGTACTCTATCCCTTATGTAAGG GGTACTCTATCCCTTATGTAAGG GGTACTCTATCCCTTATATAAGG GGTACTCTATCTCTTATGTAAGG
GGTACTCTATCCC---TGTAAGG GGTACTCTAT-----TGTAAGG GGTACTC-----TATATAAGG GGTACTCTATCTCTTATGTAAGG
GGTACTCTATCC-----GTAAGG GGTACTCTATCCC---TGTAAGG GGTACTCTATCCCTTATATAAGG GGTACTCTATCTCTTATGTAAGG

RN11 GAS-S1 (-7/-7) RN11 GAS-S2 (-5/-5) RN11 GAS-S3 (-2/-2) RN11 GAS-L (WT)

GGTACTCTATCCCTTATGTAAGG GGTACTCTATCCCTTATGTAAGG GGTACTCTATCCCTTATATAAGG GGTACTCTATCTCTTATGTAAGG
GGTACTCTAT-----GTAAGG GGTACTCTATC-----TGTAAGG GGTACTCTATCCCT--TATAAGG GGTACTCTATCTCTTATGTAAGG
GGTACTCT-----ATGTAAGG GGTACTCTATC-----TGTAAGG GGTACTCTATCCCT--TATAAGG GGTACTCTATCTCTTATGTAAGG

RN12 GAS-S1 (-4/-7) RN12 GAS-S2 (+1/-7) RN12 GAS-S3 (-7/-16) RN12 GAS-L (WT)

GGTACTCTATCCCTTATGTAAGG GGTACTCTATCCCTTATGTAAGG GGTACTCTATCCCTTATATAAGG GGTACTCTATCTCTTATGTAAGG
GGTACTCTATCC---TGTAAGG GGTACTCTATCCCTTATGTAAGG GGTACTC-----TATATAAGG GGTACTCTATCTCTTATGTAAGG
GGTACTC-----TATGTAAGG GGTACTC-----TATGTAAGG GG-----TAAGG GGTACTCTATCTCTTATGTAAGG

RN13 GAS-S1 (-11/-11) RN13 GAS-S2 (-12/-6) RN13 GAS-S3 (-9/-7) RN13 GAS-L (WT)

GGTACTCTATCCCTTATGTAAGG GGTACTCTATCCCTTATGTAAGG GGTACTCTATCCCTTATATAAGG GGTACTCTATCTCTTATGTAAGG
GGTAC-----ATGTAAGG GGTAC-----GTAAGG GGTAC-----TATATAAGG GGTACTCTATCTCTTATGTAAGG
GGTACTC-----GTAAGG GGTACTCTAT-----TGTAAGG GGTACTC-----TATATAAGG GGTACTCTATCTCTTATGTAAGG

RN14 GAS-S1 (-7/-7) RN14 GAS-S2 (-9/-7) RN14 GAS-S3 (-3/-3) RN14 GAS-L (-11/WT)

GGTACTCTATCCCTTATGTAAGG GGTACTCTATCCCTTATGTAAGG GGTACTCTATCCCTTATATAAGG GGTACTCTATCTCTTATGTAAGG
GGTACTC-----TATGTAAGG GGTACTC-----TGTAAGG GGTACTCTATCCC---TATAAGG GGTACTC-----TAAGG
GGTACTC-----TATGTAAGG GGTACTC-----TATGTAAGG GGTACTCTATCCC---TATAAGG GGTACTCTATCTCTTATGTAAGG

RN15 GAS-S1 (-16/WT) RN15 GAS-S2 (WT) RN15 GAS-S3 (-5/WT) RN15 GAS-L (WT)

GGTACTCTATCCCTTATGTAAGG GGTACTCTATCCCTTATGTAAGG GGTACTCTATCCCTTATATAAGG GGTACTCTATCTCTTATGTAAGG
GGTACTCTATCCCTTATGTAAGG GGTACTCTATCCCTTATGTAAGG GGTACTCTATC-----TATAAGG GGTACTCTATCTCTTATGTAAGG
GGTACTCTAT----- GGTACTCTATCCCTTATGTAAGG GGTACTCTATCCCTTATATAAGG GGTACTCTATCTCTTATGTAAGG

PL5 GAS-S1 (-9/-12) PL5 GAS-S2 (WT) PL5 GAS-S3 (-2/-9) PL5 GAS-L (-6/-6)

GGTACTCTATCCCTTATGTAAGG GGTACTCTATCCCTTATGTAAGG GGTACTCTATCCCTTATATAAGG GGTACTCTATCTCTTATGTAAGG
GGTACTCTAT-----AAGG GGTACTCTATCCCTTATGTAAGG GGTACTCTATCCCTT--ATAAGG GGTACTCTAT-----TGTAAGG
GGTAC-----GTAAGG GGTACTCTATCCCTTATGTAAGG GGTACTCTAT-----AAGG GGTACTCTAT-----TGTAAGG

RN16 GAS-S1 (-2/-11)

GGTACTCTATCCCTTATGTAAGG
GGTACTCTATCCC--ATGTAAGG
GGTACTC-----TAAGG

RN16 GAS-S2 (-2/-11)

GGTACTCTATCCCTTATGTAAGG
GGTACTCTATCCC--ATGTAAGG
GGTACTC-----TAAGG

RN16 GAS-S3 (-9/-7)

GGTACTCTATCCCTTATATAAGG
GGTACTC-----TATATAAGG
GGTACTC-----TATAAGG

RN16 GAS-L (-7/-16)

GGTACTCTATCTCTTATGTAAGG
GGTACTC-----TATGTAAGG
G-----GTAAGG

RN17 GAS-S1 (-6/-5)

GGTACTCTATCCCTTATGTAAGG
GGTACTCTAT-----TGTAAGG
GGTACTCTAT-----ATGTAAGG

RN17 GAS-S2 (-10/-6)

GGTACTCTATCCCTTATGTAAGG
GGTACTCT-----TAAGG
GGTACTCTAT-----TGTAAGG

RN17 GAS-S3 (-11/+1)

GGTACTCTATCCCTTATATAAGG
GGTACTCT-----AAGG
GGTACTCTATCCCTTAATAAGG

RN17 GAS-L (-8/-9)

GGTACTCTATCTCTTATGTAAGG
GGTACTCT-----TGTAAGG
GGTACTCT-----GTAAGG

PL6 GAS-S1 (-1/-1)

GGTACTCTATCCCTTATGTAAGG
GGTACTCTATCCCTTAT-TAAGG
GGTACTCTATCCCTTAT-TAAGG

PL6 GAS-S2 (-4/-4)

GGTACTCTATCCCTTATGTAAGG
GGTACTCTATCCC---GTAAGG
GGTACTCTATCCC---GTAAGG

PL6 GAS-S3 (-2/-11)

GGTACTCTATCCCTTATATAAGG
GGTACTCTATCCCTT-ATAAGG
GGTACT-----ATAAGG

PL6 GAS-L (-1/-5)

GGTACTCTATCTCTTATGTAAGG
GGTACTCTATCT----GTAAGG
GGTACTCTATCTCTTA-GTAAGG

PL7 GAS-S1 (-3/-3)

GGTACTCTATCCCTTATGTAAGG
GGTACTCTATCCCT---GTAAGG
GGTACTCTATCCCT---GTAAGG

PL7 GAS-S2 (-2/-2)

GGTACTCTATCCCTTATGTAAGG
GGTACTCTATCCCTT--GTAAGG
GGTACTCTATCCCTT--GTAAGG

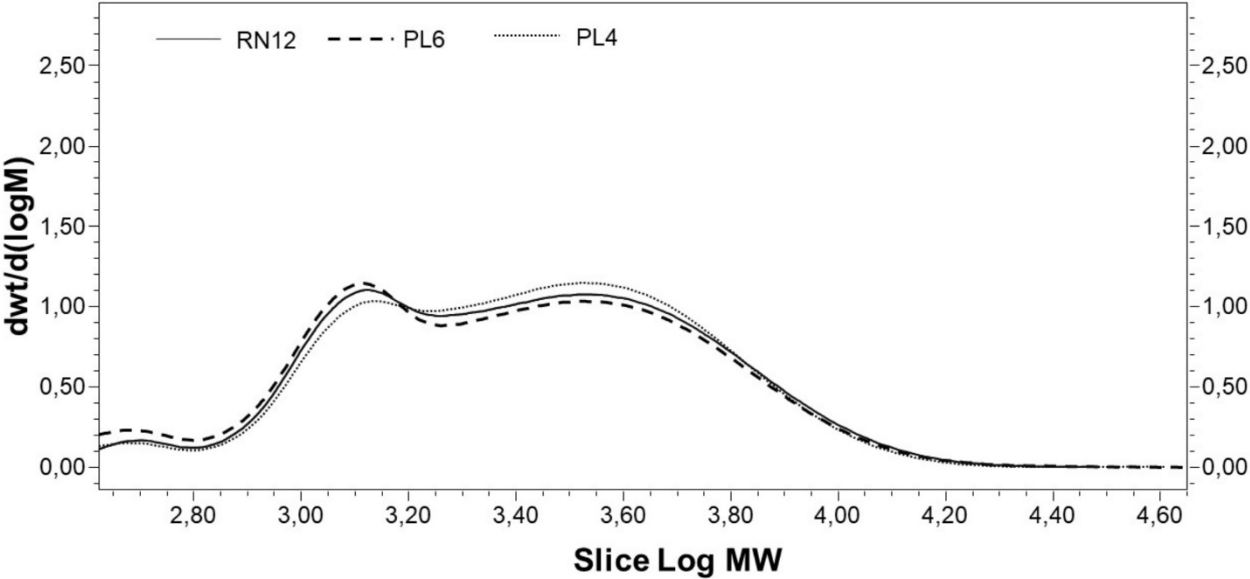
PL7 GAS-S3 (-4/-4)

GGTACTCTATCCCTTATATAAGG
GGTACTCTATCC----TATAAGG
GGTACTCTATCC----TATAAGG

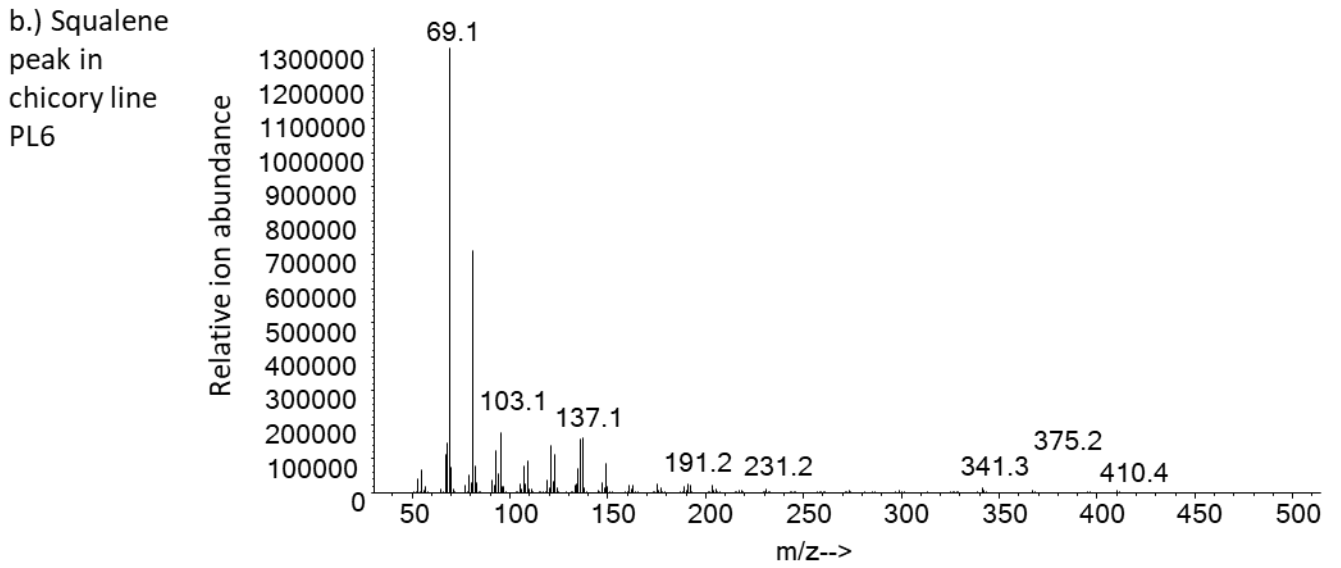
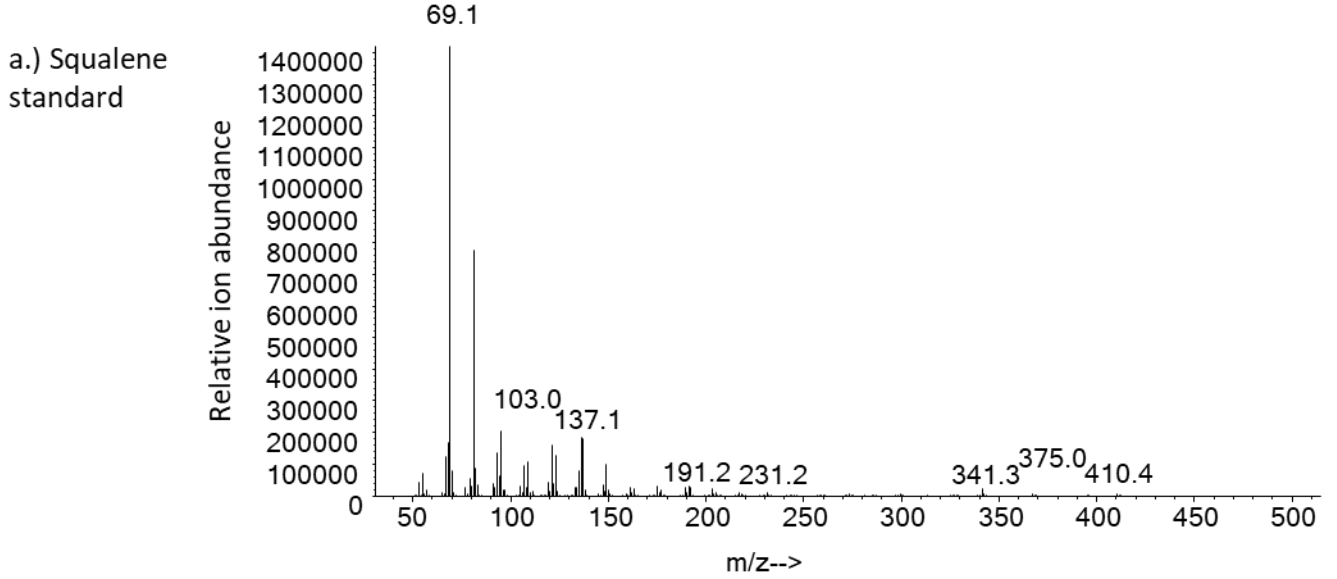
PL7 GAS-L (-5/-5)

GGTACTCTATCTCTTATGTAAGG
GGTACTCTATCT----GTAAGG
GGTACTCTATCT----GTAAGG

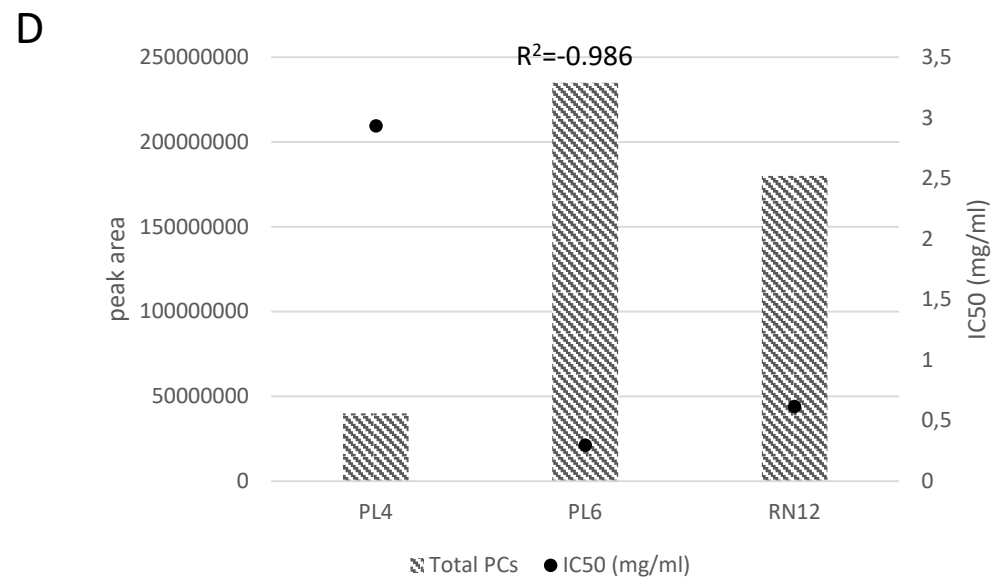
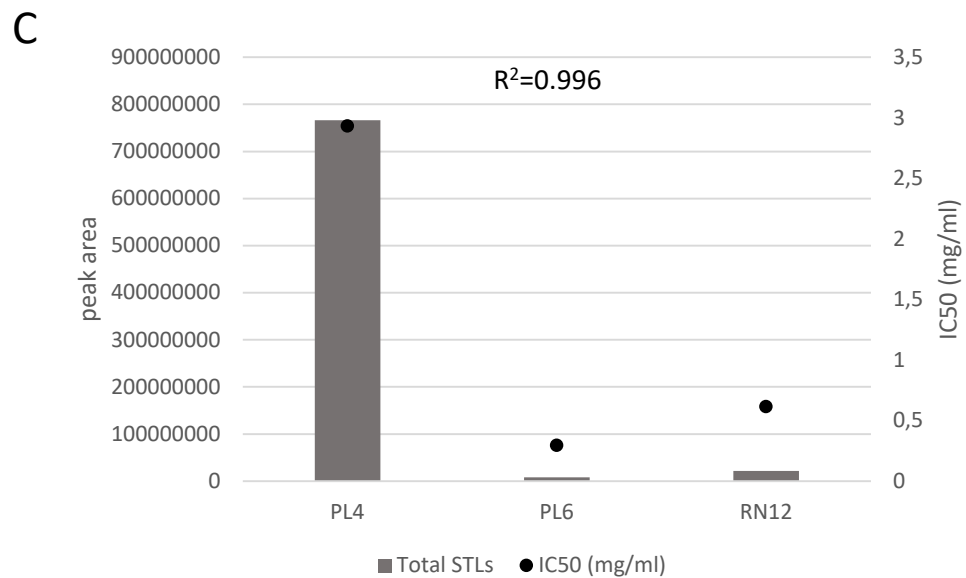
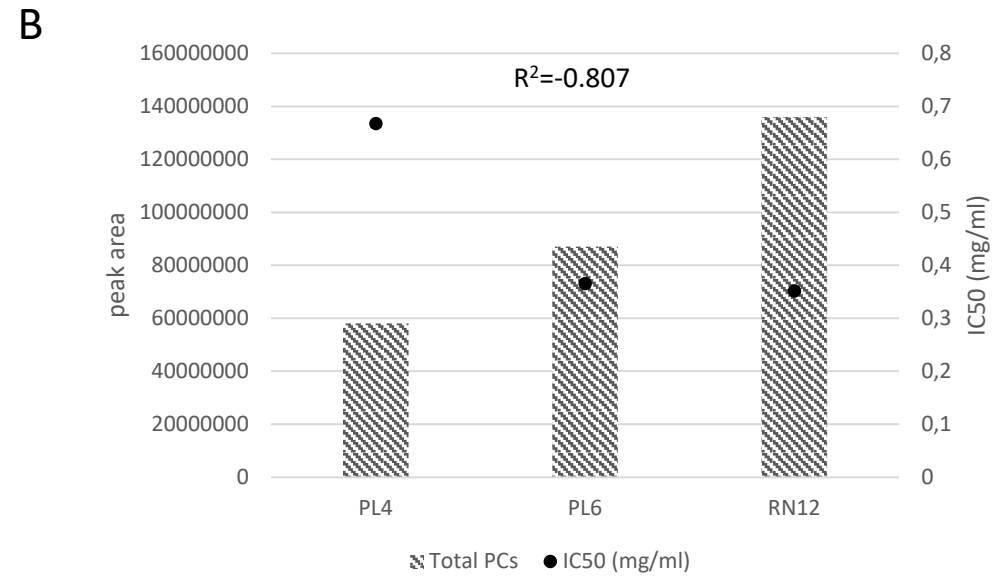
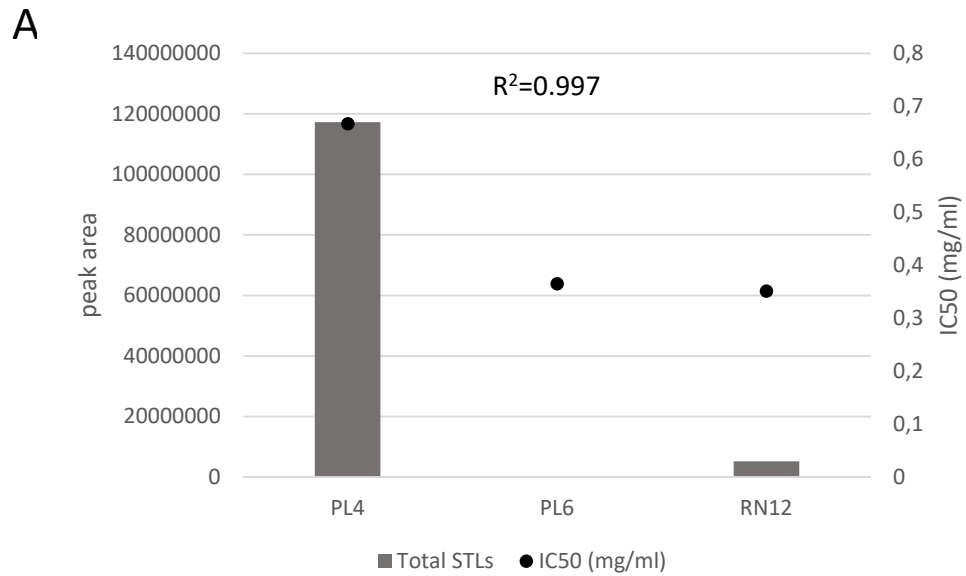
Supplementary figure S4



Supplementary figure S5



Supplementary figure S6



Supplementary table S1: Primers used in this study

| Primer | Sequence |
|--------------------|---|
| GAS-S1 F | TGTAAACCGTTGGGCTCGTC |
| GAS-S1 R | GAGTTTATAGCACATGCGT |
| GAS-S2 F | CTATTAATCGGCTTTGGTCAAC |
| GAS-S2 R | CCATATGGACTCGCTCAAAC |
| GAS-S3 F | GTTATTTTCAGTTCCCCAAGTGT |
| GAS-S3 R | GTGTTTTTGTCCCTATCCGTCT |
| GAS-L F | CGTACGTAGAGTGTCCAA |
| GAS-L R | CCCCAAAAGAAGCCCAATCC |
| GAS-S1/S2 F nested | ACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTATGAGGTTCCAGGAAACTA |
| GAS-S1/S2 R nested | TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGGCTCAAAGTACAATCCC |
| GAS-S3 F nested | ACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTATGAGGTTCCAAGAAACTA |
| GAS-S3 R nested | TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGGCTCAAAGTACAATCCT |
| GAS-L F nested | ACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTATGCAATTCCAACAATCCG |
| GAS-L R nested | TGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTACGGCTCGAAATATAACCCC |