

Abstract

The aerial architecture of higher plants is mainly determined by the pattern of shoot branches originating from axillary meristems in the leaf axils. Establishment of shoot branches involves two major steps, firstly, the initiation of axillary meristems in the axils of leaves, secondly, development into axillary buds and their outgrowth. The plant hormone auxin is known for many years because of its function in inhibiting the outgrowth of axillary buds, a phenomenon called apical dominance. In addition, it is shown that auxin is involved in axillary meristem initiation in maize. However, whether and how auxin manipulates axillary meristem formation in eudicots is poorly understood. The aim of this study was to investigate the role of auxin in axillary meristem formation in two eudicot model plants: *Arabidopsis* and tomato.

Firstly, the branching phenotypes of polar auxin transport mutants were analyzed. Both the auxin efflux carrier mutant *pin1* and the auxin influx carrier *aux/lax* mutants exhibited strong branching defects. In addition, *pid* AGC kinase mutants were strongly compromised in axillary meristem formation. Furthermore, absence of the focused expression of the meristematic marker *STM* in *pid-9* leaf axils revealed that axillary meristems were not initiated properly. Polar auxin transport inhibitor treatment of *Arabidopsis* plants resulted in branching defects, supporting the conclusion that polar auxin transport is crucial for axillary meristem formation. *In situ* hybridization experiments using probes from the boundary specific gene *LAS*, the meristem specific gene *WUS* and the leaf identity gene *MP* suggested that the branching defects in *pid* mutants are not due to a down-regulation of boundary gene expression or to an alteration in the main meristem.

Secondly, auxin distribution in the shoot apex was investigated. Analysis of PIN1 localization revealed that auxin is depleted from the leaf axil via the auxin efflux carrier, resulting in an auxin minimum, as demonstrated also using the auxin input sensor DII-VENUS and the auxin output sensor DR5. PIN1 polarization was disrupted in *pid* mutants and in NPA treated plants, where the auxin minimum was not established. DR5 signals were found not to be altered in the branching mutants *las* and *rax1*.

Thirdly, specific manipulation of the auxin response by different constructs indicates that auxin signaling in leaf axils during early vegetative development is regulating axillary meristem formation. Constitutive auxin signaling in leaf axils by *MP* under the *LAS* promoter

results in organ fusion. In contrast, block of auxin signaling in leaf axils by a stable AUX/IAA protein *BDL* under the *LAS* promoter leads to premature axillary meristem formation and *pid* branching defects are partially rescued by this construct.

In summary, the present study demonstrates that during early vegetative development, an auxin minimum is formed in the leaf axil of *Arabidopsis* and tomato. Auxin depletion in leaf axils is required for axillary meristem initiation.

Zusammenfassung

Die Architektur höherer Pflanzen wird in hohem Umfang durch die Bildung von Seitentrieben geprägt, welche als so genannte laterale oder axilläre Meristeme in den Achseln von Blättern angelegt werden. Die Etablierung dieser sekundären Wachstumsachsen erfolgt in zwei Schritten: die erste Phase umfasst die Initiation axillärer Meristeme in Blattachseln, während die zweite Phase deren Weiterentwicklung zu Knospen und das Austreiben einschließt. Das Pflanzenhormon Auxin ist seit langem für seine inhibitorische Wirkung auf den Austrieb der Knospen bekannt, ein Phänomen welches als Apikaldominanz bezeichnet wird. In Mais konnte zusätzlich gezeigt werden, dass Auxin auch maßgeblich an der Initiation von Lateralmeristemen beteiligt ist. Über die genaue Wirkung von Auxin auf die Bildung axillärer Meristeme in Eudikotyledonen ist bisher jedoch wenig bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Funktion des Phytohormons Auxin in Bezug auf die Bildung von Lateralmeristemen in zwei eudikotyledonen Modellpflanzen untersucht: *Arabidopsis* und Tomate.

Zu diesem Zweck wurden zunächst „knock-out“-Mutanten, deren Genprodukte normalerweise den polaren Auxin-Transport innerhalb der Pflanze gewährleisten, phänotypisch charakterisiert. Pflanzen, die eine Mutation im Auxin Efflux-Transportergen *PIN1* oder im Influx-Transportergen *AUX/LAX* trugen, zeigten starke Seitentriebdefekte. Ebenso wiesen Pflanzen mit Mutationen im *PID*-Gen, das für eine AGC Kinase kodiert, erhebliche Seitentriebdefekte auf. In Blattachseln von *pid-9* Mutanten fehlt die für die Initiation axillärer Meristeme charakteristische, fokussierte Expressiondomäne des meristematischen Markers *STM*. Weiterhin führt eine Blockierung des Auxin-Transports durch den spezifischen Inhibitor NPA zu Seitentriebdefekten, was die Schlussfolgerung unterstützt, dass der polare Auxin-Transport für die Bildung axillärer Meristeme von essentieller Bedeutung ist. *In-situ* Hybridisierungen mit Sonden gegen die Gene *LAS*, einem „boundary“-Gen, *WUS*, einem Marker für das „organizing center“ des SAM, und *MP*, einem Blattidentitätsgen, deuten an, dass die Verzeigungsdefekte in *pid* Mutanten weder durch eine reduzierte Expression dieser Gene, noch durch eine fehlerhafte Organisation des SAM verursacht werden.

In weiteren Experimenten wurde die Auxin-Verteilung im Sprossapex untersucht. Die polare Lokalisation des Efflux-Transporter *PIN1* lässt vermuten, dass Auxin aus der Region der Blattachsel abtransportiert wird, wodurch in diesem Bereich eine niedrige Auxin-Konzentration gewährleistet wird. Diese Beobachtung konnte durch Verwendung des Auxin Input-Sensors „DII-VENUS“ und des Output-Sensors „DR5“ bestätigt werden. In NPA

behandelten Pflanzen mit blockiertem Auxin-Transport, sowie in *pid* Mutanten, konnte die gerichtete PIN1 Polarisation und das damit verbundene Auxin-Minimum nicht nachgewiesen werden. Untersuchungen mit Hilfe des "DR5" Output-Sensors zeigten, dass die Auxin-Verteilung in den Verzeigungsmutanten *las* und *rax1* im Vergleich zum Wildtyp unverändert ist.

In einem dritten experimentellen Ansatz wurden verschiedene Genkonstrukte benutzt, um die Auxin-Antwort in Achselzellen zu manipulieren. Die phänotypische Analyse der entsprechenden transgenen Pflanzen deutete an, dass die Auxin-Weiterleitung in den Zellen der Blattachsel während der frühen vegetativen Phase notwendig ist für die Bildung axillärer Meristeme. So führt beispielsweise die Expression des Gens *MP* unter Kontrolle des *LAS* Promotors zu einer kontinuierlicher Auxin-Antwort in den Achselzellen und wird phänotypisch durch die Fusion verschiedener Organe sichtbar. Dagegen hat die Blockierung der Auxin-Antwort im Bereich der Blattachsel, durch Expression einer stabilen (dominanten) Form des AUX/IAA Proteins BDL unter Kontrolle des *LAS* Promotors, eine verfrühte Bildung axillärer Meristeme zur Folge. Die Expression dieses Genkonstrukts führt darüber hinaus zu einer teilweisen Komplementation der Verzweigungsdefekte der *pid* Mutante.

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Arbeit die Bildung eines Auxin-Minimums im Bereich der Blattachsel während der frühen vegetativen Entwicklung in den Modellpflanzen *Arabidopsis* und Tomate. Der auswärtsgerichtete Auxin-Transport aus dem Bereich der Blattachsel ist notwendig für die Initiation axillärer Meristeme.