

# Abstract

Axillary meristems (AMs) play a crucial role in the elaboration of the aerial architecture of seed plants. They are initiated in the boundary region between the shoot apical meristem (SAM) and leaf primordia. One of the most important and most specific regulators of this process is *Lateral suppressor (Ls)*, which belongs to the GRAS gene family. The aim of this work was to analyze the process of AM initiation in tomato in detail and to elucidate the function of Ls.

Morphological and histological analyses revealed that AMs are initiated in wild-type (wt) axils of P6 leaf primordia. During late development of P6 leaf primordia, proliferation of meristematic cells in leaf axils was observed by *Histone H4* transcript accumulation (cell division marker), which was completely absent in the loss-of-function mutant *lateral suppressor-1 ls-1*, suggesting a role of Ls in very early steps of AM initiation. Furthermore, RNA *in-situ* hybridization experiments revealed a boundary specific transcription of *Ls* in axils of P1 to P5 leaf primordia. In axils of P6 primordia, *Ls* expression was detected only adaxial of incipient AMs. Surprisingly, *Ls* transcripts were also found to accumulate in distal boundaries of leaflets in P4 to P6 leaf primordia. The formation of leaflets as present in adult tomato leaves is characteristic for compound leaf development. Interestingly, wt tomato leaves can produce ectopic shoots in distal junctions of petiolule and the rachis, triggered by decapitation and intensive pruning of the plants. In contrast, the *ls-1* mutant lacks the ability to produce ectopic shoots on its leaves, whereas transgenic plants expressing a *Ls* enhancer construct (*ls-1\_GSET12*) frequently develop ectopic shoots in the sinus of finger-shaped cotyledons, indicating that Ls is involved in ectopic shoot formation. Combined, these data suggest two putative functions of LS: keeping cells morphogenetically competent to initiate AMs in leaf axils and to form ectopic shoots in boundaries of leaflets at later stages of development.

To identify target genes of Ls, transcript profiles of leaf axils between wt and *ls-1* were compared in an RNA-Seq analysis. In total, 60 differentially expressed genes ( $\geq 2$ -fold change and FDR corrected p-value $<0.05$ ) were identified, and two candidates (*TPSI1* and *AP1 $\mu$ 1*) could be confirmed as targets of Ls. *TPSI1*, which is inducible by phosphate starvation, was found to be 2- to 5-fold upregulated in *ls-1* according to RNA-Seq and

---

qRT-PCR data. Transcripts of *TPSI1* accumulated in axils of *ls-1*, but not in wt, suggesting *Ls* as a repressor of *TPSI1* in leaf axils. In contrast, *AP1 $\mu$ 1* was identified as a gene being activated by *Ls*. Supported by RNA-Seq and qRT-PCR expression data, *AP1 $\mu$ 1* was found to be 5- to 6-fold downregulated in *ls-1*. RNA *in-situ* hybridizations revealed a defined expression of *AP1 $\mu$ 1* in leaf axils at a position where subsequently new AM will form. Known from animal studies, AP1 $\mu$ 1 is a subunit of the adapter protein complex 1, which is required to recruit clathrin for vesicle-mediated transport of cargo molecules. A possible function of AP1 $\mu$ 1 in the formation of AMs is discussed in this work.

The NAC domain transcription factor *Goblet* (*Gob*), the single ortholog of the Arabidopsis *CUP-SHAPED COTYLEDON1* (*CUC1*) and *CUC2* genes, exhibits a boundary specific expression pattern in axils of leaf primordia similar to *Ls*. In order to unravel whether both genes act in the same pathway, and to elucidate the hierarchical order, qRT-PCR expression analysis was performed in *gob-3* loss-of-function mutants, and *Ls* was found to be downregulated. Furthermore, *AP1 $\mu$ 1* was downregulated, whereas *TPSI1* was upregulated in *gob-3* apices, suggesting *Ls* and its targets to be positioned downstream of *Gob*.

# Zusammenfassung

Achselmeristeme spielen eine bedeutende Rolle bei der Entstehung der oberiridischen Sprossarchitektur von Samenpflanzen. Sie werden im Grenzbereich zwischen dem Sprossapikalmeristem und Blattprimordien angelegt. *Lateral suppressor* (*Ls*), aus der Familie der GRAS Gene, ist einer der wichtigsten und spezifischsten Regulatoren in diesem Prozess. Das Ziel dieser Arbeit war es, die Entstehung von Achselmeristemen in Tomate näher zu untersuchen sowie die Funktion von *Ls* aufzuklären.

Morphologische und histologische Untersuchungen ergaben, dass im Wildtyp Achselmeristeme in Blattachsen des Primordiumstadiums P6 angelegt werden. In Blattachsen von bereits sehr weit entwickelten P6 Blattprimordien wurden meristematische Zellen beobachtet, die Transkripte des *Histone H4* Gens (Zellteilungsmarker) akkumulierten, welche in der *ls-1* Mutante fehlten. Dies deutet darauf hin, dass *Ls* bereits in einem sehr frühen Stadium an der Bildung von Achselmeristemen beteiligt ist. Weiterhin wurde in RNA *in-situ* Hybridisierungen gezeigt, dass *Ls* spezifisch in Blattachsen der Stadien P1 bis P5 transkribiert wird. In P6 Blattachsen wurde die Expression von *Ls* nur noch adaxial von gerade entstehenden Achselmeristemen beobachtet. Erstaunlicherweise wurden *Ls* Transkripte ebenfalls in Blattprimordien (P4-P6) gefunden, und zwar in distalen Grenzbereichen von Blattfiedern. Die Bildung von Blattfiedern ist charakteristisch für die Entwicklung gefiederte Blätter, wie sie in adulten Tomatenblättern vorzufinden ist. Entfernt man den Haupttrieb sowie sämtliche Seitentriebe, können Wildtyp-Tomatenblätter interessanterweise ektopische Triebe auf Blättern bilden, und zwar an der distalen Verbindungsstelle von Blattfiederstängeln mit der Blattspindel. Die *ls-1* Mutante besitzt diese Fähigkeit nicht, wohingegen in transgene Pflanzen, in denen die Transkription von *Ls* verstärkt wurde (*ls-1\_GSET12*), häufig die Bildung ektopische Triebe auf fingerförmigen Keimblättern beobachtet wurde. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass eine Funktion von *Ls* sein könnte, Zellen in einem morphogenetisch kompetenten Zustand zu halten, um Achselmeristeme in Blattachsen anzulegen, sowie zu einem späteren Entwicklungszeitpunkt ektopische Triebe in Grenzbereichen von Fiederblättern zu bilden.

Um Zielgene von *Ls* zu identifizieren, wurden in einer RNA-Seq Analyse die Transkriptomprofile der Blattachsen zwischen Wildtyp und *ls-1* miteinander verglichen. Es wurden

---

insgesamt 60 Gene ermittelt, die unterschiedlich exprimiert waren ( $\geq 2$ -facher Unterschied und  $p < 0.05$  (FDR korrigiert)), und zwei Kandidaten (*TPSI1* und *AP1 $\mu$ 1*) konnten als Zielgene von *Ls* bestätigt werden. Anhand von RNA-Seq and real-time PCR Analysen konnte eine 2- bis 5-fache Hochregulierung von *TPSI1* in *ls-1* ermittelt werden, einem Gen, welches unter Phosphatmange induziert wird. RNA *in-situ* Hybridisierungen zeigten, dass sich *TPSI1* Transkripte in Blattachsen von *ls-1* anhäufen, jedoch nicht im Wildtyp. Dies deutet an, dass *Ls* die Transkription von *TPSI1* in Blattachsen unterdrückt. Im Gegensatz dazu steht *AP1 $\mu$ 1*, welches von *Ls* aktiviert wird. Die Expression von *AP1 $\mu$ 1* war 5-7fach niedriger in *ls-1* als im Wildtyp, was in RNA-Seq und real-time PCR Experimenten gezeigt wurde. RNA *in-situ* Hybridisierungen zeigten, dass *AP1 $\mu$ 1* spezifisch in Blattachsen exprimiert ist, an Positionen, an denen sich später Achselmeristeme bilden. *AP1 $\mu$ 1* ist eine Untereinheit des Adapterproteinkomplexes 1 und wird für den vesikulären Transport benötigt, um Clathrin mit Cargomolekülen zu verbinden, eine Funktion, die aus Studien an Tieren bekannt ist. Eine mögliche Funktion von *AP1 $\mu$ 1* in der Bildung von Achselmeristemen wird in dieser Arbeit diskutiert.

Der Tomaten Transkriptionsfaktor *Goblet* (*Gob*), das einzige orthologe Gen zu *CUP-SHAPED COTYLEDON1* (*CUC1*) und *CUC2* in Arabidopsis, zeigt eine sehr ähnliches grenzschichtenspezifisches Expressionsmuster in Achseln von Blattprimordien wie das *Ls* Gen. Um herauszufinden, ob *Gob* und *Ls* im gleichen Signalweg agieren und in welcher Hierarchie, wurden Expressionsanalysen in der *gob-3* Mutante mittels qRT-PCR durchgeführt. Dabei wurde eine geringere Expression von *Ls* in *gob-3* ermittelt. Im Vergleich zum Wildtyp wurde zusätzlich eine verringerte Expression von *AP1 $\mu$ 1* sowie eine Erhöhung der Expression von *TPSI1* in *gob-3* beobachtet. Diese Ergebnisse deuten an, dass *Ls* sowie dessen Zielgene von *Gob* reguliert werden.