

Abstract

A central goal of developmental biology is to understand the genetic mechanisms underlying the formation of diverse biological forms. Plant leaves provide an excellent model system to address this question, as they exhibit remarkable morphological diversity despite initiating from nearly identical finger-like primordia. Leaf morphology can be broadly classified as simple, with an entire lamina, or complex, in which the lamina is dissected into distinct leaflets. The *Arabidopsis thaliana* relative *Cardamine hirsuta* has emerged as a powerful model for studying the genetic regulation of compound leaf development. The *REDUCED COMPLEXITY* (*RCO*) gene is a key regulator of leaflet formation in *C. hirsuta*. *RCO* is expressed at the base of developing leaflets, where it locally represses cell growth and proliferation to facilitate leaflet separation. *RCO* was lost in *A. thaliana*, contributing to leaf simplification, and its reintroduction as a transgene in *A. thaliana* was efficient in increasing leaf complexity. Thus, elucidating the mechanisms that control the expression pattern of *RCO* is critical for understanding the evolution and development of compound leaves. A *cis*-regulatory element, the *RCO* enhancer, was previously shown to specify the *RCO* expression. However, the transcription factors that act through this enhancer remained unknown. NGATHA (NGA) transcription factors are promising candidates because two NGA binding sites (NBSs) were identified within the *RCO* enhancer. Then we found that *nga1;2;3* triple mutants exhibited increased leaflet number and pronounced leaflet lobing, indicating that NGAs act to limit leaf complexity. This ectopic leaflet and lobe formation was associated with ectopic *RCO* expression in distal leaflet margins. Importantly, this misexpression of *RCO* was both necessary and sufficient to drive the increased complexity: loss of *RCO* suppressed the *nga1;2;3* phenotype, while ectopic *RCO* expression in distal leaflet margins was sufficient to induce lobed leaflets. In vitro assays demonstrated that NGA proteins directly bind to the *RCO* enhancer, and mutation of the two NBSs within the *RCO* enhancer resulted in ectopic *RCO* enhancer activity in distal leaflet margins and the formation of lobed leaflets. Taken together, our findings establish that in *C. hirsuta*, NGA transcription factors limit leaflet complexity and directly *repress* *RCO* expression in developing leaves.

Zusammenfassung

Ein zentrales Ziel der Entwicklungsbiologie ist es, die genetischen Mechanismen zu verstehen, die der Bildung vielfältiger biologischer Formen zugrunde liegen. Pflanzenblätter stellen hierfür ein hervorragendes Modellsystem dar, da sie trotz nahezu identischer, fingerförmiger Primordien eine bemerkenswerte morphologische Vielfalt aufweisen. Die Blattmorphologie lässt sich grob in einfach, mit einer durchgehenden Blattspreite, oder komplex, bei der die Blattspreite in einzelne Fiederblättchen unterteilt ist, einteilen. Der *Arabidopsis thaliana*-Verwandte *Cardamine hirsuta* hat sich als leistungsfähiges Modell zur Untersuchung der genetischen Regulation der zusammengesetzten Blattform etabliert. Das REDUCED COMPLEXITY (RCO)-Gen ist ein zentraler Regulator der Fiederblättchenbildung in *C. hirsuta*. RCO wird an der Basis sich entwickelnder Fiederblättchen exprimiert, wo es lokal Zellwachstum und -proliferation hemmt, um die Trennung der Fiederblättchen zu ermöglichen. RCO ging in *A. thaliana* verloren, was zur Vereinfachung der Blätter beitrug; seine Wiedereinführung als Transgen in *A. thaliana* erhöhte dagegen effizient die Blattkomplexität. Das Verständnis der Mechanismen, die das Expressionsmuster von RCO steuern, ist daher entscheidend für das Verständnis der Morphogenese zusammengesetzter Blätter. Ein cis-regulatorisches Element, der RCO-Enhancer, wurde bereits als steuernd für die RCO-Expression identifiziert. Die Transkriptionsfaktoren, die über diesen Enhancer wirken, waren jedoch unbekannt. NGATHA (NGA)-Transkriptionsfaktoren sind vielversprechende Kandidaten, da innerhalb des RCO-Enhancers zwei NGA-Bindungsstellen (NBSs) identifiziert wurden. Wir fanden anschließend, dass *nga1;2;3*-Triple-Mutanten eine erhöhte Anzahl an Fiederblättchen und eine ausgeprägte Lappung der Fiederblättchen zeigten, was darauf hindeutet, dass NGAs normalerweise dazu beitragen, die Blattkomplexität zu begrenzen. Diese ektopische Bildung von Fiederblättchen und Lappen war mit ektoper RCO-Expression in distalen Blattrandbereichen verbunden. Wichtig ist, dass diese Fehlregulation von RCO sowohl notwendig als auch hinreichend war, um die erhöhte Komplexität hervorzurufen: Ein Verlust von RCO unterdrückte den *nga1;2;3*-Phänotyp, während eine ektopische RCO-Expression in distalen Blatträndern ausreichte, um gelappte Fiederblättchen zu induzieren. In vitro-Analysen zeigten, dass NGA-Proteine direkt an den RCO-Enhancer binden, und Mutationen in den beiden NBSs innerhalb des RCO-Enhancers führten zu aktiver RCO-Enhancer-Aktivität in distalen

Blatträndern sowie zur Bildung gelappter Fiederblättchen. Zusammenfassend zeigen unsere Ergebnisse, dass in *C. hirsuta* NGA-Transkriptionsfaktoren die Fiederblättchen-Komplexität begrenzen und direkt die RCO-Expression in sich entwickelnden Blättern reprimieren.