

Abstract

Leaves of seed plants provide an attractive system to study the development and evolution of form. Leaf shape development is regulated by complex gene networks comprising multiple regulators. Among those regulators, REDUCED COMPLEXITY (RCO) plays an important role in controlling leaf complexity in the Brassicaceae. *RCO* is necessary for leaflet formation in the compound leaved species *Cardamine hirsuta*. Conversely, the re-introduction of *RCO* into the genome of simple leaved *Arabidopsis thaliana* is sufficient to increase leaf complexity and produce deeply lobed leaves. Although it was recently reported that elevated cytokinin (CK) action can partly mediate *RCO* function, the genetic mechanisms through which *RCO* acts are not fully clear. In my PhD study, I aimed to understand the molecular basis for *RCO* function in leaf shape development.

In my study I employed a second-site EMS mutagenesis screen, of the lobed leaved *RCOg-VENUS* transgenic plant in *A. thaliana*, to isolate enhancers (lobe to leaflet) and suppressors (reduced lobing) of the *RCOg-VENUS* phenotype. I obtained *er*, *yda*, *spy*, *cyp71*, *cuc2*, *pin1* and ribosome related genes mutants as the suppressors reducing lobe formation in *A. thaliana RCOg-VENUS* plants. *cher*, *chyda* can partly repress petiolule formation and *chcyp71* simplifies the leaves in *C. hirsuta*, indicating a contribution of those genes to leaflet development in the native *C. hirsuta* context. Conversely, I demonstrated *as1* and *as2* mutants can enhance the lobes in *RCOg-V* into dissected leaflets. This transition is mediated by misexpressed *BP*, *KNAT2* and *KNAT6* in *as1/2;RCOg-V* leaf/leaflet basal domain, correlated with expanded *RCO* expression around leaflet base. In addition, I employed multiple next generation sequencing (NGS) methodologies and combined their results to understand *RCO* function. Specifically, RNA-seq was employed to analyze the transcriptome reprogramming by *RCO*. Chromatin immunoprecipitation sequencing (ChIP-seq) and DNA affinity purification sequencing (DAP-seq) were performed to reveal the *RCO* binding behavior in the genome. The reported *RCO* autoregulation and regulation of CK action were confirmed in my study. I also demonstrate that *RCO* is mainly an activator for transcription, and that its binding may be influenced by potential co-factor interaction and/or the chromatin context *in vivo*. Together, my study expanded the understanding of the genetic basis of *RCO* action in leaf shape development.

Zusammenfassung

Die Blätter von Samenpflanzen stellen ein attraktives System zur Untersuchung der Entwicklung und Evolution der Form dar. Die Blattformentwicklung wird durch komplexe Gen-Netzwerke mit mehreren Regulatoren gesteuert. Unter diesen Regulatoren spielt REDUCED COMPLEXITY (RCO) eine wichtige Rolle bei der Kontrollierung der Blattkomplexität in den Brassicaceae. *RCO* ist für die Bildung der komplexen Fiederblätter bei *Cardamine hirsuta* notwendig. Umgekehrt ist die Einführung von *RCO* bei *Arabidopsis thaliana*, welche einfache Blätter besitzt, ausreichend, um die Blattkomplexität zu erhöhen und tief gelappte Blätter zu produzieren. Obwohl vor kurzem berichtet wurde, dass eine erhöhte Cytokinin-Wirkung teilweise die *RCO*-Funktion beeinflussen kann, sind die genetischen Mechanismen, durch welche *RCO* wirkt, nicht vollständig klar. In meiner Doktorarbeit war ich bestrebt, die molekularen Grundlagen der *RCO*-Funktion bei der Entwicklung der Blattform zu verstehen.

In meiner Studie führte ich ein EMS-Mutagenese-Screening in der transgenen Pflanze *RCOg-VENUS* in *A. thaliana* durch, um Verstärker (Lappen bis Fiederblättchen) und Suppressoren (verringerte Lappen) des *RCOg-VENUS*-Phänotyps zu isolieren. Ich fand *er-*, *yda-*, *spy-*, *cyp71-*, *cuc2-*, *pin1-* und Ribosomenverwandte Genmutanten als Suppressoren, die die Lappenbildung in *A. thaliana RCOg-VENUS*-Pflanzen reduzieren. *Cher*, *chyda* kann die Fiederblättchenstielbildung teilweise unterdrücken und *hcyp71* vereinfacht die Blätter bei *C. hirsuta*, was auf einen Beitrag dieser Gene zur Fiederblättchenbildung im nativen *C. hirsuta*-Kontext hinweist. Umgekehrt habe ich gezeigt, dass *as1-* und *as2-* Mutanten die Lappen in *RCOg-V* so verstärken können, dass Fiederblättchen entstehen. Dieser Übergang wird durch die falsche Expression der Gene *BP*, *KNAT2* und *KNAT6* in der *as1/2;RCOg-V* Blatt/Fiederblättchen Basaldomäne vermittelt und korreliert mit einer erweiterten *RCO*-Expression um die Fiederblättchenbasis herum. Darüber hinaus setzte ich mehrere Next Generation Sequencing (NGS)-Methoden ein und kombinierte deren Ergebnisse, um die Funktion *RCOs* zu verstehen. Insbesondere wurde RNA-seq zur Analyse der Transkriptom-Reprogrammierung durch *RCO* angewandt. Die Sequenzierung der Chromatin-Immünpräzipitation (ChIP-seq) und die Sequenzierung der DNA-Affinitätsreinigung (DAP-seq) wurden durchgeführt, um das *RCO*-Bindungsverhalten im Genom aufzudecken. Die berichtete Autoregulation *RCOs* und die Regulierung der Cytokinin-Wirkung wurde in meiner Studie bestätigt. Ich zeige auch, dass *RCO* hauptsächlich ein Aktivator für die Transkription ist und dass seine Bindung durch eine potenzielle Kofaktorinteraktion und/oder den Chromatinkontext *in vivo* beeinflusst werden kann. Zusammengefasst erweitert meine Studie das Verständnis der genetischen Basis der *RCO*-Wirkung bei der Entwicklung der Blattgestalt.