

ABSTRACT

In nature, we find a vast variety of differently shaped plants. This morphological diversity is particularly striking when we observe the leaf shapes of different seed plant species. Even closely related species develop very diverse leaf shapes, they are an excellent model to understand how different organ morphologies are generated. TCP (TEOSINTE BRANCHED, CYCLOIDEA, and PCF1/2) transcription factors were demonstrated to have crucial effects on several developmental aspects in many plant species. The phenotypic effects caused by changes in TCP levels, especially on leaf development, have been studied in some detail. Many TCP dependent developmental processes are related to suppression of cell proliferation and promote cell differentiation in growing leaves. However, the cellular and molecular mechanisms underlying TCP function are only beginning to be understood. In this study, we investigated the role of TCP4 in complex leaf development of *Cardamine hirsuta*. We first showed that absence of TCP4 causes prolonged cell proliferation with an increase in leaf complexity while hyper-activation of TCP4 reduces leaf complexity. Furthermore, we identified the expression domains of *TCP4* and its repressor *MIR319C* during development and showed that they are expressed in a complementary fashion. Additionally, we demonstrated that the increased margin complexity in *tcp4* mutants is accompanied and likely caused by the initiation of ectopic auxin maxima which we show depend on *CUC2* (*CUP-SHAPED COTYLEDON2*). The *CUC2* transcription factor promotes leaf complexity via organizing marginal auxin maxima and outgrowth of protrusions which develop into serration and leaflets. Additionally, we describe the miR164A dependent regulation of complex leaf morphology which also depends on negative regulation of *CUC2*. We demonstrate that miR164A negatively regulates leaf complexity earlier than TCP4 during development. We suggest that miR164A and TCP4 regulate leaf complexity in different pathways that both converge on negative regulation of *CUC2*. Finally, transcriptome analysis indicated, that TCP4 also regulates other genes which are directly involved in developmental processes like *LMI1* (*LATEMERISTEMIDENTITY1*), *KNAT3* (*KNOTTED1-LIKE HOMEODOMAIN GENE3*) or *NGAs* (*NGATHAs*). In summary, our results suggest that different aspects of leaf development could be regulated by TCP4 via modulation of target gene expression with different spatial and temporal activity thus determining the global timing of leaf morphogenesis.

ZUSAMMENFASSUNG

In der Natur finden wir eine große Vielfalt unterschiedlich geformter Pflanzen. Besonders auffällig ist diese morphologische Vielfalt, wenn wir die Blattformen verschiedener Samenpflanzenarten betrachten. Auch wenn eng verwandte Arten sehr unterschiedliche Blattformen entwickeln, sind sie ein hervorragendes Modell, um zu verstehen, wie unterschiedliche Organmorphologien entstehen. Es wurde gezeigt, dass TCP (TEOSINTE BRANCHED, CYCLOIDEA und PCF1/2) Transkriptionsfaktoren entscheidende Auswirkungen auf mehrere Entwicklungsaspekte vieler Pflanzenarten haben. Die phänotypischen Auswirkungen, die durch Änderungen der TCP Level, insbesondere auf die Blattentwicklung verursacht werden, wurden ausführlich untersucht. Viele TCP-abhängige Entwicklungsprozesse hängen mit der Unterdrückung der Zellproliferation zusammen und fördern die Zelldifferenzierung in wachsenden Blättern. Die zellulären und molekularen Mechanismen, die der TCP-Funktion zugrunde liegen, werden jedoch erst langsam verstanden. In dieser Studie untersuchten wir die Rolle von TCP4 bei der Entwicklung von komplexen Blättern von *Cardamine hirsuta*. Wir haben zunächst gezeigt, dass das Fehlen von TCP4 zu einer verlängerten Zellproliferation mit einer Zunahme der Blattkomplexität führt, während eine Hyperaktivierung von TCP4 die Blattkomplexität verringert. Darüber hinaus haben wir während der Entwicklung die Expressionsdomänen von TCP4 und seinem Repressor MIR319C identifiziert und gezeigt, dass sie komplementär exprimiert werden. Des Weiteren haben wir gezeigt, dass die erhöhte Komplexität von Blatträndern in *tcp4* Mutanten mit der Initiierung ektopischer Auxin Maxima einhergeht und wahrscheinlich durch diese verursacht wird, die, wie wir zeigen, von CUC2 (CUP-SHAPED COTYLEDON2) abhängen. Der Transkriptionsfaktor CUC2 fördert die Blattkomplexität durch die Organisation von Auxin Maxima in Blatträndern und das Herauswachsen von Ausbuchtungen, die sich zu Zacken und Seitenblättchen entwickeln. Darüber hinaus beschreiben wir die miR164A-abhängige Regulation der Morphologie komplexer Blätter, die auch von der negativen Regulation von CUC2 abhängt. Wir zeigen, dass während der Entwicklung miR164A die Blattkomplexität früher als TCP4 negativ reguliert. Wir schlagen vor, dass miR164A und TCP4 die Blattkomplexität auf verschiedenen Wegen regulieren, die beide mit der negativen Regulierung von CUC2 zusammenlaufen. Schließlich zeigte eine Transkriptom Analyse, dass TCP4 auch andere Gene reguliert die direkt an Entwicklungsprozessen beteiligt sind, wie *LMI1* (*LATEMERISTEMIDENTITY1*), *KNAT3* (*KNOTTED1-LIKE HOMEODOMAIN GENE3*) oder *NGAs* (*NGATHAs*). Zusammenfassend legen unsere Ergebnisse nahe, dass verschiedene Aspekte der Blattentwicklung durch TCP4 über die Modulation der Zielgenexpression mit einer unterschiedlichen räumlichen und zeitlichen Aktivität reguliert werden könnten, wodurch der globale Zeitpunkt der Blattmorphogenese bestimmt wird.