

**Deciphering genetic control of lateral
leaf growth via *WOX* genes in the
complex leaves of *Cardamine hirsuta***

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von

Lisa Brombach (geb. Clark)

aus Alamogordo, New Mexico, USA

Köln, November 2024

Gutachter*innen: Prof. Dr. Miltos Tsiantis
Prof. Dr. Ute Höcker

Prüfungsvorsitzender: Prof. Dr. Siegfried Roth

Schriftführerin: Dr. Ismene Karakasilioti

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Februar 2025

Die vorliegende Arbeit wurde am
Max-Planck-Institut für Pflanzenzüchtungsforschung in Köln,
in der Abteilung für Vergleichende Entwicklungsgenetik,
in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Miltos Tsiantis angefertigt.



MAX-PLANCK-INSTITUT
FÜR PFLANZENZÜCHTUNGSFORSCHUNG

Abstract

A key goal in biological research is understanding how development is genetically regulated. Plants are valuable model organisms in developmental biology, and studies in leaves provide detailed insights into the genetic basis of morphology. The plant-specific *WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN* (*WOX*) genes encode Homeodomain transcription factors, which are crucial for several developmental processes, including leaf growth in the medial-lateral axis, *i.e.* in width. Their mode of action is likely the modulation of hormone levels and stimulation of cell proliferation. To date, their cellular functions in species with complex leaves remain largely unclear. For this reason, in this study, I characterize the role of *ChWOX* genes in development of the complex leaves of *Cardamine hirsuta* (*C. hirsuta*). I show CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of the paralogs *ChWOX1* and *ChWOX3* results in an almost full loss of lateral leaf growth and leaflet formation. Extensive microscopy and mutant phenotyping experiments reveal *ChWOX1* and *ChWOX3* are crucial for early growth promotion in leaf primordia. This is mediated via increased proliferation, eventually resulting in lateral growth forming the leaf blade. In addition, the use of genetic mosaics reveals the cellular function of *ChWOX1* varies depending on the leaf tissue: In the leaf margin and in regions where leaflets are formed in wild type, *ChWOX1* expression promotes proliferation and leaflet-like outgrowths, yet expression closer to the proximal or distal end of the leaf blade, or outside of the leaf margin, is not sufficient to induce proliferation. Finally, I present evidence suggesting functional conservation of *WOX* genes is high between the closely related Brassicaceae species *C. hirsuta* and *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*), although differences likely exist in downstream effectors. Taken together, this study underlines the crucial role of *ChWOX* genes in promoting early proliferation, which will eventually form the leaf blade and allow development of diverse leaf shapes in different plant species.

Zusammenfassung

Ein bedeutendes Ziel der Biologie ist es zu verstehen, wie Entwicklung genetisch gesteuert wird. Pflanzen, insbesondere ihre Blätter, dienen als Modellorganismen, um die genetischen Grundlagen der Morphologie zu verstehen. Die pflanzenspezifischen *WUSCHEL-RELATED HOMEODOMÄNE (WOX)*-Gene kodieren Homöodomäne-Transkriptionsfaktoren, die entscheidend sind für Pflanzenwachstum und das Breitenwachstum der Blätter. Sie wirken vermutlich durch die Modulation verschiedener Hormonspiegel und durch die Förderung der Zellteilung. Bislang sind die zellulären Funktionen der *WOX*-Gene in Pflanzenarten mit komplexen Blättern noch weitgehend ungeklärt. Aus diesem Grund charakterisiere ich hier die Rolle der *ChWOX*-Gene in den komplexen Blättern von *Cardamine hirsuta* (*C. hirsuta*). Die CRISPR/Cas9-Mutagenese der Paraloge *ChWOX1* und *ChWOX3* führt zu einem fast vollständigen Verlust der Blättchenbildung und des Breitenwachstums. Mikroskopie und Phänotypisierung von Mutanten zeigen, dass *ChWOX1* und *ChWOX3* entscheidend für frühes Wachstum von Primordien sind. Dies geschieht über Zellteilung, die zur Bildung der Blattfläche führt. Darüber hinaus zeigt die Verwendung von genetischen Mosaiken, dass die zelluläre Funktion von *ChWOX1* je nach Blattgewebe variiert: Am Blattrand und in der Region, in der Blättchen im Wildtyp gebildet werden, ermöglicht die Expression von *ChWOX1* erhöhte Zellteilung und blättchen-ähnliche Auswüchse, doch die Expression näher am proximalen oder distalen Ende der Blattspreite oder außerhalb des Blattrandes reicht nicht aus, um Zellteilung zu induzieren. Schließlich präsentiere ich Beweise dafür, dass die Funktionen von *WOX*-Genen zwischen den nahe verwandten Brassicaceae-Arten *C. hirsuta* und *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) hochkonserviert sind, obwohl höchstwahrscheinlich Unterschiede bei den Ziel-Effektoren bestehen. Insgesamt unterstreicht diese Studie die entscheidende Rolle der *ChWOX*-Gene bei der Förderung der frühen Zellteilung, die schließlich zur Bildung der Blattfläche führt und die Diversifizierung der Blattform zwischen verschiedenen Pflanzenarten ermöglicht.