

ゼニゴケの脅威の繁殖力を支える分子基盤

酒井 友希, 石崎 公庸

神戸大学大学院理学研究科
〒657-8501 兵庫県神戸市六甲台町 1-1

Molecular bases for the vegetative reproduction in a bryophyte *Marchantia polymorpha*

Yuuki Sakai and Kimitsune Ishizaki

Graduate School of Science, Kobe University
1-1 Rokkodai-cho, Kobe, Hyogo, 657-8501, Japan

Keywords: clonal plant, Bryophyte, *Marchantia polymorpha*, vegetative reproduction, regeneration,

DOI: 10.24480/bsj-review.14b4.00245

1. はじめに

コケ植物苔類ゼニゴケ (*Marchantia polymorpha*) の繁殖力は強く、庭園で繁茂して園芸家に嫌われるほどである。ゼニゴケがこのような旺盛に繁殖できるのは栄養繁殖性植物であるところが大きい。ゼニゴケの植物体は扁平な葉状体でその上に杯状体とよばれる器官を持つ。杯状体の中ではクローン個体である無性芽が大量につくられ、これが雨などによって周囲に散布されると遺伝的に同一の個体が大量に増殖する。さらに、ゼニゴケは再生能力も高く、特別な処理をしなくても葉状体の小さな断片から個体全体が再生される。こうした植物体断片からの再生も栄養繁殖の一形態である。近年、栄養繁殖器官である杯状体の形成を制御している因子が複数明らかにされた。興味深いことに、杯状体形成過程と葉状体の再生の過程とで共通した因子が機能していることも明らかになりつつある。本稿では、こうしたゼニゴケの栄養繁殖とそのメカニズムについて概説する。

2. ゼニゴケ *Marchantia polymorpha*

2-1. 実験生物としてのゼニゴケ

ゼニゴケは北半球を中心として世界中に広く分布し、日本でもごく一般的に植え込みや庭のすみで見つけることができる (図1)。また、中学校の理科の教科書に苔類の例として取り上げられるなど、身近な植物の一つである。ゼニゴケは古くより植物の研究対象として形態学的、解剖学的な観察がなされてきた。19世紀初頭には、非常に緻密なスケッチとともに生活環を通じた形態の変化や



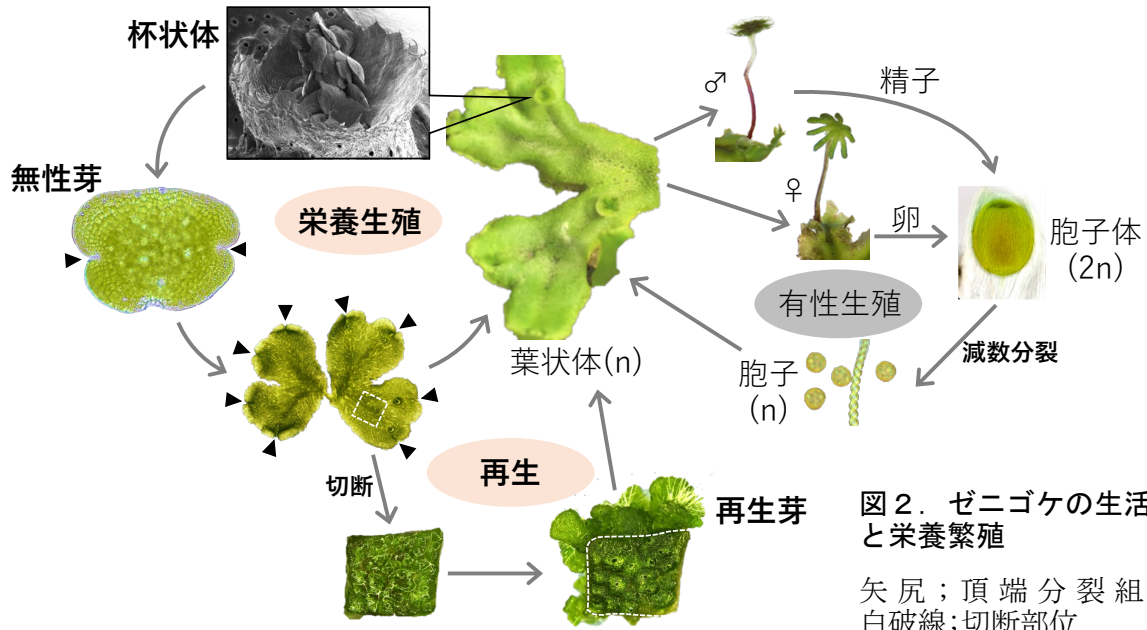
図1. 街中でみられるゼニゴケの群落
民家前の植え込みにできたメス株の群落。
著者撮影, 大阪府。

植物体を構成する各器官について記載されている (Kny 1890)。1986年にはタバコとともに葉緑体の全ゲノム配列が解読されたことでも有名である (Ohyama et al. 1986; Shinozaki et al. 1986)。近年、アグロバクテリウムを利用した形質転換法が確立され、相同組み替えによる遺伝子ターゲティング・CRISPR/Cas9法によるゲノム編集・マイクロRNAを用いた遺伝子発現抑制などのアプローチが可能となった (Ishizaki et al. 2008; 2013; Sugano et al. 2018; Flores-Sandoval et al. 2016)。形質転換体の選抜に必須の薬剤耐性マーカーを複数利用可能な種々のバイナリーベクターも整備されている (Ishizaki et al. 2015)。古典的な固定-樹脂包埋による切片作成法、免疫染色などの手法に加え、*in situ* ハイブリダイゼーションや組織透明化法も適用できることが報告され、様々なアプローチによる研究が可能である (Brown and Lemmon 2004; Higo et al. 2016; Sakamoto et al. 2022)。ゼニゴケの核は8本の常染色体と雄雌いずれかの性染色体(UまたはV染色体)を持ち、ゲノムサイズは約218Mbである (Bowman et al. 2017; Linde et al. 2020; Iwasaki et al. 2021)。2017年、日本産の標準系統雄株 (Takaragaik-1) の全配列情報が決定され、他の陸上植物系統にも共通した遺伝子が保存されていること、またゲノムレベルでの重複が起こっておらず遺伝子の冗長性が比較的低いことが明らかになった (Bowman et al. 2017)。標準系統雌株 (Takaragaik-2) やスウェーデン産、ブルガリア産のアクセッション株の配列も加えられ、最新のゲノム情報を以下のサイトから利用できる (<https://marchantia.info>) (Montgomery et al. 2020; Linde et al. 2020)。さらにトランスクリプトームデータベースも開設されてインフォマティクス環境も整ってきた (Kawamura et al. 2022)。

ゼニゴケは陸上植物進化の最も基部で分岐したコケ植物 (苔類) に属している。コケ植物は単系統群であり他の陸上植物系統全体の姉妹群にあたる。従って、コケ植物において被子植物と共通した分子メカニズムが明らかになれば、それは陸上植物の共通祖先において既に獲得されていた分子メカニズムであると考えることができる。こうした進化学的観点からも、ゼニゴケはコケ植物苔類のモデル植物として国内外を問わず多くの研究に利用されている。

2-2. ゼニゴケの生活環

ゼニゴケは核相 n の配偶体世代優勢の生活環をもつ (図2)。雌雄異株で、条件が整うと雌雄それぞれの株で生殖器官が形成され有性生殖を行う。精子と卵が受精すると、胞子体 ($2n$) が形成され、胞子体の成熟に伴いその内部で減数分裂により数十万個の胞子が作られる。胞子は風に乗って散布され、発芽して葉状体へと成長する。しかし、野外の群落を見ると雄株だけ、雌株だけ、ということが多い (図1)。これはゼニゴケが栄養繁殖によりクローナルに増殖するからである。ゼニゴケの植物体は扁平な葉状体で、頂端に分裂組織を有し、二分岐を繰り返して成長する (図2)。葉状体の背側の表面は気室と呼ばれる同化器官に覆われているが、中肋にそって杯状体とよばれる栄養繁殖器官が形成される。杯状体はカップ状の形をしており、杯状体内側底部の表皮細胞から1細胞に由来してクローン個体である無性芽が形成される (図2)。無性芽は成熟すると杯状体の底部から切り離されて休眠し、動物に付着したり雨粒が当たったりすることによって杯状体外部に散布されると発芽する。無性芽は2ヶ所



に頂端分裂組織を持っており、発芽後に頂端分裂組織から供給される細胞は様々な組織へと分化し、器官形成が起こって、ゼニゴケ植物体の本体である葉状体へと成長する。

他の生物によって踏みつけられたり、乾燥や凍結で一部が枯死したりして、葉状体が切断されることがある。すると、特別な処理をしなくても、頂端分裂組織のない葉状体断片から再生芽が形成され、完全な植物体が再生される (図2)。このような断片からの再生システムもまた **Fragmentation** と呼ばれる栄養繁殖様式の一つである。

このようにゼニゴケは一世代の間に、個体が成長するだけでなく、栄養繁殖によって非常に効率よく自身のクローン個体を増やし、群落をつくるのである。近年の分子遺伝学的な解析から、ゼニゴケの栄養繁殖を支える分子基盤の一端が明らかになってきた。

3. 無性芽を介した栄養繁殖

3-1. 無性芽の発生と杯状体の形成

ゼニゴケの無性芽の発生は、杯状体内側底部の一部の表皮細胞が無性芽始原細胞として分化することで始まる (図3A; Hiwatashi et al. 2019; Kato et al. 2020)。無性芽始原細胞から2回の非対称分裂により頂端側と基部側の細胞が生じる。頂端側の細胞はさらに分裂を繰り返す、円盤状の無性芽を形成する。一方、基部側の細胞はそのまま分化して柄細胞となり、無性芽が成熟すると細胞死して杯状体底部から無性芽を切り離す。杯状体の底部細胞群は分裂活性と分化能を維持しており、無性芽という形で新たな頂端分裂組織を生み出す能力を持つ特徴的な幹細胞プールであるといえる。底部細胞のどの細胞が無性芽始原細胞になるのかについては不明であるが、杯状体が大きくなるに従って無性芽形成がおこる領域は杯状体底部の周縁部分に限られてくることから、杯状体底部細胞から無性芽始原細胞へのアイデンティティの転換を制御する何らかのメカニズムがあると考えられる。

では、このような特徴的な杯状体という器官はどのようにして形成されるのだろうか。葉状体の背側表面は気室と呼ばれる同化器官に覆われている (Shimamura 2016)。頂端細胞の近傍の背側表皮細胞が平層分裂して二層になることで気室形成が開始されると考えられている

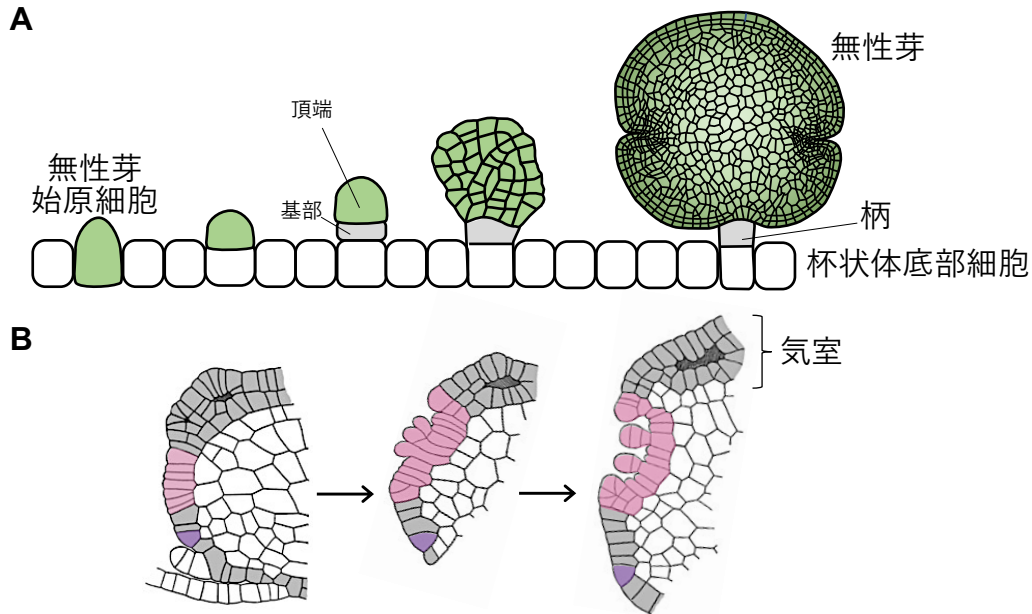


図3. 無性芽の発生と杯状体の形成

A. 杯状体底部における無性芽の発生。緑;無性芽の細胞系譜。B. 杯状体形成過程。Barnes and Land 1908 より改変。ピンク;杯状体底部細胞, 紫;頂端細胞, グレー;表皮細胞。

(Ishizaki 2015)。同じく頂端細胞の背側の表皮細胞(群)が杯状体底部としてのアイデンティティを持つと、気室形成につながる平層分裂が抑制され、垂層分裂が促進されて杯状体形成が始まると考えられている(図3B, Barnes and Land 1908; Suzuki et al. 2020)。その後、杯状体底部領域が拡大するとともに、周囲の背側組織が立ち上がって縁を形成し、カップ状の杯状体が形作られるとされる(Barnes and Land 1908)。杯状体の形成は中肋上でのみ起こる。また、葉状体の分岐から次の分岐までの間に形成される杯状体は一個以下であることが殆どで、杯状体は近接することなく適切な間隔を持って形成される。

3-2. 杯状体形成を司る因子とその機能

杯状体形成の分子メカニズムを明らかにするため網羅的なトランスクリプトーム解析が行われ、杯状体で高発現している遺伝子が明らかにされた(Yasui et al. 2019)。それらの遺伝子には10個の転写因子が含まれていたが、その中でもGEMMA-CUP ASSOCIATED MYB 1 (GCAM1)と名付けられたR2R3-MYB型転写因子が杯状体形成に必須であることが明らかになってきた。GCAM1は頂端分裂組織から中肋にかけて、また杯状体の底部細胞と発生中の無性芽で発現する(Yasui et al. 2019)。相同組み替え法によりT-DNAを挿入してGCAM1遺伝子を破壊すると、杯状体が全く形成されなくなる。一方、GCAM1遺伝子を異所的に過剰発現すると、葉状体の成長が著しく抑制され、未分化な細胞塊が形成された。これらの結果から、GCAM1は杯状体形成に必須の転写因子であり、杯状体底部の細胞を未分化な状態に保つ働きがあると考えられる(Yasui et al. 2019)。GCAM1は、被子植物における側芽形成制御因子であるシロイヌナズナのREGULATOR OF AXILLARY MERISTEMS (AtRAXs)やトマトのSIBlindと同じR2R3-MYB型転写因子サブファミリーに属する。GCAM1遺伝子を導入すると

シロイヌナズナの *RAXI-3* 三重変異体の表現型が相補されたことから、ゼニゴケの *GCAM1* とシロイヌナズナの *RAXs* の間で分子機能が保存されていると考えられる (Yasui et al. 2019)。

また、植物特異的な RWP-RK 転写因子 *MpRKD* は杯状体の縁で発現しており、*MpRKD* 機能欠損変異体では杯状体の縁の立ち上がりがみられない (Koi et al. 2016)。*MpRKD* 機能欠損変異体では無性芽の形成は正常に起こるので、*MpRKD* は杯状体形成過程の後半に見られる縁の形成に関与していると考えられる。*MpRKD* はシロイヌナズナにおいて胚形成のパターンニングに重要な *AtRKD* のオーソログであり、ゼニゴケにおいては卵細胞の分化制御に主に機能している。被子植物において有性生殖器官の発生を制御する転写因子が、コケ植物では有性生殖器官だけでなく栄養繁殖器官の形成をも制御している点は興味深い。

このように、20 世紀初頭の形態学的な観察から予測されていた杯状体形成過程のモデル (図 3B) は、分子遺伝学的にも裏打ちされつつある。まず、頂端細胞の背側の表皮細胞 (群) が *GCAM1* の働きにより未分化な状態に維持され、杯状体底部としてのアイデンティティを持つようになる。次に、杯状体形成の場が作られ、杯状体底部領域が維持され拡大すると考えられる。著者らはこの過程に関与する因子を見出しており、現在解析を進めている。最後に、*MpRKD* が機能して周囲の背側組織が立ち上がり杯状体の縁を形成することで、カップ状の杯状体が完成すると考えられる。最近では、これらの転写因子の上流因子の研究も展開され始めている。例えば、植物ホルモンであるサイトカイニンが *type-B* レスポンスレギュレーター (RR) を介して *GCAM1* の発現上昇を制御していることが示され、サイトカイニンが杯状体形成を調節していることが明らかになってきた (Aki et al. 2019; 2022)。このように、*GCAM1* などの転写因子の発現を制御する上流因子、また転写活性を調節するような相互作用因子、そして転写因子の下流で制御される分子ネットワークが明らかになることで、杯状体形成過程の全容が解明できると期待される。

3-3. 無性芽の発生を制御する因子

杯状体の底部において無性芽の発生を制御する因子としては、シロイヌナズナの *bHLH* 型転写因子 *ROOT HAIR DEFECTIVE SIX-LIKE1 (RSL1)* のオーソログ *MpRSL1* が知られている。*MpRSL1* の機能欠損変異体では、杯状体は正常に形成されるが、無性芽が形成されない (Proust et al. 2016)。さらに、無性芽と同様に表皮細胞に由来する粘液毛や仮根の形成も起こらない。シロイヌナズナにおいて *AtRSL1* は表皮細胞に由来する根毛の形成を制御しており、*AtRSL1* 機能欠損変異体の表現型はゼニゴケ *MpRSL1* の導入により相補されることから、ゼニゴケとシロイヌナズナは表皮細胞に由来する器官形成を制御する共通のメカニズムを有していると考えられる。*MpRSL1* の転写量が *MpFRH1 (FEW RHIZOIDS 1)* にコードされる miRNA によって負の制御を受けることでゼニゴケの仮根密度が調節されることから、無性芽形成密度についても同様の制御があるのではないかと予想されている (Honkanen et al. 2016)。

無性芽の発生は無性芽始原細胞が突出し非対称分裂することで始まるが (図 2A)、この最初の非対称分裂過程には、植物特異的な低分子量 G タンパク質である *ROP (Rho of plant)* の活性化因子である *MpROPGEF (KARAPPO)* が必須である。*MpROPGEF* の機能欠損変異体では、杯状体形成は正常だが無性芽が全く形成されない『からっぽ』の表現型を示す (Hiwatashi

et al. 2019)。ゼニゴケに 1 分子種のみ存在する ROP (MpROP) は無性芽を含む様々な組織・器官形成過程に関与しているにも関わらず、MpROPGEF 機能欠損変異体では無性芽以外の器官は正常に形成される (Rong et al. 2022; Hiwatashi et al. 2019)。無性芽形成初期の ROP シグナリングにおいては MpROPGEF が特異的に機能していると考えられる。

また、植物ホルモンであるオーキシンも無性芽の発生過程を制御する。被子植物のオーキシン応答レポーターを用いてゼニゴケにおけるオーキシン応答を可視化した研究から、杯状体の底部で顕著なオーキシン応答がみられることがわかった (Ishizaki et al. 2012)。また、シロイヌナズナのオーキシン生合成酵素のゼニゴケオースログ MpTAA (TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE OF ARABIDOPSIS) の発現が杯状体底部で顕著に高く、オーキシンの生合成阻害剤処理により無性芽の発生が阻害されることが示されている (Eklund et al. 2015; Flores-Sandoval et al. 2015; Kato et al. 2015)。さらに、オーキシン依存的な転写活性化因子である MpARF1 (AUXIN RESPONSE FACTOR1) と MpARF3 が無性芽の発生過程において秩序だった細胞分裂パターンに必須であることが明らかとなっている (Kato et al. 2017; Flores-Sandoval et al. 2018; Mutte et al. 2018)。このように、杯状体の底部でどのように無性芽が発生し形作られるのかについて鍵となる因子が少しずつ明らかになりつつある。しかし、無性芽始原細胞となるのか、あるいは粘液細胞となるのか、杯状体底部細胞の運命決定メカニズムはほとんどわかっていない。

4. 再生芽を介した栄養繁殖のメカニズム

ゼニゴケ葉状体において頂端分裂組織を含む頂端側を切断除去すると、基部側断片の切断部位近傍で細胞分裂がおり細胞塊が形成される。基部側断片の腹側の表皮細胞において、切断から約 24 時間後には細胞周期が再開され、約 36 時間後には最初の細胞分裂が完了している (Nishihama et al. 2015)。また、細胞周期再開は光によりフィトクロムを介して促進される (Nishihama et al. 2015)。細胞塊において頂端細胞および周囲の分裂組織が再度確立されると (再生芽と呼ばれる)、頂端分裂組織から背側と腹側への秩序だった細胞供給と器官形成が再開され葉状体が再生する。葉状体の再生には特別なホルモン処理は必要ないが、切断片に植物ホルモンのオーキシンを添加すると再生芽形成が阻害されることから、頂端分裂組織を切除した葉状体からの再生過程にオーキシンが関与していると考えられてきた (LaRue and Narayanaswami 1957)。オーキシン生合成酵素である MpTAA と MpYUC2 (YUCCA2) の遺伝子発現パターンから、オーキシンは葉状体の頂端分裂組織で合成され基部側に向かって供給されていると考えられる (Eklund et al. 2015)。最近、切断によって頂端分裂組織が除去されるとオーキシンの供給が途絶え、基部側断片でオーキシンの濃度が低下することが実験的に示され、基部側断片でのオーキシン濃度の低下が再生の引き金となる可能性が示唆されている (Ishida et al. 2022)。さらに、オーキシン濃度の低下により発現が誘導される class VIIIb AP2/ERF 型転写因子 MpLAXR (LOW AUXIN RESPONSIVE) が発見された (Ishida et al. 2022)。MpLAXR 遺伝子の機能欠損変異体では、基部側断片での細胞周期の再開が抑制され、再生が抑制される。このことから、MpLAXR は再生促進因子であることがわかった。

また, class X ERF 型転写因子 MpERF15 も再生の促進に機能している (Liang et al. 2022) 。MpERF15 は多価不飽和脂肪酸から合成される生理活性物質群であるオキシリピンの一種 12-オキソ-フィトジエン酸 (OPDA) 合成を促進し, OPDA による正のフィードバックループにより自身の転写が促進されていることが明らかになった (Liang et al. 2022) 。植物の代表的なオキシリピンであるジャスモン酸は, 被子植物において傷害応答や病原体に対する防御反応を引き起こすシグナル物質として機能し, 成長や花芽形成制御にも関与していることが知られる。ゼニゴケにおいても傷害に反応してオキシピリン経路の活性化が引き起こされ, オキシピリンシグナリングが再生過程の制御に関与しているのではないだろうか。

興味深いことに著者らのグループでは, 杯状体形成過程と葉状体の再生過程の両方で機能する因子を見出しており, 杯状体形成と葉状体再生という異なる栄養繁殖過程で同じ分子メカニズムが機能している可能性が見えつつある。

5. まとめと展望

栄養繁殖はさまざまな植物系統でみられ, むかご・地下茎・塊根・無性芽など, そのしくみは植物種によって多様である。しかし, 共通しているのは, 植物体本体の頂端分裂組織とは別に, 場合によっては新たに, 分裂組織が形成される点である。陸上植物進化の最も基部で分岐したコケ植物の苔類に属するゼニゴケも栄養繁殖のしくみを持っている。本稿で紹介したように, 分子生物学的な研究基盤が整ったゼニゴケの利点を活かしてゼニゴケの栄養繁殖器官である杯状体形成の分子メカニズムの一端が解明されつつある。興味深いことに, 杯状体形成制御に関与する転写因子のシロイヌナズナにおけるオーソログは, いずれも, 頂端分裂組織から離れた場所での芽の形成を制御する因子であった。ゼニゴケは被子植物における栄養繁殖器官である根・茎・葉を持たないが, 先述のように「新たに別の分裂組織を作る」という点においては共通した機構をもっている。ゼニゴケにおいて栄養繁殖の分子メカニズムが解明されることは陸上植物に共通した, 栄養繁殖の仕組みの理解につながると期待される。またこうした知見は, 栄養繁殖生植物研究のみならず, 栄養繁殖生植物の農業・工業利用にも大きく貢献するものと考えている。

謝辞

本稿で扱った著者らの研究は 平成 29-33 年度 文部科学省化学研究費助成事業 新学術領域研究「植物の生命力を支える多能生幹細胞の基盤原理」のサポートを受けて行われたものです。また本稿をまとめるにあたり, 加藤大貴博士 (愛媛大), 安居佑季子博士(京都大) には多くの貴重なアドバイスをいただきました。

引用文献

Aki SS, Mikami T, Naramoto S, Nishihama R, Ishizaki K, Kojima M, Takebayashi Y, Sakakibara H, Kyojuka J, Kohchi T et al (2019) Cytokinin Signaling Is Essential for Organ Formation in *Marchantia polymorpha*. *Plant and Cell Physiology* 60:1842–1854. doi: 10.1093/pcp/pcz100

- Aki SS, Morimoto T, Ohnishi T, Oda A, Kato H, Ishizaki K, Nishihama R, Kohchi T, and Umeda M (2022) R2R3-MYB transcription factor GEMMA CUP-ASSOCIATED MYB1 mediates the cytokinin signal to achieve proper organ development in *Marchantia polymorpha*. *Sci Rep* 12:21123. doi: 10.1038/s41598-022-25684-3
- Barnes CR, Land WJG (1908) Bryological Papers. II. The Origin of the Cupule of *Marchantia*. *Botanical Gazette* 46:401–409. doi: 10.1086/329782
- Bowman JL, Kohchi T, Yamato KT, Jenkins J, Shu S, Ishizaki K, Yamaoka S, Nishihama R, Nakamura Y, Berger F et al. (2017) Insights into land plant evolution garnered from the *Marchantia polymorpha* genome. *Cell* 171: 287–304. doi: 10.1016/j.cell.2017.09.030
- Brown RC, Lemmon BE (2004) g-Tubulin, microtubule arrays, and quadripolarity during sporogenesis in the hepatic *Aneura pinguis* (Metzgeriales). *J Plant Res* 117:371–376. doi: 10.1007/s10265-004-0168-0
- Eklund DM, Ishizaki K, Flores-Sandoval E, Kikuchi S, Takebayashi Y, Tsukamoto S, Hirakawa Y, Nonomura M, Kato H, Kouno M et al (2015) Auxin Produced by the Indole-3-Pyruvic Acid Pathway Regulates Development and Gemmae Dormancy in the Liverwort *Marchantia polymorpha*. *Plant Cell* 27:1650–1669. doi: 10.1105/tpc.15.00065
- Flores-Sandoval E, Dierschke T, Fisher TJ, Bowman JL (2016) Efficient and Inducible Use of Artificial MicroRNAs in *Marchantia polymorpha*. *Plant Cell Physiol* 57:281–290. doi: 10.1093/pcp/pcv068
- Flores-Sandoval E, Eklund DM, Bowman JL (2015) A Simple Auxin Transcriptional Response System Regulates Multiple Morphogenetic Processes in the Liverwort *Marchantia polymorpha*. *PLoS Genet* 11:e1005207. doi: 10.1371/journal.pgen.1005207
- Flores-Sandoval E, Eklund DM, Hong S, Alvarez JP, Fisher TJ, Lampugnani ER, Golz JF, Vázquez-Lobo A, Dierschke T, Lin S et al (2018) Class C ARF s evolved before the origin of land plants and antagonize differentiation and developmental transitions in *Marchantia polymorpha*. *New Phytol* 218:1612–1630. doi: 10.1111/nph.15090
- Higo A, Niwa M, Yamato KT, Yamada L, Sawada H, Sakamoto T, Kurata T, Shirakawa M, Endo M, Shigenobu S et al (2016) Transcriptional Framework of Male Gametogenesis in the Liverwort *Marchantia polymorpha* L. *Plant Cell Physiol* 57:325–338. doi: 10.1093/pcp/pcw005
- Hiwatashi T, Goh H, Yasui Y, Koh LQ, Takami H, Kajikawa M, Kirita H, Kanazawa T, Minamino N, Togawa T et al (2019) The RopGEF KARAPPO Is Essential for the Initiation of Vegetative Reproduction in *Marchantia polymorpha*. *Current Biology* 29:3525–3531.e7. doi: 10.1016/j.cub.2019.08.071
- Honkanen S, Jones VAS, Morieri G, Champion C, Hetherington AJ, Kelly S, Proust H, Saint-Marcoux D, Prescott H, and Dolan L (2016) The Mechanism Forming the Cell Surface of Tip-Growing Rooting Cells Is Conserved among Land Plants. *Current Biology* 26:3238–3244. doi: 10.1016/j.cub.2016.09.062
- shida S, Suzuki H, Iwaki A, Kawamura S, Yamaoka S, Kojima M, Takebayashi Y, Yamaguchi K, Shigenobu S, Sakakibara H et al (2022) Diminished Auxin Signaling Triggers Cellular

- Reprogramming by Inducing a Regeneration Factor in the Liverwort *Marchantia polymorpha*. *Plant and Cell Physiology* 63:384–400. doi: 10.1093/pcp/pcac004
- Ishizaki K (2015) Development of schizogenous intercellular spaces in plants. *Front Plant Sci* 6:. doi: 10.3389/fpls.2015.00497
- Ishizaki K, Chiyoda S, Yamato KT, Kohchi T (2008) Agrobacterium-Mediated Transformation of the Haploid Liverwort *Marchantia polymorpha* L., an Emerging Model for Plant Biology. *Plant and Cell Physiology* 49:1084–1091. doi: 10.1093/pcp/pcn085
- Ishizaki K, Johzuka-Hisatomi Y, Ishida S, Iida S, and Kohchi T (2013) Homologous recombination-mediated gene targeting in the liverwort *Marchantia polymorpha* L. *Sci Rep* 3:1532. doi: 10.1038/srep01532
- Ishizaki K, Nishihama R, Ueda M, Inoue K, Ishida S, Nishimura Y, Shikanai T, and Kohchi T (2015) Development of Gateway Binary Vector Series with Four Different Selection Markers for the Liverwort *Marchantia polymorpha*. *PLoS ONE* 10:e0138876. doi: 10.1371/journal.pone.0138876
- Ishizaki K, Nonomura M, Kato H, Yamato KT, and Kohchi T (2012) Visualization of auxin-mediated transcriptional activation using a common auxin-responsive reporter system in the liverwort *Marchantia polymorpha*. *J Plant Res* 125:643–651. doi: 10.1007/s10265-012-0477-7
- Iwasaki M, Kajiwarra T, Yasui Y, Yoshitake Y, Miyazaki M, Kawamura S, Suetsugu N, Nishihama R, Yamaoka S, Wanke D et al (2021) Identification of the sex-determining factor in the liverwort *Marchantia polymorpha* reveals unique evolution of sex chromosomes in a haploid system. *Current Biology* 31:5522–5532.e7. doi: 10.1016/j.cub.2021.10.023
- Kato H, Ishizaki K, Kouno M, Shirakawa M, Bowman JL, Nishihama R, and Kohchi T (2015) Auxin-Mediated Transcriptional System with a Minimal Set of Components Is Critical for Morphogenesis through the Life Cycle in *Marchantia polymorpha*. *PLoS Genet* 11:e1005084. doi: 10.1371/journal.pgen.1005084
- Kato H, Kouno M, Takeda M, Suzuki H, Ishizaki K, Nishihama R, and Kohchi T (2017) The Roles of the Sole Activator-Type Auxin Response Factor in Pattern Formation of *Marchantia polymorpha*. *Plant and Cell Physiology* 58:1642–1651. doi: 10.1093/pcp/pcx095
- Kato H, Yasui Y, Ishizaki K (2020) Gemma cup and gemma development in *Marchantia polymorpha*. *New Phytol* 228:459–465. doi: 10.1111/nph.16655
- Kawamura S, Romani F, Yagura M, Mochizuki T, Sakamoto M, Yamaoka S, Nishihama R, Nakamura Y, Yamato KT, Bowman JL et al (2022) MarpolBase Expression: A Web-Based, Comprehensive Platform for Visualization and Analysis of Transcriptomes in the Liverwort *Marchantia polymorpha*. *Plant and Cell Physiology* 63:1745–1755. doi: 10.1093/pcp/pcac129
- Kny L (1890) Bau und Entwicklung von *Marchantia polymorpha* in Botanische wandtafeln miterläuterndem. Wiegandt, Hempel & Parey, Berlin.
- Koi S, Hisanaga T, Sato K, Shimamura M, Yamato KT, Ishizaki K, Kohchi T, and Nakajima K (2016) An Evolutionarily Conserved Plant RKD Factor Controls Germ Cell Differentiation. *Current Biology* 26:1775–1781. doi: 10.1016/j.cub.2016.05.013

- Larue CD and Narayanaswami S (1957) Auxin Inhibition in the Liverwort *Lunularia*. *New Phytol* 56:61–70. doi: 10.1111/j.1469-8137.1957.tb07449.x
- Liang Y, Heyman J, Xiang Y, Vandendriessche W, Canher B, Goeminne G, and De Veylder L (2022) The wound-activated ERF15 transcription factor drives *Marchantia polymorpha* regeneration by activating an oxylipin biosynthesis feedback loop. *Sci Adv* 8:eabo7737. doi: 10.1126/sciadv.abo7737
- Linde A-M, Sawangproh W, Cronberg N, Szövényi P, and Lagercrantz U (2020) Evolutionary History of the *Marchantia polymorpha* Complex. *Front Plant Sci* 11:829. doi: 10.3389/fpls.2020.00829
- Montgomery SA, Tanizawa Y, Galik B, Wang N, Ito T, Mochizuki T, Akimcheva S, Bowman JL, Cognat V, Maréchal-Drouard L et al (2020) Chromatin Organization in Early Land Plants Reveals an Ancestral Association between H3K27me3, Transposons, and Constitutive Heterochromatin. *Current Biology* 30:573-588.e7. doi: 10.1016/j.cub.2019.12.015
- Mutte SK, Kato H, Rothfels C, Melkonian M, Wong GK-S, and Weijers D (2018) Origin and evolution of the nuclear auxin response system. *eLife* 7:e33399. doi: 10.7554/eLife.33399
- Nishihama R, Ishizaki K, Hosaka M, Matsuda Y, Kubota A, and Kohchi T (2015) Phytochrome-mediated regulation of cell division and growth during regeneration and sporeling development in the liverwort *Marchantia polymorpha*. *J Plant Res* 128:407–421. doi: 10.1007/s10265-015-0724-9
- Ohyama K, Fukuzawa H, Kohchi T, Shirai H, Sano T, Sano S, Umesono K, Shiki Y, Takeuchi M, Chang Z et al (1986) Chloroplast gene organization deduced from complete sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* chloroplast DNA. *Nature* 322:572–574. doi: 10.1038/322572a0
- Proust H, Honkanen S, Jones VAS, Morieri G, Prescott H, Kelly S, Ishizaki K, Kohchi T, and Dolan L (2016) RSL Class I Genes Controlled the Development of Epidermal Structures in the Common Ancestor of Land Plants. *Current Biology* 26:93–99. doi: 10.1016/j.cub.2015.11.042
- Rong D, Zhao S, Tang W, Luo N, He H, Wang Z, Ma H, Huang Y, Yao X, Pan X et al (2022) ROP signaling regulates spatial pattern of cell division and specification of meristem notch. *Proc Natl Acad Sci USA* 119:e2117803119. doi: 10.1073/pnas.2117803119
- Sakamoto Y, Ishimoto A, Sakai Y, Sato M, Nishihama R, Abe K, Sano Y, Furuichi T, Tsuji H, Kohchi T, and Matsunaga S (2022) Improved clearing method contributes to deep imaging of plant organs. *Commun Biol* 5:12. doi: 10.1038/s42003-021-02955-9
- Shimamura M (2016) *Marchantia polymorpha*: Taxonomy, Phylogeny and Morphology of a Model System. *Plant Cell Physiol* 57:230–256. doi: 10.1093/pcp/pcv192
- Shinozaki K, Ohme M, Tanaka M, Wakasugi T, Hayashida N, Matsubayashi T, Zaita N, Chunwongse J, Obokata J, Yamaguchi-Shinozaki K et al (1986) The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression. *The EMBO Journal* 5:2043–2049. doi: 10.1002/j.1460-2075.1986.tb04464.x
- Sugano SS, Nishihama R, Shirakawa M, Takagi J, Matsuda Y, Ishida S, Shimada T, Hara-Nishimura I, Osakabe K, and Kohchi T (2018) Efficient CRISPR/Cas9-based genome editing and its application to conditional genetic analysis in *Marchantia polymorpha*. *PLoS ONE* 13:e0205117. doi: 10.1371/journal.pone.0205117

Suzuki H, Harrison CJ, Shimamura M, Kohchi T, and Nishihama R (2020) Positional cues regulate dorsal organ formation in the liverwort *Marchantia polymorpha*. *J Plant Res* 133:311–321. doi: 10.1007/s10265-020-01180-5

Yasui Y, Tsukamoto S, Sugaya T, Nishihama R, Wang Q, Kato H, Yamato KT, Fukaki H, Mimura T, Kubo H et al (2019) GEMMA CUP-ASSOCIATED MYB1, an Ortholog of Axillary Meristem Regulators, Is Essential in Vegetative Reproduction in *Marchantia polymorpha*. *Current Biology* 29:3987-3995.e5. doi: 10.1016/j.cub.2019.10.004