

葉の進化発生学的研究について考える

市橋 泰範

理化学研究所 環境資源科学研究センター

〒230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町 1-7-22

Yasunori Ichihashi

Evolutionary developmental studies of leaf shape

Key words: *Evo-Devo, Gene expression, Leaf, Network analysis*

RIKEN Center for Sustainable Resource Science, Yokohama, Kanagawa, 230-0045 Japan

1. はじめに

どうして生物の形はこんなにも多様なのか？生物の形態進化は、進化生物学者ダーウィンの時代から生物学分野における重大な課題の一つである。近年、全生物で共通するDNA分子を通して生物の形態進化を理解する進化発生学が注目を浴びている。この分野は、発生を制御する分子メカニズムを種間で比較解析することで、どのように多様な形態が進化してきたのか分子レベルで明らかにすることを目的とする。現在までに、動植物を問わず幅広い生物種で進化発生学的研究が行われており、多くのケースで新規遺伝子の獲得よりも遺伝子発現の変化が形態進化に大きく貢献していることが明らかにされてきた（Blein et al. 2008, Kimura et al. 2008, Rebeiz et al. 2009, Loehlin and Werren 2012）。そのため、発生を司る遺伝子制御ネットワークのつなぎ換えが形態進化を引き起こす駆動力であると提案されている（Peter and Davidson 2011）。

進化の過程において被子植物は、環境の変化に適応するために葉の形を多様化させてきた。たとえばテンジクアオイ属 (*Pelargonium*) においては、同属内という近縁種間でも単葉から複葉まで多様性に富んだ葉の形態を観察することができる（Nicotra et al. 2011）。また渓流沿い植物は細い葉を発生させて環境に適応しており、イヌガラシ属の *Rorippa aquatica* は同一個体でも環境に応じて葉の形を変化させる（Fassett 1940, van Steenis 1981）。このように葉が示す形態の多様性は、植物の形態進化を支える制御メカニズムを理解する上で良い研究対象となるため、現在までにさかんに研究してきた。そこで本総説では、葉の進化発生学的研究を概観することで、植物の形態進化において論じる。分子レベルでの比較形態学的なアプローチから始まり、複数のモデル植物を対象とした分子遺伝学的研究を俯瞰して、著者らが行った次世代シーケンス技術を活用した進化発生学的研究を紹介する。このように葉の進化発生学という一研究分野の歴史を振り返ることで、植物の進化を理解しようとする研究の今後の方向性について議論したい。

2. 葉の発生学

植物のボティプランは、ファイトマーと呼ばれる基本単位の繰り返し構造で形作られており、ファイトマーは葉、茎、その間の腋芽で構成されている。その中でも葉が最も形態的に多様化しており、花器官も葉から派生したものであることを考えると、葉の発生を研究することは、自然界でみられる植物の形態の多様性の理解につながる (Tsukaya 2002)。

他の多くの生物現象における研究と同様に、葉の発生に関連する研究もモデル植物の変異体から多くの遺伝学的な知見が得られた (図 1)。クラス I *KNOTTED-LIKE HOMEOBOX* (以降は *KNOX* と略す) 遺伝子は茎頂分裂組織 (SAM) の無限成長性を維持しており、*BLADE-ON-PETIOLE (BOP)* 遺伝子とそれによって直接制御される *ASYMMETRIC LEAVES2 (AS2)* 及びその相互作用因子 *ASI* は *KNOX* 遺伝子を抑制することにより、SAM からの一群の細胞を葉の細胞として運命付ける (Semiarti et al. 2001, Byrne et al. 2002, Iwakawa et al. 2002, Ha et al. 2003, Lin et al. 2003, Xu et al. 2003, Ha et al. 2004, Hepworth et al. 2005, Norberg et al. 2005, Zgurski et al. 2005, Fu et al. 2007, Ha et al. 2007, Iwakawa et al. 2007, Ueno et al. 2007, Guo et al. 2008, Ha et al. 2010, Jun et al. 2010, Ichihashi et al. 2011)。加えて、この *BOP* および *ASI* 遺伝子は葉の三次元全ての軸、すなわち先端-基部軸、中央-側方軸、向背軸の形成にも関与している (Semiarti et al. 2001, Ha et al. 2003, Lin et al. 2003, Xu et al. 2003, Fu et al. 2007, Ha et al. 2007, Ikezaki et al. 2010, Ichihashi et al. 2011, Kojima et al. 2011, Ishibashi et al. 2012, Chen et al. 2013)。向背軸の形成に関しては、他にも多くの因子が明らかにされており、向軸形成に関与する遺伝子と背軸形成に関与する遺伝子とが競合して制御し合うことで葉の平面成長が維持されている (Fukushima and Hasebe 2014)。葉が示す有限成長性は、microRNA *JAW* により制御されているクラス II *TEOSINTE BRANCHED1/CYCLOIDEA/PCF (TCP)* 遺伝子が葉の成熟スケジュールの進行を抑制することで制御されている (Nath et al. 2003, Palatnik et al. 2003, Efroni et al. 2008)。この *TCP* 遺伝子の下流において、microRNA164 が *CUP-SHAPED COTYLEDON (CUC)* 遺伝子の発現場所を微調整することにより、葉の周縁部の形も制御されている (Nikovics et al. 2006, Koyama et al. 2007, Kawamura et al. 2010, Koyama et al. 2010)。加えて *CUC* と *KNOX* は相互に発現を上昇させる正のフィードバックループにより形態形成を引き起こすと考えられている (Takada et al. 2001, Blein et al. 2008, Kawamura et al. 2010)。このように、これらの制御因子が葉の発生を精密にコントロールし、進化の過程でこれらの因子の制御が変化すると、葉の形態はダイナミックに変化すると考えられる。

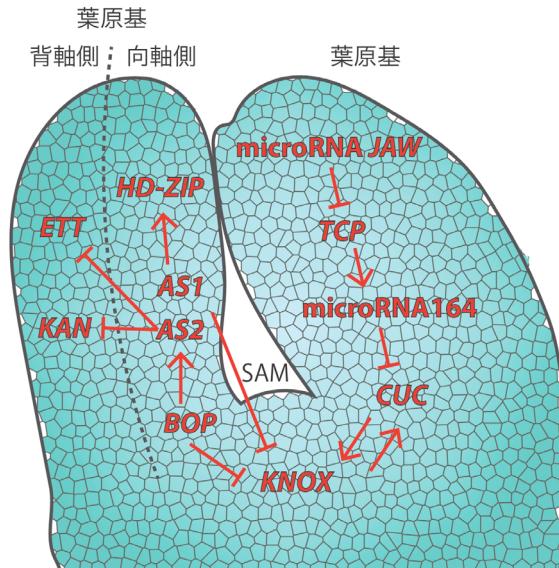


図 1 葉の発生に関与する主要な遺伝子

3. 葉の進化発生学的研究のさきがけ

上記したような多様な葉の形を示す変異体の研究により、自然界で観察できる葉の多様性を遺伝子レベルで理解する突破口が開けた。その中でも、葉の形態を劇的に変化させる *KNOX* 遺伝子がまず着目された。様々な葉の形を示す植物群について葉原基における *KNOX* 遺伝子の発現が比較され、*KNOX* 遺伝子発現と葉原基の形態に相関していることが明らかになった (Bharathan et al. 2002)。一方で、複雑な葉原基であっても最終的に単葉を発達させる種もあるため (Bharathan et al. 2002)，葉の最終形態だけでなく葉の初期発生における遺伝子発現を踏まえなければ、眞の相同性が明らかにならない (図 2)。これを機に、比較形態学的なアプローチに遺伝子発現を比較するという新機軸を加えた進化発生学的研究がさかんに行われ、形態進化における相同性を深く理解できるようになった。

単葉と複葉 – 植物の葉は単葉と複葉に大別され、単葉と複葉における器官の相同性は長い間議論されてきた。すなわち複葉全体が単葉と相同なのか、複葉を構成する個々の小葉が単葉と相同なのか、形態のみの比較からだけでは明らかでなかった (Champagne and Sinha 2004)。トマトの複葉を用いた一連の発生学的解析から、単葉形成に重要な *KNOX* 遺伝子の制御、植物ホルモンのオーキシン、*CUC* 遺伝子などの転写因子の制御が複葉の小葉形成にも重要であることがわかった (Ori et al. 2007, Berger et al. 2009, David-Schwartz et al. 2009, Koenig et al. 2009)。これらの知見をもとに複葉と単葉の相同性について考えると、上記の 2 つの仮説は相反するものではなく、*KNOX* や *CUC* などの制御因子は植物の形態パターンの骨格となる「枝分かれのパターン形成」を祖先種において制御しており、進化の過程においてこの制御系が葉の発生プログラムに再利用されたため、単葉から複葉が進化したと考えられる (Koenig and Sinha 2010)。

両面葉と单面葉 – 葉は通常、表側と裏側の性質をもつ平たい形になる「両面葉」であるが、アヤメやネギといった一部の植物は、裏側の性質しか持たない「单面葉」をつくる。イグサ属 (*Juncus*) を用いた比較遺伝子発現解析により、单面葉では葉の裏側の性質を決める *AUXIN RESPONSE FACTOR3/ETTIN* 遺伝子が葉原基全体で働くことで、裏側の性質しか持たない

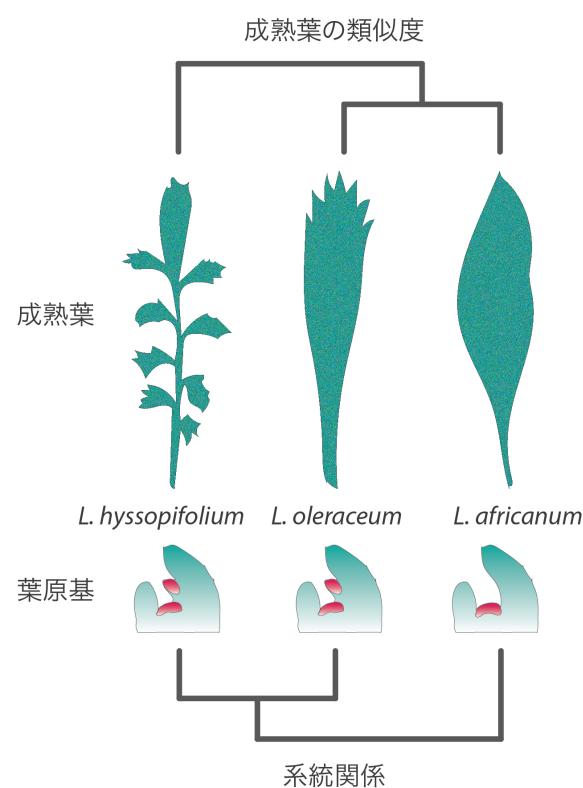


図 2 成熟葉と葉原基の違い

葉の初期発生と遺伝子発現を調べることで眞の相同性を理解できる。*KNOX* の遺伝子発現部位を赤で示す。

くなることが明らかになった (Yamaguchi et al. 2010)。一方で单面葉でも平たい形の葉をつくる種（茎頂に対して葉が展開する方向が両面葉と 90 度違う）が存在しており、*DROOPING LEAF* 遺伝子の発現変化が向背軸方向に沿った細胞増殖を促進することで平たい構造をつくる。このことから、葉の平たさという形態は両面葉と单面葉で相同ではなく、全く異なるメカニズムでつくられることがわかった (Yamaguchi et al. 2010)。

葉と仮葉枝 – 仮葉枝とは発生する位置から枝に相当するが、葉のような形態を示す器官である。アスパラガス属 (*Asparagus*) の仮葉枝形成における詳細な遺伝子発現解析により、仮葉枝では枝で機能する *KNOX* 遺伝子と、葉で機能する *ASI* 遺伝子の両方が発現していることが明らかになった (Nakayama et al. 2012)。加えて、仮葉枝で見られた *ASI* の遺伝子発現パターンは、葉で観察されるパターンと非常によく似ていることから、仮葉枝は枝に葉の性質が付加されて生じた器官であることが明らかとなった (Nakayama et al. 2012)。

上記で示したように、初期発生と遺伝子発現を詳細に調べることで器官の相同性とその分子メカニズムの一端が明らかになる。一方で、形態進化に相關した発現を示す遺伝子が実際に形態進化に貢献したか、すなわち原因なのか結果なのかを発現解析のみからでは結論付けることはできない。そのため形態進化の背景にあるメカニズムを遺伝子レベルで理解するためには、形質転換などを用いた遺伝子の操作実験による実証が必要になる。

4. 遺伝子の機能解析による葉の形態進化の実証研究

そこでモデル植物と近縁で、葉の形態が多様な植物種へと研究対象が広がり、遺伝子操作による分子遺伝学的解析が行われるようになった。特にモデル植物シロイヌナズナと近縁で複葉を持つミチタネツケバナや、研究リソースが充実したトマトと近縁種を対象にした研究が先行して多くの知見をもたらした (図 3)。前述した *KNOX* 遺伝子およびそれを制御する *ASI* 遺伝子の制御メカニズムがミチタネツケバナとシロイヌナズナの間で比較解析された。

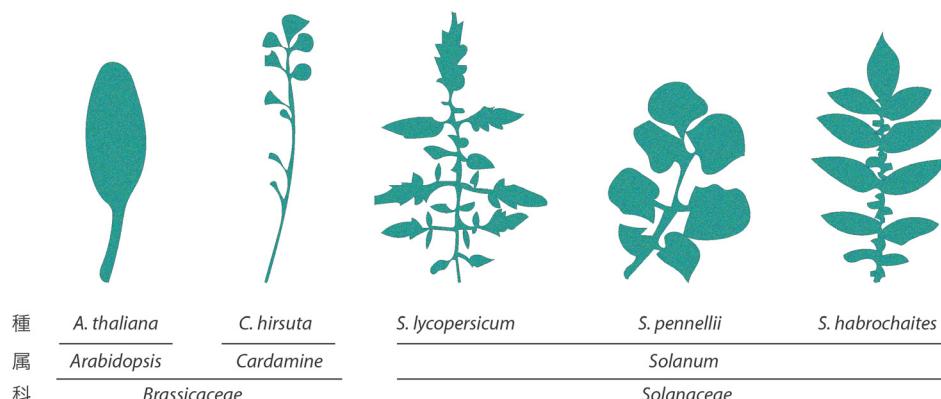


図 3 モデル植物とその近縁種の成熟葉

シロイヌナズナ (*A. thaliana*) と近縁なミチタネツケバナ (*C. hirsuta*)、トマト (*S. lycopersicum*) と近縁な *S. pennellii* と *S. habrochaites* は多様な葉の形を示す。

その結果, *ASI* 遺伝子の機能は保存されているものの *KNOX* 遺伝子の上流にある制御配列の違いにより *ASI-KNOX* 制御系が 2 種間で異なり葉の形態の違いが生じていることが明らかになった (Hay and Tsiantis 2006)。加えてシロイヌナズナ属内でみられる葉の形態の多様性の一部も *KNOX* 遺伝子の上流にある制御の変化で説明できることがわかった (Piazza et al. 2010)。

一方で遺伝子の発現制御系の違いだけでなく、タンパク質レベルでの制御系の違いが種間の葉の違いを生み出すケースがトマトと近縁種 *Solanum galapagense*との解析で明らかになった。KNOX タンパク質は BEL-LIKE HOMEO DOMAIN タンパク質と複合体を形成して機能するが、ホメオドメインを持たない KNOX タンパク質 PETROSELINUM (PTS) / KANTM はその複合体形成を阻害する (Kimura et al. 2008, Magnani and Hake 2008)。*S. galapagense* では PTS の発現が過剰となる遺伝的変異を持ち、そのため KNOX と BELL 複合体形成が阻害され下流の制御が変化することで、葉の形態が複雑化したことが明らかになった (Kimura et al. 2008)。

また *CUC* 遺伝子は様々な植物種における葉の形態において保存された機能を持つことが形質転換実験で明らかされており、遺伝子操作実験によりモデル植物で明らかにされていた葉の形態の制御因子について進化的スケールでの機能が明らかになった (Blein et al. 2008)。加えて、近縁種の順遺伝学的アプローチにより、モデル植物では欠失した遺伝子が形態進化へ関与していることも示された (Sicard et al. 2014, Vlad et al. 2014)。

以上のように、葉の形態進化に貢献した遺伝子さらには種間の形態的相違を説明する遺伝的変異が明らかになった。この知見は、遺伝子制御ネットワークのつなぎ換えもしくは部分的な改変が形態進化を引き起こすという仮説を支持した。しかしながら、個々の遺伝子の機能解析からだけでは、発生を司る遺伝子制御ネットワークがシステムとしてどのように変化して形態進化を引き起こしたのか議論できない。

5. トランスクリプトームからみた葉の形態進化の全体像

それでは一体、どのような遺伝子制御ネットワークの変化が自然界で観察されるような多様な形の葉を進化させるのだろうか? この問題解決において、近年の次世代シーケンサーを使ったトランスクリプトーム (RNA-seq) が有効である (Ichihashi and Sinha 2014, Ichihashi et al. 2015)。トランスクリプトーム解析によりゲノムワイドで遺伝子発現データを得ることで、発生現象などの複雑な生物学的な現象を理解することができ、特に次世代シーケンシング技術によりゲノムが解読されていない非モデル生物においてもトランスクリプトーム解析を適用できることは大きなブレイクスルーである (Wang et al. 2009)。加えて、数学の一分野であるグラフ理論をトランスクリプトーム解析に導入することにより、個々の遺伝子の関係をシステムレベルで理解する、すなわち遺伝子制御ネットワークを推定することができるようになった (Marbach et al. 2012)。

そこで著者らは RNA-seq を用いて、トマトと近縁種 (*S. pennellii* と *S. habrochaites*) 間の葉

の発生について進化発生学的解析を行い、多様な葉の形を進化させた遺伝子制御ネットワーク上の変化を明らかにした (Ichihashi et al. 2014)。これらの植物種における葉の発生ステージ別の RNA-seq データを用いた共発現ネットワーク解析により、トマト種における葉の発生の遺伝子制御ネットワークの予測を試みた。バイオインフォマティックス解析に加えて生化学実験を行った結果、ネットワークの周縁部分に葉の形の複雑性を制御する PTS 遺伝子を含む遺伝子モジュールがあり、このモジュール内で BOP と LSH のタンパク質複合体が PTS の発現を直接制御し、PTS が競合する KNOX タンパク質（トマトでは LeT6）の量によって、葉の細胞増殖関連因子を含むネットワーク上の多くの遺伝子発現が制御されていることがわかった (Kimura et al. 2008, Ichihashi et al. 2014)。続いてトマト種間で葉の発生の遺伝子制御ネットワークがどのように変化しているのか明らかにするために、ブートストラップ法を用いてネットワーク統計量を解析することで葉の発生制御ネットワークを種間で比較した。加えて交雑個体を用いて両親種のアレルを区別した遺伝子発現解析を行うことにより、発現の制御様式を調べた。以上より、BOP の発現を制御する *cis* 因子上の変異が BOP-LSH-PTS の遺伝子モジュールの発現を変化させたため、種間で葉の発生の遺伝子制御ネットワークで大規模な発現の変化が起きていることが示唆された (Ichihashi et al. 2014)。

トマトはすでにゲノムが解読され、その近縁種においても分子遺伝学的解析が可能である (Ranjan et al. 2012, Ichihashi and Sinha 2014)。そこで実際に BOP-LSH-PTS の遺伝子モジュールの発現変化が形態進化を引き起こしたか検証するため、上流因子の BOP と LSH 遺伝子の発現を操作した形質転換体を解析すると、それらの遺伝子の発現量によって、トマトとその近縁種における多様な葉の形質の一部が再現された (Ichihashi et al. 2014)。この結果は BOP-LSH-PTS の遺伝子モジュールが引き起こすネットワークの大規模なつなぎ替えが葉の形の多様性を生み出したことを示し、今までの進化発生学で提唱されている、「遺伝子制御ネットワークにおける大規模なつなぎ替えが形態進化を引き起こす」という仮説を実験データで支持した (Peter and Davidson 2011)。また理論ネットワーク生物学的知見から、遺伝子制御ネットワークの周縁に位置する遺伝子群の変異の方がネットワークのハブ遺伝子群の変異よ

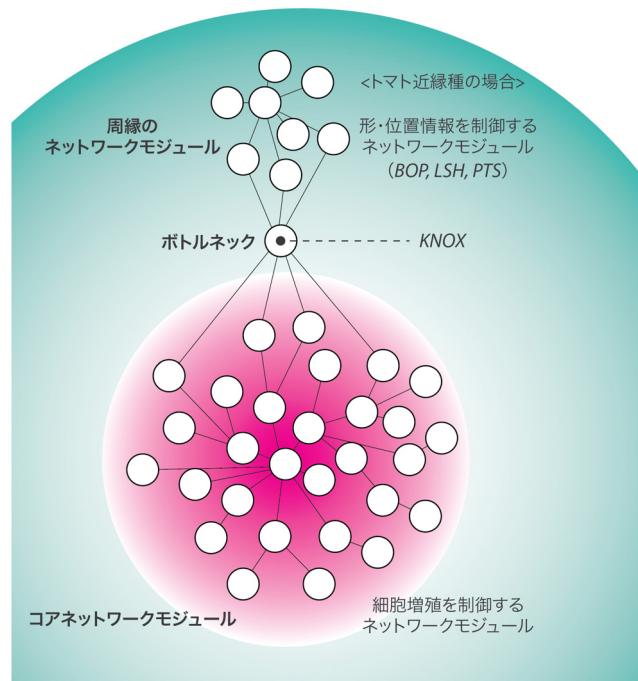


図 4 ネットワークからみた形態進化のモデル

それぞれの遺伝子は、遺伝子制御ネットワーク上の位置によって形態進化への寄与が違うと考えられる。

りも進化的な寄与が大きいとされていたが (Vidal et al. 2011), 今回の研究により初めてその予測が実験的に支持された。前述したように, 幅広い植物種において *KNOX* 遺伝子の制御における変異が形態進化に繰り返し関与することは (Bharathan et al. 2002, Hay and Tsiantis 2010, Katayama et al. 2010, Piazza et al. 2010, Nakayama et al. 2012, Nakayama et al. 2014, Sicard et al. 2014, Vlad et al. 2014), *KNOX* 遺伝子が形や位置情報を制御するネットワークモジュールと細胞増殖に関与するネットワークモジュールを橋渡するボトルネック上にあるためかもしれない (図 4)。今後このようなトランスクリプトーム解析を駆使した進化発生学的研究が他の植物での形態進化に応用されることになれば, このアイデアの一般性が検証されていくだろう。

6. おわりに

今後, 植物の進化発生学分野では, シーケンス技術や遺伝子操作技術などの進歩のため, より詳細でスケールが大きな研究が主流になることは想像に難くない。たとえば, 大規模な RNA-seq を可能とする技術により (Kumar et al. 2012, Townsley et al. 2015), ネットワークの動的変化を追うことが容易となる。加えて, ネットワークの構造を比較するバイオインフォマティックスにより (Ideker and Krogan 2012, Fukushima 2013), 個々の遺伝子レベルでなく「遺伝子と遺伝子の相互作用レベル」で形態進化を解き明かすことができる。さらに解析から得られた結果に基づいて, CRISPR/Cas9 などのゲノム編集技術を使って人工的に遺伝子間の相互作用を操作することにより (Kumar and Jain 2015), 遺伝子制御ネットワーク上の個々の相互作用の変化がどのように形態進化に結びつくのか明らかになる。

また技術進歩だけでなく, 研究対象もさらに広がるだろう。たとえば, 前述した单面葉や仮葉枝のように, 特定の種もしくはグループに特異的な新規形質の進化現象に対して, より深い理解が得られると予想される。特に食虫植物の捕虫葉や寄生植物の吸器などユニークな形態進化について遺伝子および遺伝子制御ネットワークレベルで理解できれば, そのような植物が真に特別な遺伝的背景を持っているのか, もしくはすでに保持している遺伝子セットを使い回すことで新規形質を進化させうるのか明らかになる。さらに個々の植物系統における進化だけでなく, 系統を超えたレベルでの大進化や収斂進化への進化発生学的アプローチも今後期待される。

最後にこのような進化発生学的研究から得られた知見は, 基礎科学分野にとどまらず, 農作物などの改良に貢献することができるかもしれない。たとえば, 進化の過程で選択される遺伝的変異は, 単に特定の形質のみが環境に適応したとは考えづらく, 他の形質における制御系とバランスのとれた遺伝子制御ネットワークモジュールが自然界で選択される可能性が十分に考えられる。そこで, 育種において農業利用上価値ある遺伝的形質のみに着目するのではなく, 進化的背景を踏まえた, システムとしてより頑強な植物形態デザインを目指すべきであろう。その目的達成に進化発生学的研究から得られる知見が貢献できると期待される。

7. 謝辞

本稿で紹介した著者らの研究の一部は、理化学研究所・基礎科学特別研究員制度および科学研究補助金・若手研究B(15K18589)の支援を得て遂行した。また本研究を進めるにあたり、数々のサポートを頂いた、カリフォルニア大学デービス校・Prof. Neelima Sinha, Prof. Julin Maloof, Dr. José Antonio Aguilar-Martínez, Dr. Moran Farhi, Dr. Ravi Kumar, Dr. Lee Millon, Dr. Jie Peng, ドナルドダンフォース研究所・Dr. Daniel Chitwoodに、この場を借りてお礼申し上げます。

8. 引用文献

- Berger, Y., Harpaz-Saad, S., Brand, A., Melnik, H., Sirding, N., Alvarez, J. P., Zinder, M., Samach, A., Eshed, Y., and Ori, N. 2009. The NAC-domain transcription factor GOBLET specifies leaflet boundaries in compound tomato leaves. *Development* 136: 823-832.
- Bharathan, G., Goliber, T. E., Moore, C., Kessler, S., Pham, T., and Sinha, N. R. 2002. Homologies in leaf form inferred from KNOXI gene expression during development. *Science* 296: 1858-1860.
- Blein, T., Pulido, A., Viallette-Guiraud, A., Nikovics, K., Morin, H., Hay, A., Johansen, I. E., Tsiantis, M., and Laufs, P. 2008. A conserved molecular framework for compound leaf development. *Science* 322: 1835-1839.
- Byrne, M. E., Simorowski, J., and Martienssen, R. A. 2002. ASYMMETRIC LEAVES1 reveals knox gene redundancy in Arabidopsis. *Development* 129: 1957-1965.
- Champagne, C., and Sinha, N. 2004. Compound leaves: equal to the sum of their parts? *Development* 131: 4401-4412.
- Chen, X., Wang, H., Li, J., Huang, H., and Xu, L. 2013. Quantitative control of ASYMMETRIC LEAVES2 expression is critical for leaf axial patterning in Arabidopsis. *J. Exp. Bot.* 64: 4895-4905.
- David-Schwartz, R., Koenig, D., and Sinha, N. R. 2009. LYRATE is a key regulator of leaflet initiation and lamina outgrowth in tomato. *Plant Cell* 21: 3093-3104.
- Efroni, I., Blum, E., Goldshmidt, A., and Eshed, Y. 2008. A protracted and dynamic maturation schedule underlies Arabidopsis leaf development. *Plant Cell* 20: 2293-2306.
- Fassett, N. C. 1940. A Manual of Aquatic Plants, University of Wisconsin Press, Madison, Wisconsin, USA.
- Fu, Y., Xu, L., Xu, B., Yang, L., Ling, Q., Wang, H., and Huang, H. 2007. Genetic interactions between leaf polarity-controlling genes and ASYMMETRIC LEAVES1 and 2 in Arabidopsis leaf patterning. *Plant Cell Physiol.* 48: 724-735.
- Fukushima, A. 2013. DiffCorr: an R package to analyze and visualize differential correlations in

- biological networks. *Gene* 518: 209-214.
- Fukushima, K., and Hasebe, M. 2014. Adaxial-abaxial polarity: the developmental basis of leaf shape diversity. *Genesis* 52: 1-18.
- Guo, M., Thomas, J., Collins, G., and Timmermans, M. C. 2008. Direct repression of KNOX loci by the ASYMMETRIC LEAVES1 complex of Arabidopsis. *Plant Cell* 20: 48-58.
- Ha, C. M., Jun, J. H., and Fletcher, J. C. 2010. Control of Arabidopsis leaf morphogenesis through regulation of the YABBY and KNOX families of transcription factors. *Genetics* 186: 197-206.
- Ha, C. M., Jun, J. H., Nam, H. G., and Fletcher, J. C. 2004. BLADE-ON-PETIOLE1 encodes a BTB/POZ domain protein required for leaf morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 45: 1361-1370.
- Ha, C. M., Jun, J. H., Nam, H. G., and Fletcher, J. C. 2007. BLADE-ON-PETIOLE 1 and 2 control Arabidopsis lateral organ fate through regulation of LOB domain and adaxial-abaxial polarity genes. *Plant Cell* 19: 1809-1825.
- Ha, C. M., Kim, G. T., Kim, B. C., Jun, J. H., Soh, M. S., Ueno, Y., Machida, Y., Tsukaya, H., and Nam, H. G. 2003. The BLADE-ON-PETIOLE 1 gene controls leaf pattern formation through the modulation of meristematic activity in *Arabidopsis*. *Development* 130: 161-172.
- Hay, A., and Tsiantis, M. 2006. The genetic basis for differences in leaf form between *Arabidopsis thaliana* and its wild relative *Cardamine hirsuta*. *Nat. Genet.* 38: 942-947.
- Hay, A., and Tsiantis, M. 2010. KNOX genes: versatile regulators of plant development and diversity. *Development* 137: 3153-3165.
- Hepworth, S. R., Zhang, Y., McKim, S., Li, X., and Haughn, G. W. 2005. BLADE-ON-PETIOLE-dependent signaling controls leaf and floral patterning in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17: 1434-1448.
- Ichihashi, Y., Aguilar-Martinez, J. A., Farhi, M., Chitwood, D. H., Kumar, R., Millon, L. V., Peng, J., Maloof, J. N., and Sinha, N. R. 2014. Evolutionary developmental transcriptomics reveals a gene network module regulating interspecific diversity in plant leaf shape. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111: E2616-2621.
- Ichihashi, Y., Kawade, K., Usami, T., Horiguchi, G., Takahashi, T., and Tsukaya, H. 2011. Key proliferative activity in the junction between the leaf blade and leaf petiole of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 157: 1151-1162.
- Ichihashi, Y., Mutuku, J. M., Yoshida, S., and Shirasu, K. 2015. Transcriptomics exposes the uniqueness of parasitic plants. *Brief. Funct. Genomics* 14: 275-282.
- Ichihashi, Y., and Sinha, N. R. 2014. From genome to phenotype and back in tomato. *Curr. Opin. Plant Biol.* 18: 9-15.
- Ideker, T., and Krogan, N. J. 2012. Differential network biology. *Mol. Syst. Biol.* 8: 565.

- Ikezaki, M., Kojima, M., Sakakibara, H., Kojima, S., Ueno, Y., Machida, C., and Machida, Y. 2010. Genetic networks regulated by ASYMMETRIC LEAVES1 (AS1) and AS2 in leaf development in *Arabidopsis thaliana*: KNOX genes control five morphological events. *Plant J.* 61: 70-82.
- Ishibashi, N., Kanamaru, K., Ueno, Y., Kojima, S., Kobayashi, T., Machida, C., and Machida, Y. 2012. ASYMMETRIC-LEAVES2 and an ortholog of eukaryotic NudC domain proteins repress expression of AUXIN-RESPONSE-FACTOR and class 1 KNOX homeobox genes for development of flat symmetric leaves in *Arabidopsis*. *Biol. Open.* 1: 197-207.
- Iwakawa, H., Iwasaki, M., Kojima, S., Ueno, Y., Soma, T., Tanaka, H., Semiarti, E., Machida, Y., and Machida, C. 2007. Expression of the ASYMMETRIC LEAVES2 gene in the adaxial domain of *Arabidopsis* leaves represses cell proliferation in this domain and is critical for the development of properly expanded leaves. *Plant J.* 51: 173-184.
- Iwakawa, H., Ueno, Y., Semiarti, E., Onouchi, H., Kojima, S., Tsukaya, H., Hasebe, M., Soma, T., Ikezaki, M., Machida, C., and Machida, Y. 2002. The ASYMMETRIC LEAVES2 gene of *Arabidopsis thaliana*, required for formation of a symmetric flat leaf lamina, encodes a member of a novel family of proteins characterized by cysteine repeats and a leucine zipper. *Plant Cell Physiol.* 43: 467-478.
- Jun, J. H., Ha, C. M., and Fletcher, J. C. 2010. BLADE-ON-PETIOLE1 coordinates organ determinacy and axial polarity in *arabidopsis* by directly activating ASYMMETRIC LEAVES2. *Plant Cell* 22: 62-76.
- Katayama, N., Koi, S., and Kato, M. 2010. Expression of SHOOT MERISTEMLESS, WUSCHEL, and ASYMMETRIC LEAVES1 homologs in the shoots of Podostemaceae: implications for the evolution of novel shoot organogenesis. *Plant Cell* 22: 2131-2140.
- Kawamura, E., Horiguchi, G., and Tsukaya, H. 2010. Mechanisms of leaf tooth formation in *Arabidopsis*. *Plant J.* 62: 429-441.
- Kimura, S., Koenig, D., Kang, J., Yoong, F. Y., and Sinha, N. 2008. Natural variation in leaf morphology results from mutation of a novel KNOX gene. *Curr. Biol.* 18: 672-677.
- Koenig, D., Bayer, E., Kang, J., Kuhlemeier, C., and Sinha, N. 2009. Auxin patterns *Solanum lycopersicum* leaf morphogenesis. *Development* 136: 2997-3006.
- Koenig, D., and Sinha, N. 2010. Evolution of leaf shape: A pattern emerges. *Curr. Top. Dev. Biol.* 91: 169-183.
- Kojima, S., Iwasaki, M., Takahashi, H., Imai, T., Matsumura, Y., Fleury, D., Van Lijsebettens, M., Machida, Y., and Machida, C. 2011. Asymmetric leaves2 and Elongator, a histone acetyltransferase complex, mediate the establishment of polarity in leaves of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 52: 1259-1273.

- Koyama, T., Furutani, M., Tasaka, M., and Ohme-Takagi, M. 2007. TCP transcription factors control the morphology of shoot lateral organs via negative regulation of the expression of boundary-specific genes in Arabidopsis. *Plant Cell* 19: 473-484.
- Koyama, T., Mitsuda, N., Seki, M., Shinozaki, K., and Ohme-Takagi, M. 2010. TCP transcription factors regulate the activities of ASYMMETRIC LEAVES1 and miR164, as well as the auxin response, during differentiation of leaves in Arabidopsis. *Plant Cell* 22: 3574-3588.
- Kumar, R., Ichihashi, Y., Kimura, S., Chitwood, D. H., Headland, L. R., Peng, J., Maloof, J. N., and Sinha, N. R. 2012. A High-Throughput Method for Illumina RNA-Seq Library Preparation. *Front. Plant Sci.* 3: 202.
- Kumar, V., and Jain, M. 2015. The CRISPR-Cas system for plant genome editing: advances and opportunities. *J. Exp. Bot.* 66: 47-57.
- Lin, W. C., Shuai, B., and Springer, P. S. 2003. The Arabidopsis LATERAL ORGAN BOUNDARIES-domain gene ASYMMETRIC LEAVES2 functions in the repression of KNOX gene expression and in adaxial-abaxial patterning. *Plant Cell* 15: 2241-2252.
- Loehlin, D. W., and Werren, J. H. 2012. Evolution of shape by multiple regulatory changes to a growth gene. *Science* 335: 943-947.
- Magnani, E., and Hake, S. 2008. KNOX lost the OX: the Arabidopsis KNATM gene defines a novel class of KNOX transcriptional regulators missing the homeodomain. *Plant Cell* 20: 875-887.
- Marbach, D., Costello, J. C., Kuffner, R., Vega, N. M., Prill, R. J., Camacho, D. M., Allison, K. R., Consortium, D., Kellis, M., Collins, J. J., and Stolovitzky, G. 2012. Wisdom of crowds for robust gene network inference. *Nat. Methods* 9: 796-804.
- Nakayama, H., Nakayama, N., Seiki, S., Kojima, M., Sakakibara, H., Sinha, N., and Kimura, S. 2014. Regulation of the KNOX-GA Gene Module Induces Heterophyllic Alteration in North American Lake Cress. *Plant Cell* 26: 4733-4748.
- Nakayama, H., Yamaguchi, T., and Tsukaya, H. 2012. Acquisition and diversification of cladodes: leaf-like organs in the genus Asparagus. *Plant Cell* 24: 929-940.
- Nath, U., Crawford, B. C., Carpenter, R., and Coen, E. 2003. Genetic control of surface curvature. *Science* 299: 1404-1407.
- Nicotra, A., Leigh, A., Boyce, K. C., Jones, C. S., Niklas, K. J., Royer, D. L., and Tsukaya, H. 2011. The evolution and functional significance of leaf shape in the angiosperms. *Funct. Plant Biol.* 38: 535-552.
- Nikovics, K., Blein, T., Peaucelle, A., Ishida, T., Morin, H., Aida, M., and Laufs, P. 2006. The balance between the MIR164A and CUC2 genes controls leaf margin serration in Arabidopsis. *Plant Cell* 18: 2929-2945.
- Norberg, M., Holmlund, M., and Nilsson, O. 2005. The BLADE ON PETIOLE genes act redundantly

- to control the growth and development of lateral organs. *Development* 132: 2203-2213.
- Ori, N., Cohen, A. R., Etzioni, A., Brand, A., Yanai, O., Shleizer, S., Menda, N., Amsellem, Z., Efroni, I., Pekker, I., Alvarez, J. P., Blum, E., Zamir, D., and Eshed, Y. 2007. Regulation of LANCEOLATE by miR319 is required for compound-leaf development in tomato. *Nat. Genet.* 39: 787-791.
- Palatnik, J. F., Allen, E., Wu, X., Schommer, C., Schwab, R., Carrington, J. C., and Weigel, D. 2003. Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature* 425: 257-263.
- Peter, I. S., and Davidson, E. H. 2011. Evolution of gene regulatory networks controlling body plan development. *Cell* 144: 970-985.
- Piazza, P., Bailey, C. D., Cartolano, M., Krieger, J., Cao, J., Ossowski, S., Schneeberger, K., He, F., de Meaux, J., Hall, N., Macleod, N., Filatov, D., Hay, A., and Tsiantis, M. 2010. Arabidopsis thaliana leaf form evolved via loss of KNOX expression in leaves in association with a selective sweep. *Curr. Biol.* 20: 2223-2228.
- Ranjan, A., Ichihashi, Y., and Sinha, N. R. 2012. The tomato genome: implications for plant breeding, genomics and evolution. *Genome Biol.* 13: 167.
- Rebeiz, M., Pool, J. E., Kassner, V. A., Aquadro, C. F., and Carroll, S. B. 2009. Stepwise modification of a modular enhancer underlies adaptation in a *Drosophila* population. *Science* 326: 1663-1667.
- Semiarti, E., Ueno, Y., Tsukaya, H., Iwakawa, H., Machida, C., and Machida, Y. 2001. The ASYMMETRIC LEAVES2 gene of *Arabidopsis thaliana* regulates formation of a symmetric lamina, establishment of venation and repression of meristem-related homeobox genes in leaves. *Development* 128: 1771-1783.
- Sicard, A., Thamm, A., Marona, C., Lee, Y. W., Wahl, V., Stinchcombe, J. R., Wright, S. I., Kappel, C., and Lenhard, M. 2014. Repeated evolutionary changes of leaf morphology caused by mutations to a homeobox gene. *Curr. Biol.* 24: 1880-1886.
- Takada, S., Hibara, K., Ishida, T., and Tasaka, M. 2001. The CUP-SHAPED COTYLEDON1 gene of *Arabidopsis* regulates shoot apical meristem formation. *Development* 128: 1127-1135.
- Townsley, B. T., Covington, M. F., Ichihashi, Y., Zumstein, K., and Sinha, N. R. 2015. BrAD-seq: Breath Adapter Directional sequencing: a streamlined, ultra-simple and fast library preparation protocol for strand specific mRNA library construction. *Front. Plant Sci.* 6: 366.
- Tsukaya, H. 2002. Leaf development. *Arabidopsis Book* 1: e0072.
- Ueno, Y., Ishikawa, T., Watanabe, K., Terakura, S., Iwakawa, H., Okada, K., Machida, C., and Machida, Y. 2007. Histone deacetylases and ASYMMETRIC LEAVES2 are involved in the establishment of polarity in leaves of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19: 445-457.
- van Steenis, C. G. G. J. 1981. Rheophytes of the world : an account of the flood-resistant flowering

- plants and ferns and the theory of autonomous evolution, Rockville, Maryland, USA.
- Vidal, M., Cusick, M. E., and Barabasi, A. L. 2011. Interactome networks and human disease. *Cell* 144: 986-998.
- Vlad, D., Kierzkowski, D., Rast, M. I., Vuolo, F., Dello Ioio, R., Galinha, C., Gan, X., Hajheidari, M., Hay, A., Smith, R. S., Huijser, P., Bailey, C. D., and Tsiantis, M. 2014. Leaf shape evolution through duplication, regulatory diversification, and loss of a homeobox gene. *Science* 343: 780-783.
- Wang, Z., Gerstein, M., and Snyder, M. 2009. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat. Rev. Genet.* 10: 57-63.
- Xu, L., Xu, Y., Dong, A., Sun, Y., Pi, L., Xu, Y., and Huang, H. 2003. Novel as1 and as2 defects in leaf adaxial-abaxial polarity reveal the requirement for ASYMMETRIC LEAVES1 and 2 and ERECTA functions in specifying leaf adaxial identity. *Development* 130: 4097-4107.
- Yamaguchi, T., Yano, S., and Tsukaya, H. 2010. Genetic framework for flattened leaf blade formation in unifacial leaves of *Juncus prismatocarpus*. *Plant Cell* 22: 2141-2155.
- Zgurski, J. M., Sharma, R., Bolokoski, D. A., and Schultz, E. A. 2005. Asymmetric auxin response precedes asymmetric growth and differentiation of asymmetric leaf1 and asymmetric leaf2 *Arabidopsis* leaves. *Plant Cell* 17: 77-91.