

# 種子休眠・発芽制御の分子機構解明をもたらす分子遺伝学的アプローチの概観と展望

メタデータ	言語: ja 出版者: 明治大学農学部 公開日: 2024-05-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 大谷,真彦, 川上,直人 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10291/0002000553">http://hdl.handle.net/10291/0002000553</a>

## 種子休眠・発芽制御の分子機構解明をもたらす 分子遺伝学的アプローチの概観と展望

大谷 真彦<sup>1</sup>・川上 直人<sup>1,2†</sup>

(2023年12月11日)

### A comprehensive survey and prospect of molecular genetic approaches to understand regulatory mechanism of seed dormancy and germination

Masahiko OTANI<sup>1</sup> and Naoto KAWAKAMI<sup>1,2†</sup>

#### Abstract

Seed dormancy is an adaptive trait that allows plants to survive unfavorable seasons as stress tolerant seeds. It also enables the seeds to germinate in the season suitable for vegetative and reproductive growth of the plants. Seed dormancy is an important agronomic trait for crop species similar to that in wild species. Shallow dormancy leads to pre-harvest sprouting of immature seeds and greatly reduces the quality and yield. Deep dormancy of mature seeds increases variation in germination timing resulting in a reduction in production efficiency. Molecular genetic approaches, such as mutation mapping and quantitative trait loci (QTL) analysis, have been applied to understand the molecular mechanism of seed dormancy/germination, and to develop molecular markers for crop breeding. Recent advances in the whole-genome sequence analysis with next generation sequencers speed up gene identification from induced mutations and natural variations in model and cultivated plants. In this review, we survey recent progress in gene identification and QTL analysis technologies that have been applied in seed dormancy/germination studies toward the future development of basic science and crop production technologies adapted to global climate change.

**Key words:** natural variation, mutant, mapping, QTL analysis, GWAS

**要 約** 植物が進化の過程で獲得した種子の休眠は、生育に不適な季節や過酷な環境条件を乗り越え、栄養成長と生殖成長に適した季節の発芽を可能とした適応形質である。作物生産において、休眠性の低下は収穫前の穂発芽による収穫量と品質の低下を招き、休眠や環境要因による播種後の不均一な発芽は生産効率の低下をもたらす。休眠・発芽の分子メカニズムの理解には、その制御に関わる因子の探索が不可欠である。そこで本論では、近年多くの知見をもたらした分子遺伝学的解析に着目し、その手法の変遷と展望、そして休眠・発芽制御メカニズムの理解の現状を論じる。シロイヌナズナの人為的な突然変異体系を材料とした遺伝学的解析は、これまでに植物ホルモンや転写制御に関わる休眠・発芽の重要な制御因子の発見を導いた。一方、分子マーカーを用いたマッピング技術や次世代シーケンサーに代表されるゲノム解析技術の進展に伴い、植物種を問わず、自然変異を利用した量的遺伝子座 (QTL) 解析からの遺伝子同定が可能となり、イネ、コムギ、

<sup>1</sup> 明治大学大学院農学研究科生命科学専攻

<sup>2</sup> 明治大学農学部生命科学科 214-8571 神奈川県川崎市多摩区東三田 1-1-1

<sup>†</sup> 連絡者: 川上直人 Email: kawakami@meiji.ac.jp TEL/FAX: 044-934-7821

オオムギなどの作物およびシロイヌナズナから、突然変異の選抜では見出すことのできなかった、新たな休眠・発芽制御システムの存在が明らかになりつつある。これらの分子遺伝学的解析技術の発展は、休眠・発芽の分子機構により深い理解をもたらし、分子育種や栽培技術の開発に寄与すると期待される。

キーワード：自然変異，突然変異，マッピング，QTL 解析，GWAS

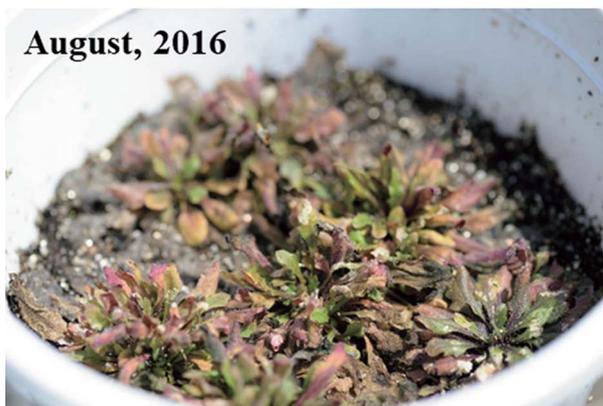
## 1. 種子休眠の生物学的意義

種子が発芽する季節は、その後の成長に大きく影響する。たとえば、冬型一年生草本の種子は春に母体から散布されるが、夏は強いストレス耐性を持つ種子の状態乗り越え、秋に発芽する。冬型一年生草本は暑さに弱く、もし春や夏に発芽してしまうと、栄養成長の段階で枯死したり、生殖成長への転換が大きく遅延したり、高温により花粉が不稔になるなど、子孫を残せなくなってしまうようなダメージを被る (Figure 1)。一方、春と秋の気温や日長などの環境は類似しているため、種子は発芽そのものというより、発芽後の成長に適した環境で発芽する能力を持つ。

休眠とは、生存している種子が、発芽に適切な水・酸素・温度などが揃っていても発芽しない生理状態

である。熱帯雨林に生育する植物種では、休眠を持たない種子を産生する種が約半数を占める (Baskin and Baskin, 2014)。一方、熱帯雨林よりも気温が低下あるいは降水量が減少した気候帯では、休眠を持つ種子を産生する植物種の割合が高くなる。このことは、植物がいつでも生育可能な、高温多湿で季節変化に乏しい環境では、種子休眠の有無は適応的に中立であるが、季節の変化がある地域では休眠を持つことが生態的に有利であることを示唆している。

休眠は、種皮や果皮が水を通さないことによって生じる「物理的休眠」、胚の形態形成が不完全（未熟）であることで生じる「形態的休眠」、植物ホルモンなどの生理的な要因で生じる「生理的休眠」に大きく分類され、形態的休眠から覚めた後に生理的休眠を示す「形態生理的休眠」、物理的休眠から覚めた種子が生理



**Figure 1 High temperature damage to vegetative and reproductive growth of winter-annual accessions of *Arabidopsis***  
The seeds of winter-annual accessions of *Arabidopsis thaliana* were sown in spring and grown in the net house in Ikuta campus, Meiji University, Kawasaki, Japan. Vegetative growth of the left accession was severely damaged in summer, and the seedlings were died before bolting. The right accession showed bolting even in summer, but set infertile flowers.

的休眠を示す「複合休眠」も分類されている (Baskin and Baskin, 2014)。このうち、生理的休眠を示す種の割合が最も高く、身近に見られる多くの野草、野菜、穀類の種子は生理的休眠を持つ。母体から散布され、土壤中に存在する種子の寿命は種によって異なるが、ある一定期間、生きた状態で存在する。これを「埋土種子」と呼ぶ。埋土種子の休眠は一気に失われるのではなく、どのような環境でも発芽しない状態から、発芽できる環境条件（水分、温度、光、酸素など）の幅が次第に広がり、非休眠状態に至る。このように、ある条件では発芽するが、他の条件では発芽しない状態を条件的休眠と呼ぶ。また、母体から散布された直後の種子が持つ休眠を「一次休眠」、一次休眠が低下した後に誘導される休眠を「二次休眠」と呼ぶ。複数年に渡って生存する埋土種子のうち、生理的休眠を持つ種子の多くは、一次または二次休眠→条件的休眠→非休眠→条件的休眠→二次休眠のサイクルを1年周期で繰り返す (Baskin and Baskin, 2014)。

では、休眠はどのような分子メカニズムで制御されるのだろうか。この理解には様々な分子遺伝学的な解析手法が重要な貢献を果たしており、ゲノム解析技術およびその周辺技術の進展に伴って大きく変化し、改良されている。そこで、次節からは休眠・発芽の分子メカニズムの理解の現状を分子遺伝学的手法の変遷とともに論じる。なお、これ以降、本論では生理的休眠を持つ種子の一次休眠を、単に「休眠」と表記する。

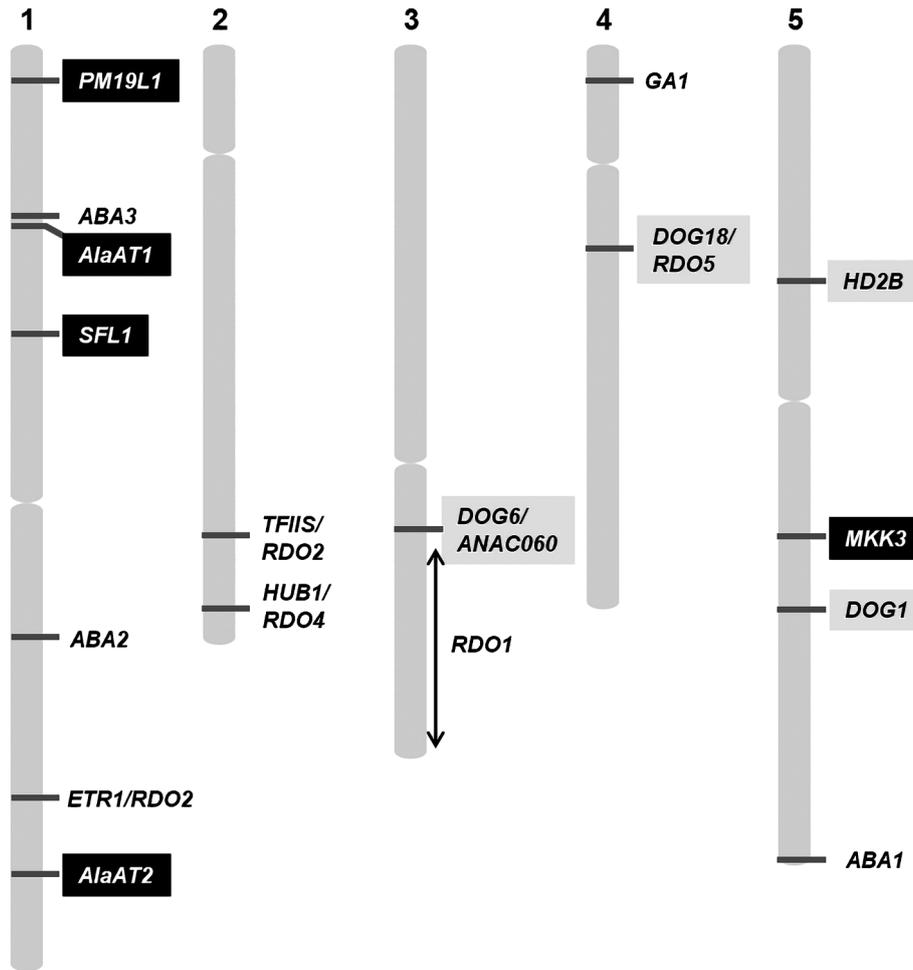
## 2. 突然変異系統を用いた休眠・発芽制御の分子遺伝学的解析

休眠を制御する遺伝子の探索は、1990年代頃からシロイヌナズナをモデル植物とした遺伝学的解析により盛んに行われてきた。EMS (Ethyl Methane Sulfonate) や放射線などを用いて人為的に突然変異を誘発させた系統を用いた解析は、古典的な遺伝学的手法であり、休眠や発芽に異常をもつ様々な変異体が単離された (Koornneef *et al.*, 1982a; McCarty *et al.*, 1991; Meinke *et al.*, 1994; Leon-Kloosterziel *et al.*, 1996; Peeters *et al.*, 2002; Tamura *et al.*, 2006)。

アブシシン酸 (ABA) とジベレリン (GA) は種子

発芽を制御する主要な植物ホルモンである。ABA は種子貯蔵物質の蓄積、乾燥耐性の獲得、休眠の獲得・維持と発芽抑制に働くのに対し、GA は種子の発達と休眠打破、発芽誘導に働く。また、発芽において ABA と GA は拮抗的に作用することがよく知られている。このため、植物ホルモンの相互作用を理解することを目的として、種子発芽を利用した分子遺伝学的解析が展開された。例えば、シロイヌナズナの ABA 欠損突然変異、*aba1-1* は GA 欠損突然変異のサプレッサー変異として単離され (Koornneef *et al.*, 1982b; Karssen *et al.*, 1983)、同じく ABA 欠損突然変異の *aba2* および *aba3* は、GA 合成阻害剤存在下で発芽する突然変異体スクリーニングにより単離された (Leon-Kloosterziel *et al.*, 1996)。このことは、種子は ABA と GA の両者が存在しない状態では発芽すること、ABA の作用を抑えて発芽するには GA が必要なこと、GA の作用を抑えて発芽を抑制するには ABA が必要であることを示している。

休眠性の低下を指標に単離されたシロイヌナズナの *reduced dormancy* (*rdo*) 系統 (*rdo1*, *rdo2*, *rdo3*, *rdo4*) は、いずれも ABA の内生量や感受性に明確な異常が認められないことから、ABA 非依存的に休眠を制御する遺伝子に変異を持つと考えられた (Leon-Kloosterziel *et al.*, 1996; Peeters *et al.*, 2002)。変異遺伝子座の同定には、通常異なる遺伝的バックグラウンドを持つ系統を交配して得られた F<sub>2</sub> 集団を用い、分子マーカーを用いた連鎖解析 (マッピング) を行う。*rdo* は放射線を変異原とし、*Ler* 系統を材料として得られたことから、*Col-0* 系統と交配したマッピングが行われ、*rdo3* は 1 番染色体、*rdo2*, *rdo4* は 2 番染色体、*rdo1* は 3 番染色体に座乗することが示された (Figure 2; Peeters *et al.*, 2002)。2000年にはシロイヌナズナの全ゲノム配列が報告され (Arabidopsis Genome Initiative, 2000)、分子マーカーを用いたマッピングと遺伝子同定は比較的容易になっていたにも関わらず、*rdo2*, *rdo3*, *rdo4* の原因遺伝子の同定に関する報告は2007年以降であり、*rdo1* の原因遺伝子は現在でも同定されていない。マッピングからの遺伝子同定に時間を費やした要因の一つは、系統間に見られる休



**Figure 2 Location of dormancy and germination-related genes on Arabidopsis chromosomes**  
 Genes highlighted with gray background were identified by QTL analysis or GWAS in Arabidopsis. Genes with black background are Arabidopsis orthologues which were originally identified from QTLs of cereal species. Other genes were identified from Arabidopsis mutant analyses except for *RDO1*. The chromosome map was created using the Chromosome Map Tool of TAIR (<https://www.arabidopsis.org/index.jsp>).

眠性の自然変異の存在である。つまり、 $F_2$  世代では系統間の休眠性に差異をもたらす自然変異遺伝子の効果と突然変異遺伝子の効果の両方が現れるため、1 遺伝子を対象としたマッピングが出来なくなったと考えられる。*RDO* を同定した、マックスプランク研究所の Soppe 博士のグループでは、順同質遺伝子系統 (NIL: Near isogenic line; Keurentjes *et al.*, 2007) と *rdo* を交配することにより自然変異遺伝子の影響を除き、*RDO* の同定に成功している。ここで用いた NIL は、*Ler* と *Cvi* の交配で得られた  $F_2$  に *Ler* を戻し交雑し、染色体の大部分が *Ler* で、特定の染色体の一部が *Cvi* に置き換わっている。このように、休眠の突然変異マッピングは、元々存在する多数の自然変異によ

り困難となることが問題であったが、現在ではこの問題を簡便に回避する手法が開発されている (第 5 節参照)。なお、*RDO4* は *HISTONE MONOUBIQUITINATION 1 (HUB1)*、*RDO2* は *TRANSCRIPTION ELONGATION FACTOR II (TFIS)*、*RDO3* は *ETHYLENE RESPONSE 1 (ETR1)* であることが示され、クロマチンリモデリングやエチレンが休眠の制御に関わることが示唆されている (Liu *et al.*, 2007, 2011; Li *et al.*, 2019)。

### 3. シロイヌナズナの種子休眠に関わる量的遺伝子座 (QTL; quantitative trait loci) の同定

自然変異は DNA 複製・修復のミスや自然放射線などにより偶発的に生じたものであり、自然選択による適応進化に寄与すると考えられる。種子の休眠は多数の遺伝子が関与する量的形質であり、同一種内に見られる種子休眠の多様性は、自然変異に由来する多数の QTL が関与すると考えられてきた。草丈や開花期など、農業的に重要な形質の多くは量的形質である。QTL 解析では、形質に差がある親 (純系) を交配して得た F<sub>2</sub> 集団や組換え自殖系統 (RIL) 等を材料とし、DNA マーカーの遺伝型を染色体全体で満遍なく調べ、遺伝型と形質が連鎖する領域を統計学的に検出する。PCR 法の開発以前には、制限酵素で切断したゲノム DNA の断片長から塩基配列の多型を検出する RFLP (restriction fragment length polymorphism) などの分子マーカーを用いた QTL マッピングが行われてきた。近年、ゲノムの全塩基配列決定や PCR 法を用いた簡便な塩基配列多型の検出法の開発により、染色体上の分子マーカー密度が飛躍的に高まり、QTL からの遺伝子単離が可能となっている。シロイヌナズナの *Ler* と *Col-0*, *Ler* と *Cvi* の交配系統を用いた解析では、休眠・発芽に関わる QTL が全ての染色体上に複数検出されている (van Der Schaar *et al.*, 1997; Alonso-Blanco *et al.*, 2003)。休眠の強さが異なる *Ler* と *Cvi* を用いた QTL 解析では、*DOG* (*DELAY OF GERMINATION*) と名付けられた 7 つの QTL 領域が見出された (Alonso-Blanco *et al.*, 2003)。また、光条件の違いや系統の組み合わせの違いを利用することにより、現在、少なくとも 20 の QTL (*DOG*) が同定されている (Alonso-Blanco *et al.*, 2003; Laserna *et al.*, 2008; Bentsink *et al.*, 2010)。

5 番染色体の下腕に座乗する *DOG1* は、古典的な QTL 解析により、休眠に最も高く寄与する QTL として見出され、休眠を高める働きを持つ遺伝子として同定された (Figure 2, Alonso-Blanco *et al.*, 2003; Bentsink *et al.*, 2006)。休眠を持たない ABA 欠損突

然変異種子では、*DOG1* の発現は野生型より高い (Nakabayashi *et al.*, 2012)。一方、*DOG1* の機能喪失変異体種子において、ABA 分解酵素遺伝子の機能喪失変異により ABA 内生量を増加させても、休眠性は回復しない。このことから、種子の休眠形成には ABA と *DOG1* の両者が必要であると考えられている。また、*DOG1* タンパク質の蓄積量は休眠の強さと正の相関関係にあり、後熟に伴う等電点の変化により不活性化されると考えられた (Nakabayashi *et al.*, 2012)。*DOG1* の分子機能は長らく不明であったが、最近 *DOG1* は ABA 情報伝達の負の制御因子を不活性化することにより、ABA 作用を高めることが明らかにされた (Nee *et al.*, 2017; Nishimura *et al.*, 2018)。*DOG1* の機能には、カルボキシル末端領域に存在する 2 つの His 残基にヘムが結合する必要がある (Nishimura *et al.*, 2018)。ヘムが結合した *DOG1*-ヘム複合体は PP2C 型の脱リン酸化酵素である AHG1, AHG3 と結合し AHG1, AHG3 の機能を弱める。AHG3 は ABA 依存的に、AHG1 は ABA 非依存的に ABA の情報伝達を負に制御することから、*DOG1*-ヘム複合体は ABA とは一部独立した経路を介して ABA の作用を高めると考えられている (Nee *et al.*, 2017; Nishimura *et al.*, 2018)。さらに、*DOG1* の作用は内外の環境要因により制御されることが示されている。第 2 節で紹介した *RDO4/HUB1* と *RDO2/TFIIS* は *DOG1* の転写伸長に働き、*RDO3/ETR1* はエチレンの情報伝達経路を介して *DOG1* の発現を抑制することから、*DOG1* はエピジェネティックな制御、エチレンによる制御を受けることが示唆されている (Liu *et al.*, 2007, 2011; Li *et al.*, 2019)。さらに、*DOG1* の発現は土壌温度の変化に伴う休眠の深さと相関が見られることから、*DOG1* の発現は温度による制御を受け、発芽の季節決定に重要な働きを持つ可能性が考えられる (Footitt *et al.*, 2020)。

他の *DOG* の原因遺伝子の同定に関する報告は少ないが、Xiang ら (2016) は *DOG18* の原因遺伝子が *RDO5* であることを示した。*RDO5* は PP2C 型の脱リン酸化酵素ファミリーの 1 つで、脱リン酸化活性を持たない偽脱リン酸化タンパク質をコードしている

(Amiguet-Vercher *et al.*, 2015)。RDO5はDOG1の作用を弱める機能を持つものの、ABAやDOG1の量的な制御には直接関わらないことが示されており、RDO5がどのようにして休眠を制御するかは不明である(Xiang *et al.*, 2014)。最近、Songら(2021, preprint)はDOG6の原因遺伝子がグルコースの情報伝達経路に制御され、ABAの蓄積を抑制する転写制御因子をコードするANAC060(Yu *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2014)であることを示唆した。今後、さらにDOGの原因遺伝子が同定されることにより、休眠・発芽の制御メカニズムの理解がさらに深まると期待する。

#### 4. 作物種子の休眠・発芽に関わる QTL の解析

作物生産において、発芽のタイミングのばらつきは芽生えの斉一な成長を妨げるため、間引きや欠株の補充などにかかる作業負担を増加させ、収穫量を大きく低下させる。逆に、斉一な発芽や旺盛な芽生えの初期成長(発芽勢)は、栽培管理の手間を軽減し、収量を増やすことにつながるため、農業形質として重要である。人類が野生植物を栽培化(domestication)する過程では、一斉に発芽し、揃って成長する、つまり休眠性が弱い系統が、意識的あるいは無意識に選抜され、作物として定着してきたと考えられる(Ladizinsky, 1998)。一方、収穫前の発芽(pre-harvest sprouting, 穂発芽)は、種子の品質と収量に大きなダメージを与え、特に穀類では製品の品質を大きく劣化させる(Cota-Sánchez and Abreu, 2007; Gao *et al.*, 2013; Hugo Cota-Sánchez, 2018)。採種においても、収穫前に発芽した種子は乾燥すると死んでしまったり、保存性が低下してしまうため、問題となっている。コムギ、オオムギ、トウモロコシ、イネなどの穀類の穂発芽は、遺伝的な休眠性と強く連鎖しており、気温、湿度、降水量、土壌の窒素成分などの環境要因の影響を受ける(Fang and Chu, 2008)。ダイズ(Ahmad *et al.*, 2014)、トマト(Santos and Yamaguchi, 1979)、パパイヤ(Saran *et al.*, 2014)、ウリ科のメロン(Ochi and Ito, 2012)やヒョウタン(N'Gaza *et al.*, 2019)などの穂発芽(果実内の胎生発

芽とも捉えられる)は、特に採種の現場で問題になっているが、商業的な側面から情報の公開が進んでおらず、遺伝的要因と環境要因の関連が明確にされていない(Ochi and Ito, 2012)。種子の発芽は幼根の突出により完了するが、発芽のプロセスは吸水直後から進行している(Bewley, 1997)。このため、見かけ上の発芽(幼根の突出)が確認されなくても、乾燥耐性の低下や貯蔵物質の分解が誘導される。したがって、休眠・発芽の分子メカニズムの理解は作物生産においても重要であり、特にDNAマーカー育種を一つの目的として、穂発芽耐性遺伝子のマッピングが以前から盛んに行われている。

野生植物と同様、作物種やその近縁種においても、種子の休眠・発芽に関わる自然変異が蓄積している。QTL解析による休眠・発芽関連の遺伝子座の探索は、主に穂発芽耐性形質を集積するための分子マーカーの開発を目的として、穀類をはじめとした作物で行われている。これまでに、イネでは少なくとも165、コムギでは66、オオムギでは24、ソルガムでは6つの休眠関連QTLが見出されている(Gong *et al.*, 2014; Cantoro *et al.*, 2016; Mizuno *et al.*, 2018; Tai *et al.*, 2021)。作物種のQTL解析から、ABA、GAの生合成や情報伝達に関わる因子や、シロイヌナズナのDOG1に相同性を持つ遺伝子などが検出されているが、モデル植物の解析からは見出されなかった、新たな遺伝子が見出されている(Nonogaki *et al.*, 2018)。例えば、イネではSeed Dormancy 4 (*Sdr4*)、オオムギではAlanine aminotransferase (*AlaAT*)、コムギではPLASMA MEMBRANE 19 (*PM19*)、MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE KINASE 3 (*MKK3*)などが同定され、これらの遺伝子情報から作成された分子マーカーのいくつかは、すでに育種選抜に適用されている(Sugimoto *et al.*, 2010; Nakamura *et al.*, 2011; Barrero *et al.*, 2015; Nakamura *et al.*, 2016; Sato *et al.*, 2016; Torada *et al.*, 2016)。

## 5. シロイヌナズナを用いた休眠関連遺伝子の機能解析

QTL解析で同定された休眠関連遺伝子の情報を様々な作物種に適用する場合、種を越えた機能の共通性が重要となる。シロイヌナズナと同じアブラナ科の野菜、クレスやハクサイでは、*DOG1* がシロイヌナズナと同様に休眠を高める働きを持つことが示されている (Graeber *et al.*, 2010, 2011, 2014)。さらに、イネの休眠 QTL 解析から同定された *O<sub>s</sub>DOG1L-3* はシロイヌナズナの *DOG1* オーソログ (配列のみでなく、機能的にも共通) であることが示され、イネの穂発芽耐性育種の分子マーカーとして有用と考えられている (Wang *et al.*, 2020)。このように、*DOG1* の配列情報は進化的に離れた植物種の分子育種に利用されつつあるが、様々な植物種から見出された遺伝子がどのような分子機能持ち、休眠・発芽の制御機構においてどのように振る舞うかを理解することは、生物学的な興味の対象になるだけでなく、作物生産においても重要な意味を持つ。

作物の QTL から見出された休眠関連遺伝子の生理・分子機能を理解しようとする試みは、分子遺伝学的解析が容易なシロイヌナズナを用いて行われはじめた。イネ *Sdr4* の機能喪失突然変異は穂発芽耐性の低下をもたらしたことから、*Sdr4* は休眠を強める働きを持つと考えられた (Sugimoto *et al.*, 2010)。一方、シロイヌナズナの *Sdr4* ホモログ、*SFL1* (*Sdr4-like 1*) の機能喪失突然変異体の完熟種子は、野生型種子よりも強い休眠を示したことから、イネとシロイヌナズナでは *Sdr4* の休眠に対する作用が異なると考えられていた (Sugimoto *et al.*, 2010; Cao *et al.*, 2020)。最近、Zhang ら (2022) は、*SFL1* の機能喪失突然変異 (*sf1*) を用い、発達過程における種子の休眠 (穂発芽耐性) を調べ、イネと同様、*sf1* の未熟種子は穂発芽しやすくなっていることを見出した。このため、シロイヌナズナの *SFL1* はイネ *Sdr4* のオーソログであり、未熟種子の休眠を強める機能を持つにも関わらず、種子成熟に伴って休眠性を低下させる機能に転換することを提唱した。具体的には、*SFL1* は種子成熟

のマスター転写因子をコードする *LAF1* (*LEC1*, *ABI3*, *LEC2*, *FUS3*) の発現のタイミングを制御しており、種子成熟過程の初期・中期では *FUS3* と *ABI3* の発現を誘導して休眠の獲得を促し、成熟過程の後期以降は *LAF1* の発現を抑制する働きに転ずることで、休眠の低下に寄与する可能性を論じた (Zheng *et al.*, 2022)。このため、*SFL1* は生殖成長の最終段階である種子の成熟から栄養成長への転換のタイミングを制御する重要な働きを持つと考えられている。

*PM19* はコムギ培養細胞において ABA 誘導性の膜タンパク質をコードする遺伝子として単離され (Koike *et al.*, 1997)、コムギとイネでは発芽を抑制する働きを持つのにに対し、シロイヌナズナのホモログである *AtPM19-LIKE 1* (*AtPM19L1*) は発芽を誘導する働きを持つことが示された (Barrero *et al.*, 2015, 2019; Yao *et al.*, 2018)。*PM19* の作用がコムギ・イネとシロイヌナズナで異なる仕組みは明らかにされておらず、種特異的な休眠・発芽制御の存在を示唆している。また、オオムギで見出された休眠性 QTL、*Qsd1* はアラニンアミノトランスフェラーゼ (AlaAT) をコードし、休眠を弱める働きを持つ (Sato *et al.*, 2016)。AlaAT は窒素同化、タンパク質合成、炭素代謝に関与しており、シロイヌナズナゲノムには *Qsd1* / *AlaAT* と相同な 2 遺伝子が見出されている (*AlaAT1*, *AlaAT2*)。ただし、*AlaAT* が休眠にどのように関わるか、どのようなメカニズムで種子休眠・発芽を制御しているかは明らかにされていない (Duff *et al.*, 2012; Sato *et al.*, 2016)。

コムギ、オオムギの QTL 解析で共通に見出された *MKK3* は、真核生物に広く保存された情報伝達経路、MAPK カスケードを構成する因子の 1 つをコードする (Nakamura *et al.*, 2016; Torada *et al.*, 2016)。MAPK カスケードは、MAP Kinase Kinase Kinase (MAPKKK)、MAP Kinase Kinase (MKK)、MAP Kinase (MPK) によって構成される。MPK は特異的な MKK によってリン酸化され、MKK は MAPKKK によってリン酸化されて活性化する (Ichimura *et al.*, 2002)。休眠が強いコムギ品種の“Leader”と休眠が弱い“春よ恋”の穂発芽耐性

QTL解析から検出された *Phs1* では、春よ恋の *MKK3* が機能獲得型の顕性（優性）変異を持つと考えられた (Torada *et al.*, 2016)。一方、オオムギにおいて休眠が強い“アズマムギ (Az)”と休眠が弱い“関東中生ゴールド”から検出された QTL, *Qsd1* は、Az における *MKK3* の機能喪失型の潜性（劣性）変異で説明されている (Nakamura *et al.*, 2016)。つまり、*MKK3* を含む MAPK カスケードは、ムギ類において休眠を低下させる機能を持つと考えられた。ムギ類の原産地は乾燥した西アジアであるが、Az 型の休眠を強める *MKK3* 対立遺伝子を持つ品種は、穂発芽が起きやすい湿潤な東アジアに多く分布している。このため、オオムギの場合は東アジアで栽培する過程で休眠を強める変異が選抜されたと考えられている (Nakamura *et al.*, 2016)。また、コムギの穂発芽耐性 QTL として *MKK3* の顕性対立遺伝子が見いだされたのは、6 倍体であるが故に顕性変異の方が表現型に現れやすかったことも要因として考えられるが、発芽力の高い系統として選抜された可能性を示唆している (Shorinola *et al.*, 2017)。

シロイヌナズナの芽生えにおいて、*MKK3* は ABA によって活性化され、葉の老化誘導に働くことが示唆されている (Danquah *et al.*, 2015; Matsuoka *et al.*, 2015)。一方、*MKK3* の機能喪失突然変異種子は ABA 高感受性を示し、*MKK3* の恒常的活性化突然変異種子は ABA 低感受性を示すことから、種子では、*MKK3* は ABA 応答を負に制御する可能性が示されている (Danquah *et al.*, 2015)。最近、イネの MAPK カスケード、OsMAPKKK62-OsMKK3-OsMPK7/14 が種子休眠を弱める働きを持つことが示唆された (Mao *et al.*, 2019)。ただし、種子における MAPK カスケードの活性化機構の解明や、生化学的なリン酸化カスケードの証明は今後の課題となっている。現在、著者らはシロイヌナズナを材料とし、種子発芽の制御において *MKK3* を制御する MAPKKK, *MKK3* が制御する MPK の同定を行うと共に、*MKK3* カスケードの活性化をもたらす要因を解析している。また、*MKK3* カスケードによるリン酸化の制御を受け、発芽制御に関わるタンパク質を同定していきたいと考え

ている。イネは夏型一年生草本であり、冬型一年生草本のシロイヌナズナと対照的に、発芽は高温条件で誘導され、低温条件では抑制される (Fujino *et al.*, 2004)。このため、温度に応答した発芽制御に *MKK3* モジュールが関わる可能性や、その制御メカニズムを理解し、冬型・夏型一年生草本の発芽制御機構を解明することは、重要な意義を持つと考えている。

## 6. 全ゲノム配列のリシーケンス解析による突然変異遺伝子の同定

次世代シーケンサー (NGS) は2005年ごろから普及し始め、ゲノムの全塩基配列の解析が、モデル植物に留まらず様々な生物種で容易に行われるようになった。現在では更なる技術の開発や解析ソフトウェアの整備がなされ、以前よりも格段に低いコストで解析できるようになっている (Wetterstrand, 2023)。

従来、突然変異の誘発は EMS などの薬剤や放射線などを用いて行われてきたが、突然変異遺伝子座の同定を容易にするため、T-DNA やトランスポゾンを変異原としたタギング法などが開発されてきた (Ito *et al.*, 2002; Alonso *et al.*, 2003)。ただし、タギング法は形質転換やトランスポゾンの性質がよく解析されたモデル植物にのみ適用できる方法である。また、必ずしも変異がタグされている (挿入 DNA が変異の原因である) とは限らず、マッピングにより変異を同定しなければならない現象にもしばしば遭遇する (Tamura *et al.*, 2006)。一方、従来の EMS などの薬剤を用いた変異の誘発は基本的に種を選ばず、簡便な処理で変異集団を得ることができる。ただし、分子マーカーを用いたマッピング (連鎖解析) では、異なる遺伝的バックグラウンドを持つ系統を交配しなければならないため、注目する表現型に影響する自然変異が両親間に存在すると、1 因子を想定したマッピングが出来なくなってしまう (第 2 節参照)。また、変異遺伝子の単離同定には、多数の F<sub>2</sub> 系統と分子マーカーを用い、時間と労力のかかる詳細なマッピングを行う必要がある。この課題を解決したのが、MutMap 法 (Abe *et al.*, 2012) である。

MutMap 法では、突然変異体と同じバックグラウ

ンドを持つ野生型系統と交配した  $F_2$  を用い、全ゲノムのリシーケンスから、表現型と連鎖する塩基レベルの変異を直接検出するため、異なる系統の自然変異の影響を受けない。具体的には、変異が潜性の場合、突然変異形質を示す20個体程度の  $F_2$  を選抜し、それらのDNAを均一に混合したバルクDNAをNGSで解析する。得られたリードを親のゲノム配列にアライメントし、変異原 (EMS) により生じた一塩基多型 (SNP) の割合を SNP-index として、染色体ごとにグラフ化する (SNP-index plot)。変異型の塩基をホモに持つ場合の SNP-index を1.0、野生型を0とすると、表現型と関係がない染色体領域の SNP-index は、理論的には0.5となる。変異に連鎖する領域の SNP-index は0.5よりも高まるため、変異形質をもたらす領域を中心に、グラフは山状になる (Abe *et al.*, 2012)。ただし、突然変異形質とは無関係な領域で SNP-index が上昇する、つまり擬陽性が検出されることがある。この点を改良したのが、MutMap<sup>+</sup> 法である (Fekih *et al.*, 2013)。MutMap<sup>+</sup> 法では、突然変異形質を示す  $F_2$  と、野生型の表現型を示す  $F_2$  の塩基配列を比較解析する。それぞれ数十個体の  $F_2$  から調製したDNAを混合し、それぞれNGSにより全ゲノム配列をリシーケンスし、両者で対照的な SNP-index を示す領域を検出する。これにより、偽陽性の SNP が効率よく除けるようになった。また、MutMap 法では変異をホモに持つ個体を得ることが前提であったが、ヘテロ個体の後代を分析することにより、致死的な変異も同定できるようになった (Fekih *et al.*, 2013)。MutMap 法およびその改良法は、ゲノムサイズが比較的小さいイネを材料として耐塩性遺伝子や致死遺伝子、病原耐性遺伝子の同定に用いられてきたが (Abe *et al.*, 2012; Fekih *et al.*, 2013; Takagi *et al.*, 2013b)、最近ではキュウリに MutMap<sup>+</sup> 法を適用し、発芽後の芽生えが致死となる変異の原因遺伝子が同定されるなど、様々な植物種で応用されつつある (Wang *et al.*, 2021)。また、種子発芽・休眠の分野でも、イネの *AlaAT* をコードする *WSD1* が MutMap<sup>+</sup> 法を用いて同定された (Huang *et al.*, 2023)。面白いことに、イネの *WSD1* は、オオムギの *AlaAT* と対

照的に、休眠を強める作用を持つと報告されている。この種による違いは何を意味するのであろうか? *AlaAT* を介した休眠調節の分子メカニズムの解明が待たれる。

## 7. 全ゲノムシーケンス解析による QTL 解析と GWAS

MutMap 法の発想は、QTL 解析にも応用されている。QTL-seq 法はNGSを用い、作物のQTLを迅速に同定するために開発された手法である (Takagi *et al.*, 2013a)。まず、交配によって得られた  $F_2$  や RIL の表現型を解析し、解析の対象とする対照的な表現型を示す、約20個体ずつを選抜する。次に、各集団からDNAをバルクとして調製し、NGSによる全ゲノムシーケンスを行う。その後、両親間のSNPに基づく SNP-index と、両集団間の SNP-Index を比較し、対照的な SNP-index を示す領域 (QTL) を同定する。QTL-seq 法は、イネのいもち病抵抗性に関わる QTL (Takagi *et al.*, 2013a)、アワの出穂期の決定に関わる QTL (Yoshitsu *et al.*, 2017)、落花生の休眠性に関わる QTL の同定などに利用され (Kumar *et al.*, 2020)、様々な作物の分子育種への貢献が期待される。

自然変異遺伝子の単離・同定には、QTL 解析に加え、ゲノムワイド関連解析 (GWAS; Genome-wide Association Study) が用いられるようになってきた。GWAS は、特定の生物種において、多数の野生株・品種や系統の全ゲノム配列を解読・比較し、形質と連鎖する DNA 多型を統計的に検出する手法である。このため、QTL 解析では2系統間の形質の違いに影響する QTL が検出されるが、GWAS では多数の系統に共通に存在する自然変異が検出される。シロイヌナズナは西ユーラシア大陸原産であるとされ、北半球を中心に、ヨーロッパ、アジア、アフリカ、アメリカ、オーストラリアと広い分布を示す (Krämer, 2015)。このため、それぞれの環境での適応に関わる自然変異が蓄積していると考えられる。シロイヌナズナの種子休眠性の GWAS では、ヒストン脱アセチル化酵素をコードする *HD2B* が同定され、クロマチン再編が休

眠の制御に重要な役割を持つことを示した (Yano *et al.*, 2013)。最近, 日本のイネ (ジャポニカ) 品種, 164種の全ゲノム配列を利用した GWAS が行われ, 発芽の適温 (30°C) で発芽を促進する遺伝子, *GF14h* が見出された (Yoshida *et al.*, 2022)。*GF14h* は14-3-3 ファミリータンパク質をコードし, アブシシン酸作用を抑制的に制御することにより発芽を促進していることが示めされた。面白いことに, 在来品種や1990年以前の古い品種では機能的な *GF14h* を持つ割合が1割から2割程度を占めるものの, 現在栽培されている品種は機能的な *GF14h* をほとんど持っていない。このことは, 日本のイネは発芽しにくい品種の選抜が行われてきた可能性を示唆し, 穂発芽耐性を持つ品種育成の結果であると考えられている。

## 8. 休眠・発芽の分子メカニズムの理解における展望

突然変異の責任遺伝子同定を目的とした研究において, マッピングシステムの作成, DNA マーカーを利用した詳細な連鎖解析は, 時間と労力のかかる律速段階となっていた。PCR 法の開発, イネやシロイヌナズナのゲノム配列解読は, 高密度の分子マーカーと連鎖解析のスピードアップをもたらしたが, 異なる遺伝的背景を持つ遠縁系統との交配を必要とする従来のマッピング法では, 両親間の自然変異にマスクされ, 突然変異の同定を諦めざるを得ない場面にしばしば遭遇した。NGS の開発と発展, そしてハイオインフォマティクスの発展は, MutMap 法などによる迅速な変異遺伝子同定をもたらした, これまで解析を諦めていた変異の同定が加速されるであろう。特に, 種子の休眠・発芽は多数の遺伝子が関わる量的形質であり, 突然変異の同定には MutMap 法の発想が大変有効と考えられる。QTL-seq は, 従来の分子マーカーを用いたマッピングに代わり, 比較的速やかに, かつ高精度な QTL 領域の同定を可能としている。迅速なゲノム配列の解析は植物種を問わず, 突然変異同定や QTL 検出のハードルを着実に低下させ, 基礎的なメカニズム解明や DNA マーカーを利用した育種選抜 (MAS: Marker assisted selection) への利用が加速度的に進行しつつ

ある。ただし, QTL-seq 法のみを用いた責任遺伝子の同定はコストがかかるため, 従来の分子マーカーを用いた詳細なマッピングとの組み合わせが有効であろう。この場合でも, 両親のゲノム配列から分子マーカーを設計することにより, 以前よりも迅速な遺伝子同定が可能となっている。

休眠・発芽の制御に関わる遺伝子は, 穀類やシロイヌナズナなど, 複数の植物種で単離同定が進んでいるが, 種を越えた普遍性や多様性の理解は一部の遺伝子に留まっている。今後も様々な植物種において, 未知の休眠・発芽関連遺伝子が見いだされると期待されるが, これらの遺伝子がどのような生理機能を持ち, どのようなメカニズムで休眠・発芽を制御しているかを解明するには, 種間の共通性や特異性を踏まえつつ, 分子遺伝学的解析が容易なシロイヌナズナなどの植物種を利用することが必要であろう。穀類に代表されるように, 種子そのものが主要な農産物であり, 作物生産の出発点でもある。この意味では, 種子の品質が作物生産の鍵を握ると言っても過言ではない。種子の休眠と発芽は遺伝的な制御を受けると共に, 環境要因に強く影響される形質である。このため, 休眠と発芽の分子メカニズムの解明は, 基礎科学のみならず, 気候変動に対応した作物生産にとっても, 大変重要な意味を持つと考えている。

## 引用文献

- Abe A, Kosugi S, Yoshida K, Natsume S, Takagi H, Kanzaki H, Matsumura H, Yoshida K, Mitsuoka C, Tamiru M, Innan H, Cano L, Kamoun S, Terauchi R. (2012) Genome sequencing reveals agronomically important loci in rice using MutMap. *Nature Biotechnology* **30**, 174-178.
- Ahmad S, Khulbe RK, Roy D. (2014) Evaluation of mungbean (*Vigna radiata*) germplasm for pre-harvest sprouting tolerance. *Legume Research* **37**, 259.
- Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ, Kim CJ, Chen H, Shinn P, Stevenson DK, Zimmerman J, Barajas P, Cheuk R, Gadrinab C, Heller C, Jeske A, Koesema E, Meyers CC, Parker H, Prednis L, Ansari Y, Choy N, Deen H, Geralt M, Hazari N, Hom E, Karnes M, Mulholland C, Ndubaku R, Schmidt I, Guzman P, Aguilar-Henonin L, Schmid M, Weigel D, Carter DE, Marchand T, Risseuw E, Brogden D, Zeko A, Crosby WL, Berry CC, Ecker JR. (2003) Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **301**, 653-657.
- Alonso-Blanco C, Bentsink L, Hanhart CJ, Blankestijn-de Vries

- H, Koornneef M. (2003) Analysis of natural allelic variation at seed dormancy loci of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **164**, 711–729.
- Amiguet-Vercher A, Santuari L, Gonzalez-Guzman M, Depuydt S, Rodriguez PL, Hardtke CS. (2015) The *IBO* germination quantitative trait locus encodes a phosphatase 2C-related variant with a nonsynonymous amino acid change that interferes with abscisic acid signaling. *The New Phytologist* **205**, 1076–1082.
- Arabidopsis Genome Initiative. (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**, 796–815.
- Barrero JM, Cavanagh C, Verbyla KL, Tibbits JFG, Verbyla AP, Huang BE, Rosewarne GM, Stephen S, Wang P, Whan A, Rigault P, Hayden MJ, Gubler F. (2015) Transcriptomic analysis of wheat near-isogenic lines identifies *PM19-A1* and *A2* as candidates for a major dormancy QTL. *Genome Biology* **16**, 93.
- Barrero JM, Dorr MM, Talbot MJ, Ishikawa S, Umezawa T, White RG, Gubler F. (2019) A role for *PM19-Like 1* in seed dormancy in *Arabidopsis*. *Seed Science Research* **29**, 184–196.
- Baskin CC, Baskin JM. *Seeds: Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination* (Second Edition). Academic Press. 2014
- Bentsink L, Hanson J, Hanhart CJ, Blankestijn-de Vries H, Coltrane C, Keizer P, El-Lithy M, Alonso-Blanco C, de Andrés MT, Reymond M, van Eeuwijk F, Smeekens S, Koornneef M. (2010) Natural variation for seed dormancy in *Arabidopsis* is regulated by additive genetic and molecular pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 4264–4269.
- Bentsink L, Jowett J, Hanhart CJ, Koornneef M. (2006) Cloning of *DOG1*, a quantitative trait locus controlling seed dormancy in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 17042–17047.
- Bewley JD. (1997) *Seed Germination and Dormancy*. *The Plant Cell* **9**, 1055–1066.
- Cantoro R, Fernández LG, Cervigni GDL, Rodríguez MV, Gioco JO, Paniago N, Heinz RA, Benech-Arnold RL. (2016) Seed dormancy QTL identification across a Sorghum bicolor segregating population. *Euphytica* **211**, 41–56.
- Cao H, Han Y, Li J, Ding M, Li Y, Li X, Chen F, Soppe WJ, Liu Y. (2020) *Arabidopsis thaliana* SEED DORMANCY 4-LIKE regulates dormancy and germination by mediating the gibberellin pathway. *Journal of Experimental Botany* **71**, 919–933.
- Cota-Sánchez JH, Abreu DD. (2007) Vivipary and offspring survival in the epiphytic cactus *Epiphyllum phyllanthus* (Cactaceae). *Journal of Experimental Botany* **58**, 3865–3873.
- Danquah A, de Zelicourt A, Boudsocq M, Neubauer J, Frei dit Frey N, Leonhardt N, Pateyron S, Gwinner F, Tamby JP, Ortiz-Masia D, Marcote MJ, Hirt H, Colcombet J. (2015) Identification and characterization of an ABA-activated MAP kinase cascade in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **82**, 232–244.
- Duff SMG, Rydel TJ, McClerren AL, Zhang W, Li JY, Sturman EJ, Halls C, Chen S, Zeng J, Peng J, Kretzler CN, Evdokimov A. (2012) The enzymology of alanine aminotransferase (AlaAT) isoforms from *Hordeum vulgare* and other organisms, and the HvAlaAT crystal structure. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **528**, 90–101.
- Fang J, Chu C. (2008) Abscisic acid and the pre-harvest sprouting in cereals. *Plant Signaling & Behavior* **3**, 1046–1048.
- Fekih R, Takagi H, Tamiru M, Abe A, Natsume S, Yaegashi H, Sharma S, Sharma S, Kanzaki H, Matsumura H, Saitoh H, Mitsuoka C, Utsushi H, Uemura A, Kanzaki E, Kosugi S, Yoshida K, Cano L, Kamoun S, Terauchi R. (2013) MutMap<sup>+</sup>: genetic mapping and mutant identification without crossing in rice. *PLOS ONE* **8**, e68529.
- Footitt S, Walley PG, Lynn JR, Hambidge AJ, Penfield S, Finch-Savage WE. (2020) Trait analysis reveals *DOG1* determines initial depth of seed dormancy, but not changes during dormancy cycling that result in seedling emergence timing. *The New Phytologist* **225**, 2035–2047.
- Fujino K, Sekiguchi H, Sato T, Kiuchi H, Nonoue Y, Takeuchi Y, Ando T, Lin SY, Yano M. (2004) Mapping of quantitative trait loci controlling low-temperature germinability in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and applied genetics* **108**, 794–799.
- Gao X, Hu CH, Li HZ, Yao YJ, Li XY. (2013) Factors affecting pre-harvest sprouting resistance in wheat (*Triticum aestivum* L.): A review. *The Journal of Animal and Plant Sciences* **23**, 556–565.
- Gong X, Li C, Zhou M, Bonnardaux Y, Yan G. (2014) Seed dormancy in barley is dictated by genetics, environments and their interactions. *Euphytica* **197**, 355–368.
- Graeber K, Linkies A, Muller K, Wunchova A, Rott A, Leubner-Metzger G. (2010) Cross-species approaches to seed dormancy and germination: conservation and biodiversity of ABA-regulated mechanisms and the Brassicaceae *DOG1* genes. *Plant Molecular Biology* **73**, 67–87.
- Graeber K, Linkies A, Steinbrecher T, Mummenhoff K, Tarkowská D, Turečková V, Ignatz M, Sperber K, Voegele A, de Jong H, Urbanová T, Strnad M, Leubner-Metzger G. (2014) *DELAY OF GERMINATION 1* mediates a conserved coat-dormancy mechanism for the temperature- and gibberellin-dependent control of seed germination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**, E3571–E3580.
- Graeber K, Linkies A, Wood ATA, Leubner-Metzger G. (2011) A guideline to family-wide comparative state-of-the-art quantitative RT-PCR analysis exemplified with a Brassicaceae cross-species seed germination case study. *The Plant Cell* **23**, 2045–2063.
- Huang Y, Song J, Hao Q, Mou C, Wu H, Zhang F, Zhu Z, Wang P, Ma T, Fu K, Chen Y, Nguyen T, Liu S, Jiang L, Wan J. (2023) WEAK SEED DORMANCY 1, an aminotransferase protein, regulates seed dormancy in rice through the GA and ABA pathways. *Plant Physiology and Biochemistry* **202**, 107923.
- Hugo Cota-Sánchez J. (2018) Precocious germination (vivipary) in tomato: A link to economic loss? *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences* **88**, 1443–1451.

- Ichimura K, Shinozaki K, Tena G, Sheen J, Henry Y, Champion A, Kreis M, Zhang S, Hirt H, Wilson C, Heberle-Bors E, Ellis BE, Morris PC, Innes RW, Ecker JR, Scheel D, Klessig DF, Machida Y, Mundy J, Ohashi Y, Walker JC. (2002) Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends in Plant Science* **7**, 301–308.
- Ito T, Motohashi R, Kuromori T, Mizukado S, Sakurai T, Kanahara H, Seki M, Shinozaki K. (2002) A new resource of locally transposed Dissociation elements for screening gene-knockout lines in silico on the Arabidopsis genome. *Plant Physiology* **129**, 1695–1699.
- Karssen CM, Brinkhorst-van der Swan DL, Breekland AE, Koornneef M. (1983) Induction of dormancy during seed development by endogenous abscisic acid: studies on abscisic acid deficient genotypes of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Planta* **157**, 158–165.
- Keurentjes JJB, Bentsink L, Alonso-Blanco C, Hanhart CJ, Blankestijn-De Vries H, Effgen S, Vreugdenhil D, Koornneef M. (2007) Development of a near-isogenic line population of *Arabidopsis thaliana* and comparison of mapping power with a recombinant inbred line population. *Genetics* **175**, 891–905.
- Koike M, Takezawa D, Arakawa K, Yoshida S. (1997) Accumulation of 19-kDa plasma membrane polypeptide during induction of freezing tolerance in wheat suspension-cultured cells by abscisic acid. *Plant & Cell Physiology* **38**, 707–716.
- Koornneef M, Dellaert LW, van der Veen JH. (1982a) EMS- and radiation-induced mutation frequencies at individual loci in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Mutation Research* **93**, 109–123.
- Koornneef M, Jorna ML, Brinkhorst-van der Swan DL, Karssen CM. (1982b) The isolation of abscisic acid (ABA) deficient mutants by selection of induced revertants in non-germinating gibberellin sensitive lines of *Arabidopsis thaliana* (L.) heynh. *Theoretical and Applied Genetics*. **61**, 385–393.
- Krämer U. (2015) Planting molecular functions in an ecological context with *Arabidopsis thaliana*. *eLife* **4**.
- Kumar R, Janila P, Vishwakarma MK, Khan AW, Manohar SS, Gangurde SS, Variath MT, Shasidhar Y, Pandey MK, Varshney RK. (2020) Whole-genome resequencing-based QTL-seq identified candidate genes and molecular markers for fresh seed dormancy in groundnut. *Plant Biotechnology Journal* **18**, 992–1003.
- Ladizinsky G. *Plant Evolution under Domestication*. Springer Nature. 1998
- Laserna MP, Sánchez RA, Botto JF. (2008) Light-related loci controlling seed germination in *Ler* x *Cvi* and *Bay-0* x *Sha* recombinant inbred-line populations of *Arabidopsis thaliana*. *Annals of Botany* **102**, 631–642.
- Leon-Kloosterziel KM, van de Bunt GA, Zeevaart JAD, Koornneef M. (1996) Arabidopsis mutants with a reduced seed dormancy. *Plant Physiology* **110**, 233–240.
- Li P, Zhou H, Shi X, Yu B, Zhou Y, Chen S, Wang Y, Peng Y, Meyer RC, Smeekens SC, Teng S. 2014. The *ABI4*-Induced Arabidopsis *ANAC060* Transcription Factor Attenuates ABA Signaling and Renders Seedlings Sugar Insensitive when Present in the Nucleus. *PLOS Genetics* **10**, e1004213.
- Li X, Chen T, Li Y, Wang Z, Cao H, Chen F, Li Y, Soppe WJ, Li W, Liu Y. (2019) ETR1/RDO3 regulates seed dormancy by relieving the inhibitory effect of the ERF12–TPL complex on *DELAY OF GERMINATION1* expression. *The Plant Cell* **31**, 832–847.
- Liu Y, Geyer R, van Zanten M, Carles A, Li Y, Horold A, van Nocker S, Soppe WJJ. (2011) Identification of the *Arabidopsis REDUCED DORMANCY 2* gene uncovers a role for the polymerase associated factor 1 complex in seed dormancy. *PLOS ONE* **6**, e22241.
- Liu Y, Koornneef M, Soppe WJJ. (2007) The absence of histone H2B monoubiquitination in the Arabidopsis *hub1* (*rdo4*) mutant reveals a role for chromatin remodeling in seed dormancy. *The Plant Cell* **19**, 433–444.
- Mao X, Zhang J, Liu W, Yan S, Liu Q, Fu H, Zhao J, Huang W, Dong J, Zhang S, Yang T, Yang W, Liu B, Wang F. (2019) The MKKK62–MKK3–MAPK7/14 module negatively regulates seed dormancy in rice. *Rice* **12**, 2.
- Matsuoka D, Yasufuku T, Furuya T, Nanmori T. (2015) An abscisic acid inducible *Arabidopsis* MAPKKK, *MAPKKK18* regulates leaf senescence via its kinase activity. *Plant Molecular Biology* **87**, 565–575.
- McCarty DR, Hattori T, Carson CB, Vasil V, Lazar M, Vasil IK. (1991) The *Viviparous-1* developmental gene of maize encodes a novel transcriptional activator. *Cell* **66**, 895–905.
- Meinke DW, Franzmann LH, Nickle TC, Yeung EC. (1994) Leafy cotyledon mutants of Arabidopsis. *The Plant Cell* **6**, 1049–1064.
- Mizuno Y, Yamanouchi U, Hoshino T, Nonoue Y, Nagata K, Fukuoka S, Ando T, Yano M, Sugimoto K. (2018) Genetic dissection of pre-harvest sprouting resistance in an upland rice cultivar. *Breeding Science* **68**, 200–209.
- Nakabayashi K, Bartsch M, Xiang Y, Miatton E, Pellengahr S, Yano R, Seo M, Soppe WJJ. (2012) The time required for dormancy release in *Arabidopsis* is determined by *DELAY OF GERMINATION1* protein levels in freshly harvested seeds. *The Plant Cell* **24**, 2826–2838.
- Nakamura S, Abe F, Kawahigashi H, Nakazono K, Tagiri A, Matsumoto T, Utsugi S, Ogawa T, Handa H, Ishida H, Mori M, Kawaura K, Ogihara Y, Miura H. (2011) A wheat homolog of *MOTHER OF FT AND TFL1* acts in the regulation of germination. *The Plant Cell* **23**, 3215–3229.
- Nakamura S, Pourkheirandish M, Morishige H, Kubo Y, Nakamura M, Ichimura K, Seo S, Kanamori H, Wu J, Ando T, Hensel G, Sameri M, Stein N, Sato K, Matsumoto T, Yano M, Komatsuda T. (2016) *Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 3* regulates seed dormancy in barley. *Current Biology* **26**, 775–781.
- Nee G, Kramer K, Nakabayashi K, Yuan B, Xiang Y, Miatton E, Finkemeier I, Soppe WJJ. (2017) *DELAY OF GERMINATION1* requires PP2C phosphatases of the ABA signalling pathway to control seed dormancy. *Nature Communications* **8**, 72.
- N’Gaza ALF, Kouassi KI, Koffi KK, Kouakou KL, Baudoin J-P, Zoro BIA. (2019) Prevalence and variation of viviparous germination with respect to fruit maturation in the bottle gourd *Lagenaria siceraria* (Molina) Standley (Cucurbitaceae). *Heliyon* **5**, e02584.
- Nishimura N, Tsuchiya W, Moresco JJ, Hayashi Y, Satoh K, Kaiwa N, Irisa T, Kinoshita T, Schroeder JL, Yates JR,

- Hirayama T, Yamazaki T. (2018) Control of seed dormancy and germination by DOG1-AHG1 PP2C phosphatase complex via binding to heme. *Nature Communications* **9**, 2132.
- Nonogaki H, Barrero JM, Li C. (2018) Editorial: Seed dormancy, germination, and pre-harvest sprouting. *Frontiers in Plant Science* **9**, 1783.
- Ochi Y, Ito T. (2012) Viviparous Sprouting of Melon Seed and Endogenous Abscisic Acid (ABA) Levels as Affected by Nitrate Nitrogen Fertilization. *Horticultural Research* **11**, 37–42.
- Peeters AJM, Blankestijn-De Vries H, Hanhart CJ, Leon-Kloosterziel KM, Zeevaart JAD, Koornneef M. (2002) Characterization of mutants with reduced seed dormancy at two novel *rdo* loci and a further characterization of *rdo1* and *rdo2* in *Arabidopsis*. *Physiologia Plantarum* **115**, 604–612.
- Santos DD, Yamaguchi M. (1979) Seed-sprouting in tomato fruits. *Scientia Horticulturae* **11**, 131–139.
- Saran PL, Choudhary R, Solanki IS, Kumar PR. (2014) New fruit and seed disorders in Papaya (*Carica papaya* L.) in India. *African Journal of Biotechnology* **13**, 574–580.
- Sato K, Yamane M, Yamaji N, Kanamori H, Tagiri A, Schwerdt JG, Fincher GB, Matsumoto T, Takeda K, Komatsuda T. (2016) Alanine aminotransferase controls seed dormancy in barley. *Nature Communications* **7**, 11625.
- Shorinola O, Balcárková B, Hyles J, Tibbits JFG, Hayden MJ, Holuřova K, Valárik M, Distelfeld A, Torada A, Barrero JM, Uauy C. (2017) Haplotype analysis of the pre-harvest sprouting resistance locus *Phs-A1* reveals a causal role of *TaMKK3-A* in global germplasm. *Frontiers in Plant Science* **8**, 1–14.
- Song S, He H, Gühl K, van Bolderen-Veldkamp M, Buijs G, Willems LAJ, Bentsink L. (2021) DELAY OF GERMINATION 6, encoding the ANAC060 transcription factor, inhibits seed dormancy. *bioRxiv* (preprint)
- Sugimoto K, Takeuchi Y, Ebana K, Miyao A, Hirochika H, Hara N, Ishiyama K, Kobayashi M, Ban Y, Hattori T, Yano M. (2010) Molecular cloning of *Sdr4*, a regulator involved in seed dormancy and domestication of rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 5792–5797.
- Tai L, Wang H-J, Xu X-J, Sun W-H, Ju L, Liu W-T, Li W-Q, Sun J, Chen K-M. (2021) Pre-harvest sprouting in cereals: genetic and biochemical mechanisms. *Journal of Experimental Botany* **72**, 2857–2876.
- Takagi H, Abe A, Yoshida K, Kosugi S, Natsume S, Mitsuoka C, Uemura A, Utsushi H, Tamiru M, Takuno S, Innan H, Cano LM, Kamoun S, Terauchi R. (2013a) QTL-seq: rapid mapping of quantitative trait loci in rice by whole genome resequencing of DNA from two bulked populations. *The Plant Journal* **74**, 174–183.
- Takagi H, Uemura A, Yaegashi H, Tamiru M, Abe A, Mitsuoka C, Utsushi H, Natsume S, Kanzaki H, Matsumura H, Saitoh H, Yoshida K, Cano LM, Kamoun S, Terauchi R. (2013b) MutMap-Gap: whole-genome resequencing of mutant F<sub>2</sub> progeny bulk combined with *de novo* assembly of gap regions identifies the rice blast resistance gene *Pii*. *The New Phytologist* **200**, 276–283.
- Tamura N, Yoshida T, Tanaka A, Sasaki R, Bando A, Toh S, Lepiniec L, Kawakami N. (2006) Isolation and characterization of high temperature-resistant germination mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant & Cell Physiology* **47**, 1081–1094.
- Torada A, Koike M, Ogawa T, Takenouchi Y, Tadamura K, Wu J, Matsumoto T, Kawaura K, Ogihara Y. (2016) A causal gene for seed dormancy on wheat chromosome 4A encodes a MAP kinase kinase. *Current Biology* **26**, 782–787.
- van Der Schaar W, Alonso-Blanco C, Léon-Kloosterziel KM, Jansen RC, van Ooijen JW, Koornneef M. (1997) QTL analysis of seed dormancy in *Arabidopsis* using recombinant inbred lines and MQM mapping. *Heredity* **79**, 190–200.
- Wang C, Hao N, Xia Y, Du Y, Huang K, Wu T. (2021) CsKDO is a candidate gene regulating seed germination lethality in cucumber. *Breeding Science* **71**, 417–425.
- Wang Q, Lin Q, Wu T, Duan E, Huang Y, Yang C, Mou C, Lan J, Zhou C, Xie K, Liu X, Zhang X, Guo X, Wang J, Jiang L, Wan J. (2020) *OsDOGIL-3* regulates seed dormancy through the abscisic acid pathway in rice. *Plant Science* **298**, 110570.
- Wetterstrand KA (2023) DNA sequencing costs: Data. <https://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/DNA-Sequencing-Costs-Data>.
- Xiang Y, Nakabayashi K, Ding J, He F, Bentsink L, Soppe WJJ. (2014) *Reduced Dormancy5* encodes a protein phosphatase 2C that is required for seed dormancy in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **26**, 4362–4375.
- Xiang Y, Song B, Née G, Kramer K, Finkemeier I, Soppe WJJ. (2016) Sequence polymorphisms at the *REDUCED DORMANCY5* pseudophosphatase underlie natural variation in *Arabidopsis* dormancy. *Plant Physiology* **171**, 2659–2670.
- Yano R, Takebayashi Y, Nambara E, Kamiya Y, Seo M. (2013) Combining association mapping and transcriptomics identify *HD2B* histone deacetylase as a genetic factor associated with seed dormancy in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **74**, 815–828.
- Yao L, Cheng X, Gu Z, Huang W, Li S, Wang L, Wang Y-F, Xu P, Ma H, Ge X. (2018) The AWP19 family protein OsPM1 mediates abscisic acid influx and drought response in rice. *The Plant Cell* **30**, 1258–1276.
- Yoshida H, Hirano K, Yano K, Wang F, Mori M, Kawamura M, Koketsu E, Hattori M, Ordonio RL, Huang P, Yamamoto E, Matsuoka M. (2022) Genome-wide association study identifies a gene responsible for temperature-dependent rice germination. *Nature Communications* **13**, 5665.
- Yoshitsu Y, Takakusagi M, Abe A, Takagi H, Uemura A, Yaegashi H, Terauchi R, Takahata Y, Hatakeyama K, Yokoi S. (2017) QTL-seq analysis identifies two genomic regions determining the heading date of foxtail millet, *Setaria italica* (L.) P.Beauv. *Breeding Science* **67**, 518–527.
- Yu B, Wang Y, Zhou H, Li P, Liu C, Chen S, Peng Y, Zhang Y, Teng S. (2020) Genome-wide binding analysis reveals that ANAC060 directly represses sugar-induced transcription of *ABI5* in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **103**, 965–979.
- Zheng L, Otani M, Kanno Y, Seo M, Yoshitake Y, Yoshimoto K, Sugimoto K, Kawakami N. (2022) Seed dormancy 4 like1 of *Arabidopsis* is a key regulator of phase transition from embryo to vegetative development. *The Plant Journal* **112**, 460–475.