

アオウキクサの花成から考える 光周性の局所適応と概日時計周期の関係

村中 智明

名古屋大学 生命農学研究科
〒464-0804 愛知県名古屋市千種区不老町

Flowering of *Lemna aquinoctialis* and its insight into relationship between local adaptation of photoperiodism and circadian period

Tomoaki Muranaka

Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University
Furo-cho, Chikusa-ku, Aichi, 464-8601, Japan

Keywords: Photoperiodism, Circadian clock, Lemna, Local adaptation, Flowering

DOI: 10.24480/bsj-review.14c4.00251

1. はじめに

1-1. 開花期は魔法形質？

種子植物は花をつけて、受粉し、種子を散布し、次世代に命をつなげる。開花期はいつでも良いわけではなく、生育環境によって避けるべき時期がある。たとえば、繁殖器官は活発に細胞分裂するため低温や霜によるダメージを受けやすく、低温期を避ける必要がある。また、他殖を行う場合は、集団内の個体と開花期を合わせる必要がある。さらに、送粉を昆虫など他の生物に依存する場合は、それらの生物の活動期に対しても開花期を合わせる必要がある。このように開花期は生育環境から様々な制約を受け、局所適応の結果、しばしば大きな種内変異を示す (Ågren et al 2017; Kooyers et al 2015)。開花期が異なる集団間では、生殖隔離が生じやすく、遺伝的交流が減少し、開花期以外の形質も遺伝的浮動などで多様化していくことが想像できる。このように、開花期は種分化とも密接にかかわる形質である。進化生態学では、適応と生殖隔離の両方にかかわる形質をその重要性から「魔法形質」と呼ぶが、開花期もそう呼ばれる資格を持つように思われる (Servedio et al. 2011)。

1-2. 花成時期多様化の分子機構

では、開花期はどのように多様化するのか。花成制御に関わる遺伝子に自然変異が入り多様化するのであろう。そして、花成制御のパスウェイは光周性、春化、ストレス、体サイズなど非常に多彩であり、著者も全体像を把握できていない (Bratzel and Turck 2015)。生物種ごとに花成時期を決定する主要パスウェイも異なり、多様化を引き起こす遺伝子も異なる可能性が高い。開花時期に関して、シロイヌナズナの自然系統間比較では、春化経路の遺伝子の変異が検出される一方で、ダイズの品種間比較では光周性関連（おもに光入力と概日時計）の遺伝子が検出される (Ågren et al 2017; Lin et al. 2021)。また、短日植物のダイズでは、長日で誘導され花成を抑制する B3 ドメイン型転写因子である *E1* 遺伝子の変異により開花期が

最大 20 日変化することが報告されているが、*E1* 遺伝子と相同な遺伝子はシロイヌナズナでもイネでも見つかっていない (Xia et al. 2012)。

パスウェイの多様性とは対称的に、花成のマスターレギュレーターである *FT* 遺伝子が種子植物で広く保存されている点は重要である。大抵の植物はゲノム上に *FT* ファミリーに属する遺伝子を多数持つので、どの遺伝子が開花に関わるかを決定することが、花成時期多様化の分子基盤に迫る第一歩であろう (Moraes et al. 2019)。

ここでは花成時期について議論したが、サクラを代表として、花成後のつぼみが冬季に休眠し、春先に開花する植物も多い。この場合は、花成とは異なる遺伝子群が開花期を制御しているはずだ。サクラ属では、*SVP* クレードに属する *MADS-box* 遺伝子である *DAM* 遺伝子群が花芽の休眠期に高発現を維持することが報告されているが、ウメの *DAM6* をリンゴやポプラで過剰発現させると成長および萌芽が抑制されるため、花芽休眠の分子機構は広く保存されている可能性もある (山根 2020)。今後の研究が注目される。

2. アオウキクサの花成

2-1. 光周性のモデルとしてのアオウキクサ属

上記のように花成時期の多様化を理解することは一筋縄ではいかないが、ここでは著者が行ったアオウキクサでの研究例を紹介する。アオウキクサは日本全国の水田に生育するサトイモ科ウキクサ亜科アオウキクサ属の植物である。何故そんなマニアックな植物で研究を、と感じる読者もいるかもしれないが、アオウキクサ属は光周性花成のモデルとして長い歴史を持つ。まずウキクサ植物は小型であり、クローン増殖で増えるので、系統の維持が簡単である。また次亜塩素酸水溶液で植物体を処理することで滅菌でき、無機培地で育てることで再現性の高い生理学実験が可能となる (図 1)。さらに、アオウキクサ属 (*Lemna*) には、長日植物のイボウキクサ (*L. gibba*) と短日植物のアオウキクサ (*L. aequinoctialis*) が存在し、両種とも日長のみで花成を誘導できる (Clerand and Briggs 1967; Hillman 1959)。日長処理後 1 週間程度で分化した花芽が確認できるため実験サイクルも短い。このような特性を活かして、光周性の生理学的な解析が進められた (Hillman 1976)。日本では、光周性花成の解析に取り組んだ太田行人先生から (太田 1987)、電解質の取り込みを指標に概日リズムの解析を

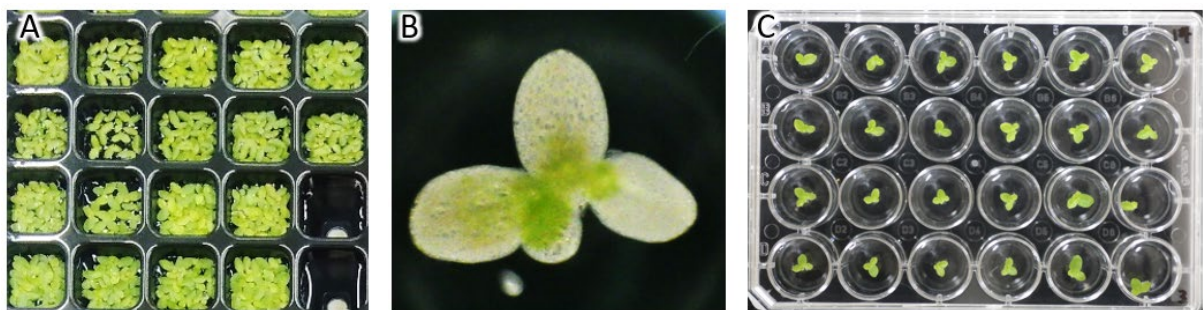


図 1. 著者の保有するアオウキクサ系統群

A: 2 cm 四方のスペースで 1 ~ 2 ヶ月間なら問題なく生育する。B: 次亜塩素酸水溶液 (5%ハイター) で数分間処理されたアオウキクサ。植物体内にある分裂組織は生き残っており、そこから新たな葉状体 (フロンド) が発生する。C: 日長処理用に 24-well プレートに移された滅菌済みのアオウキクサ系統。

進めた近藤孝男先生へ (Kondo and Tsudzuki 1978), さらに概日時計の分子生物学に取り組んだ小山時隆先生へと研究が発展してきた (Serikawa et al. 2008)。小山先生は著者の指導教員であり, 著者は上記の系譜に連なるともいえる (Muranaka and Oyama 2016)。一方で, アサガオでのフロリゲン研究で有名な瀧本敦先生もアオウキクサの研究をされていた。ウキクサ植物は液体培地で生育するため化合物の吸収もよく, フロリゲン候補物質の試験材料として利用されていたが, 日本全国からアオウキクサ系統を収集され生態・多様性の解析も進められていた (Beppu and Takimoto 1981a, b)。とくに, アオウキクサの限界日長を実験条件で厳密に決定し, 緯度ラインを報告したことは重要である (Beppu and Takimoto 1981c; Yukawa and Takimoto 1976)。一般に短日植物は冬の到来前に花をつけ種子で越冬するため, 高緯度ほど開花期が早くなり, 限界日長が長くなる。ただ, 実際に野外系統で限界日長を決定して緯度ラインを実証した例は限られており, 著者が調べた限りでは, 1960年代のオナモミやアサガオの仕事しか把握できていない (Imamura et al. 1966; Ray and Alexander 1966)。日本産アオウキクサに限界日長の緯度ラインがあるという報告を知り, 著者はアオウキクサを対象とした限界日長多様化の研究を開始した。

2-2. 日本産アオウキクサの生活史

日本のアオウキクサは水田環境に特化した一年草としての生活史を持つ (図2)。田植え期に水が張られると種子から発芽する。その後はクローン成長による分裂を繰り返し, 水田全体を覆うと思いきや, 大雨で水路に流出したり, 中干しによる乾燥で枯死したりしつつ, また分裂して増えていく。日長が短くなると開花し, 主に自家受粉により結実する。種子は実験室条件での観察では開花後3週間程度で成熟し, 水底に沈む。



図2. 水田環境でのアオウキクサ

ウキクサ植物が属するサトイモ科の植物では雌性先熟が普通であるが, アオウキクサでは雄しべが, 雌しべに先んじて伸長することで効率的に自家受粉を行うようである (Yoshida et al. 2021)。そして, もう1つの雄しべが雌しべの後に伸長する (図3A)。近縁のイボウキクサでは雌しべの後に2本の雄しべが伸長する。かつては雄花2つと雌花1つからなる花序と考えられていたが, サトイモ科基部の植物と同じく, 両性花とするのが妥当だと思われる。柱頭は盃状であり, 液滴 (droplet) が分泌される (図3B)。液滴はウキクサ植物全体にみられ, 受粉を補助するという記述が散見されるが, 著者は検証例を把握していない。ミジンコウキクサの一種 (*Wolffia lingulata*) では液滴にショ糖が含まれるとの報告がある (Eskuche and Romero 1982)。花粉も付着散布に適しているように見え, 水上徘徊性の昆虫に付着しているとの報告もあるが, 送粉の研究は進んでいない。

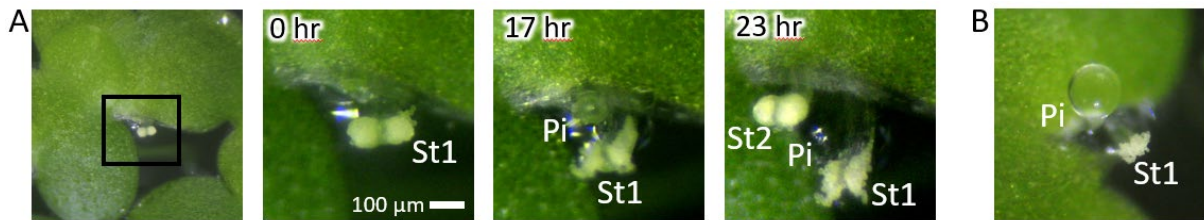


図3. 実験室での短日処理により誘導したアオウキクサの花

A: 開花の様子。B: 柱頭に液滴が分泌された状態。

2-3. アオウキクサの学名

ここでアオウキクサの学名について補足しておく。生理実験の基準系統として、ウキクサ研究の大家 Elias Landolt がカリフォルニアで採取した 6746 株が国際的に用いられてきた。この株の学名は *L. perpusilla* や *L. paucicostata* とされてきたが、現在では *L. aequinoctialis* が用いられ、*L. perpusilla* は北米中東部に分布するチビウキクサの学名となっている。学名の変遷は別府敏夫先生が詳しくまとめており、さらに、日本のアオウキクサを 2 種と 1 亜種に分割することも提案されている (別府ら 1985)。別府らは、九州以南に分布する常緑越冬型の系統群をナンゴクアオウキクサとし、これを *L. aequinoctialis* とした。そして、日本に広く分布する種子越冬型のアオウキクサを *L. aoukikusa* とし、北陸地方にのみ分布し沈水越冬を行う系統群を亜種 *L. aoukikusa* subsp. *hokurikuensis* とし、ホクリクアオウキクサの和名を与えている。しかしながら、この学名は国内の図鑑では採用されているものの、国際的には認められていない現状がある (Bog et al. 2020)。そのため、本稿ではホクリク、ナンゴクの区別なく *L. aequinoctialis* とした。一方で、国内に種子越冬型と常緑越冬型のアオウキクサが存在するのは事実であり、分子系統解析を含めた再検討が待たれる。

ウキクサ植物全体の資料として、2 冊のモノグラフが出版されている (Landolt 1986; Landolt and Kandeler 1987)。合わせて 1200 ページ以上の大著であるが、無料で公開されており、引用文献リストの DOI からアクセスできる。

3. アオウキクサの限界日長多様性とその分子機構

3-1. 限界日長の局所適応

アオウキクサの限界日長の緯度クラインの論文を見つけてから、著者は全国のアオウキクサの収集を開始した。収集した中から 72 系統の限界日長を決定したところ、11.6~14.2 時間の多様性を示した (図 4) (Muranaka et al. 2022)。北緯 44 度の北海道集団は限界日長が長い早咲きの傾向、北緯 32 度の鹿児島集団は限界日長が短い遅咲きの傾向がみられた。この限界日長シフトは緯度依存的に早まる冬の訪れへの適応と考えられる。北緯 35 度の兵庫集団の限界日長は北海道と鹿児島の間程度であったが、同じ 35 度帯の滋賀集団では北海道よりも限界日長が長い傾向がみられた。実は、兵庫と滋賀の採取地の水田では、栽培しているイネ品種が異なり、兵庫では山田錦、滋賀ではコシヒカリを栽培している。コシヒカリの収穫時期が 8 月末と早いことが、滋賀系統の長い限界日長 (早咲き) と関連する可能性がある。このように、アオウキクサの限界日長は、単純な緯度ラインに加え局所的な水田環境に応じ

て多様化しているようである。図 4C の 4 集団は、それぞれ半径 2 km 以内の水田から採取したものであるが、集団内の多様性が大きかった。これはアオウキクサが水鳥に付着して分散しやすく、地理的分化が弱いためかもしれない。イネ品種の改良や乾田化はこの 50 年ほどに進んだものであり、滋賀の早咲き形質は最近に獲得されたと考えられる。この急速な局所適応プロセスを理解するためには、早咲き系統が地域ごとに独立に進化したのか、高い分散力で置き換わったのかを、系統地理学的な解析により検証する必要がある。

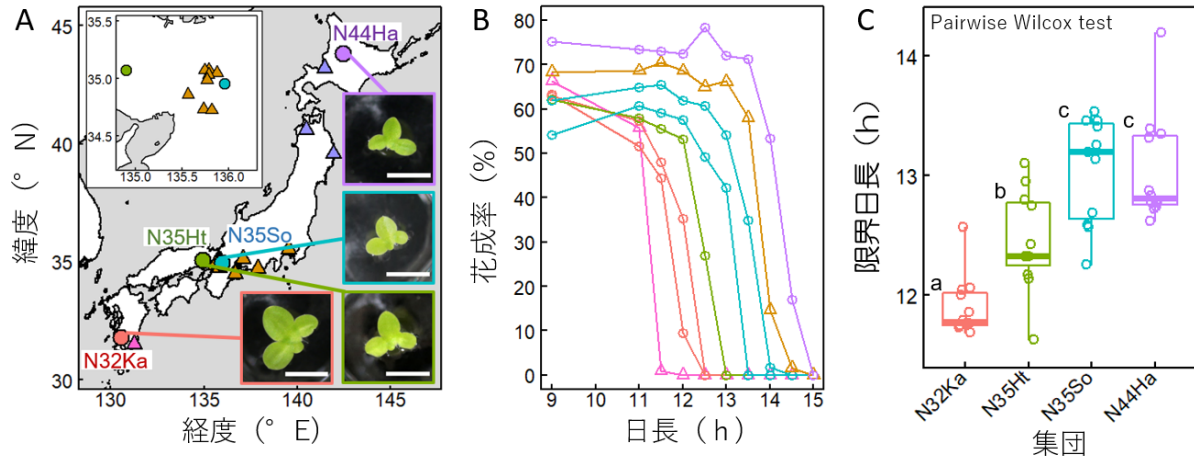


図 4. アオウキクサの限界日長多様性

A: アオウキクサの採取地点。●は 11~12 系統, ▲は 1~3 系統を採取した地点。B: 日長応答の多様性。15 時間日長から各日長に移して 1 週間後の花成率。C: 限界日長の箱ひげ図。限界日長は最大花成率の 50% となる日長とした。プロットの色はパネル間で統一されている。

3-2. 限界日長決定の分子機構

限界日長の多様化を理解するには、限界日長を決定する分子機構を明らかとする必要がある。そこで、RNA-seq による解析を行った。分子実験に際しては、京都大学の圃場で採取されたアオウキクサを純系化した Nd 株 (登録番号: RDSC5356) を用いた。異なる日長での日周トランスクリプトームを取得し、*de novo* アセンブルにより花成経路の遺伝子を同定し、発現パターンの解析を行った。その結果、夜の後半で発現誘導される *FT* ホモログ *LaFTh1* が同定された (図 5)。夜が長い = 日長が短いほど発現が誘導されるため、*LaFTh1* が日長応答に重要だと考えられた。

LaFTh1 はトウモロコシやミナトカモジグサにおいて、短日で誘導される *FT* ホモログと同じクレードに入った (Meng et al. 2011; Qin et al. 2019)。単子葉類における短日誘導型の *FT* が 1 つのクレードを形成したことは、光周性の進化を考える上で興味深い。一方で、同じく短日で誘導されるイネやアサガオの *FT* ホモログは長日植物であるシロイヌナズナの *FT* と同じクレードであった (Hayama et al. 2003; Hayama et al. 2007)。アオウキクサにもこのクレードに入る *LaFTh2* と *LaFTh3* が検出されている。*LaFTh1* と *LaFTh3* (*LaFTL1*) が花成誘導能を持つことはシロイヌナズナでの過剰発現により確認されている (Muranaka et al. 2022; Yoshida et al. 2021)。*LaFTh3* も短日で発現はしていたが、*LaFTh1* に比べて発現量は高くなかった。

さらに、限界日長が異なるアオウキクサ系統で *LaFTh1* の発現パターンを定量 PCR で確認したところ、限界日長が長い (限界暗期が短い) 系統で *LaFTh1* の誘導時刻が早かった。さら

に, *LaFTh1* は長日条件で暗期を延長しただけですぐに誘導された。この点も 1 週間の日長処理で花芽が分化するアオウキクサの迅速な日長応答と整合する。これらの結果から *LaFTh1* の発現タイミングの制御が限界日長決定に重要だと示唆された。

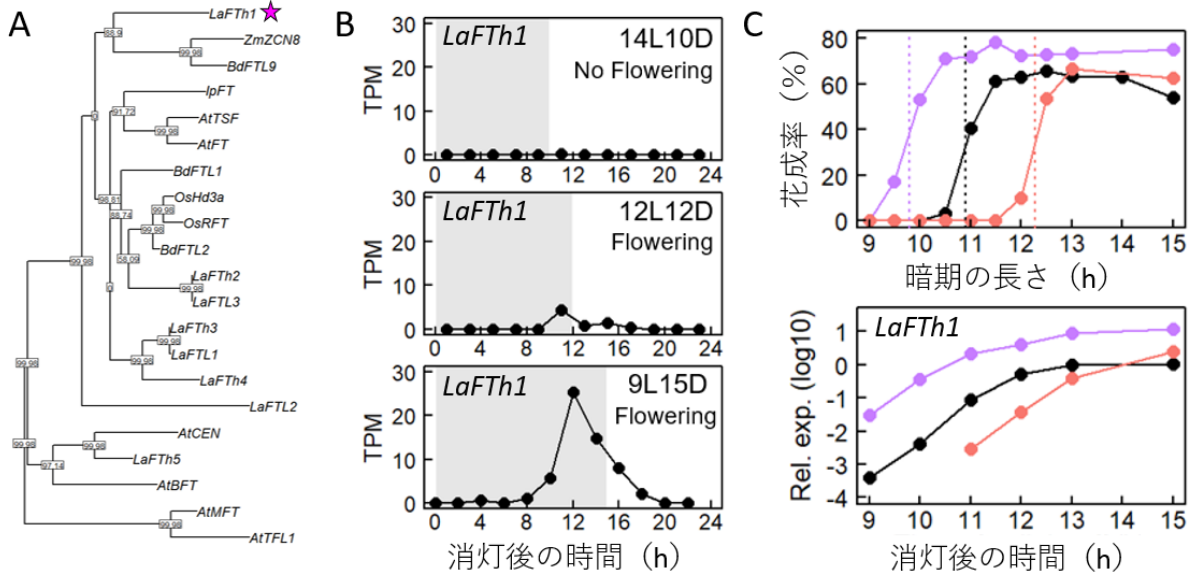


図5. 短日開花に関わる *LaFTh1*

A: アミノ酸全長を用いた PhyML 系統樹。La: アオウキクサ, Zm: トウモロコシ, Bd: ミナトカモジグサ, Ip: アサガオ, At: シロイヌナズナで, Os: イネ。B: RNA-seq の結果。平均値を表示している。C: 3 系統の花成率 (上) と *LaFTh1* の発現パターン。

3-3. 限界日長と概日リズム周期の関係

では何が *LaFTh1* の発現タイミングを決めるのだろうか。光周性の日長測定 of 基盤は概日時計である。シロイヌナズナでは時計遺伝子 *TOC1* の変異体では概日リズムが短周期化するが, 早咲きになることも知られている。これは, 短周期化により光周性経路の *CONSTANS* の発現タイミングが早まることに起因する (Yanovsky and Kay 2002)。一般に, 概日時計の制御を受ける遺伝子は, 概日リズムが短周期になる変異で発現が早まり (位相が前進), 逆に長周期になる変異で発現が遅くなる (位相が後退) 傾向がある。アオウキクサでの限界日長の多様性, つまり *LaFTh1* の発現タイミングの多様性と, 概日リズム周期の関係はどうだろうか。シロイヌナズナでは, 概日リズム周期は 20-28 時間程度の種内多様性を示す (Michael et al. 2013)。アオウキクサの概日リズム周期の多様性を調べるために, パーティクルボンバードメント法による発光レポーターの一過的導入を行った (Miwa et al. 2006; Muranaka et al. 2015)。朝方に発現する *CCA1* 遺伝子のシロイヌナズナのプロモーター領域にルシフェラーゼを繋いだ *AtCCA1::LUC+* を導入したところ, 15L9D の明暗条件において 72 系統すべてで発光の明瞭な日周変動が観察された (図 6)。明暗条件で 2 日間測定した後に, 連続明条件で 4 日間測定したところ, 65 系統で明瞭な概日リズムが観察でき, 周期は 20~27 時間の多様性を示した。明暗条件での発光ピーク時刻と概日リズム周期は正の相関を示した。さらに, 限界日長と概日リズム周期は負の相関を示した。これは, 短周期の系統では *LaFTh1* の発現タイミングが早まり, 短い暗期 (長い明期) でも開花すると考えると理解でき, 概日リズム周

期の多様性が、限界日長の多様性の一因であることを示唆する結果である (Muranaka et al. 2022)。一方でアオウキクサにおいて、概日時計が *LaFTh1* の発現を制御するパスウェイは不明であり、分子機構の解明を進める必要がある。

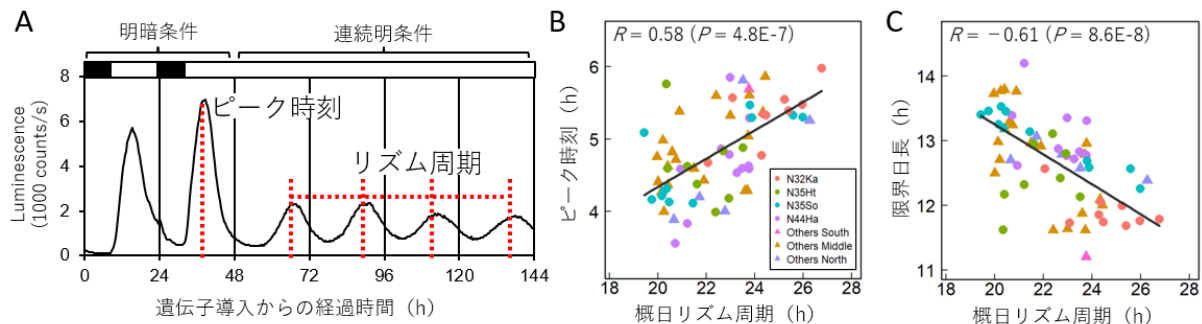


図6. 概日リズム周期と限界日長の関係

A: 発光リズムの例。遺伝子導入の翌日から発光する。B: ピーク時刻とリズム周期の相関。C: 限界日長とリズム周期の相関。

4. 概日リズム周期と局所適応の関係

1日の長さは24時間であるが、一般に概日時計の周期は20~28時間の多様性を示す。そのため、約1日という、概日の名がある。概日時計には外環境の周期に同調する能力があるため、昼夜環境では周期は24時間となる。そのため約24時間であれば問題ないという考えもある。一方で、シロイヌナズナの周期変異体では、概日時計の周期と外環境の周期が異なると生育が悪いという報告がある (Dodd et al. 2005)。短周期型では、夜間のデンプン消費が早まり、1日長い条件では夜明け前に飢餓状態になることが生育悪化の一因だと推定された (Graf et al. 2010)。このように生育を悪化させるリスクがあるのに、周期の多様性は自然界で維持されており、周期を24時間から逸脱させる淘汰圧が想定される。今回、アオウキクサで示された周期と限界日長の相関は、早咲きが有利な環境では、短周期系統が選択される可能性を示している。このような概日時計周期と局所適応の関係は、古くから想定されており実証研究も行われてきた。ショウジョウバエの一種 (*Drosophila subobscura*) ではスカンジナビアとカナリア諸島の個体で、羽化の時刻が異なり、概日リズム周期と羽化時刻が相関を示した (Lankinen 1993)。ドイツのクロウタドリ (*Turdus merula*) では、都市に生育する個体が森林に生育する個体よりも活動開始が早く、概日リズムが短周期であることが報告されている (Dominoni et al. 2013)。トマトの栽培品種は野生株より長周期であるが、これは高緯度の長日条件での生産性との関連が示唆されている (Müller et al. 2016)。アメリカの大豆品種では高緯度に適した品種では概日リズム周期が長い傾向が見られ、1年草のモンキーフラワーも同様に高緯度で長周期化する傾向が見られた (Greenham et al. 2017)。これらの例では高緯度ほど長周期化する傾向があり、アオウキクサとは逆である。これは局所適応の際にターゲットとなる遺伝子が異なり、その位相の前進、後退に対応して周期変化が逆転するためと考えている。さらに、ターゲット遺伝子が複数の可能性も高く、周期と局所適応の関係は生物種や適応プロセスに応じて非常に複雑だと思われる。多年草のモンキーフラワーでは、1年草と異なり周期と緯度に相関は見られないなど、例外も存在する (Greenham et al. 2017)。

個別の例について、概日リズム周期と局所適応をつなぐ分子機構を地道に明らかにしていく必要があるだろう。

植物の概日時計は 10 以上の時計遺伝子から構成される転写ネットワークで構成され、個々の時計遺伝子の変異は周期変化を引き起こす (Nagel and Kay 2012)。そのため概日時計の周期は polygenic 形質である。シロイヌナズナで野生型として広く用いられる Col は 24.40 時間、Ler は 23.16 時間周期で葉が就眠運動を示すが、Col と Ler の組換え自植系統では周期は 22~28 時間と大きな多様性を示す (Michael et al. 2003)。このような超越分離が生じるのは、24 時間周期を達成する対立遺伝子セットが複数存在し、掛け合わせでシャッフルされるためと考えられる。概日時計システムは、変異によって概日振動を維持する点では頑健だが、周期の変化という意味では柔軟である。この柔軟性が standing variation として存在し、概日時計の制御下にある遺伝子の発現タイミングの多様性を生み出し、時間依存的な形質の多様性を担保し、迅速な局所適応を支えているのではないかと感じる (図 7)。実証への道のりは長く険しく感じられるが、この観点は概日時計の進化生態学を考える上で、坂の上の雲となると信じて研究を進めている。

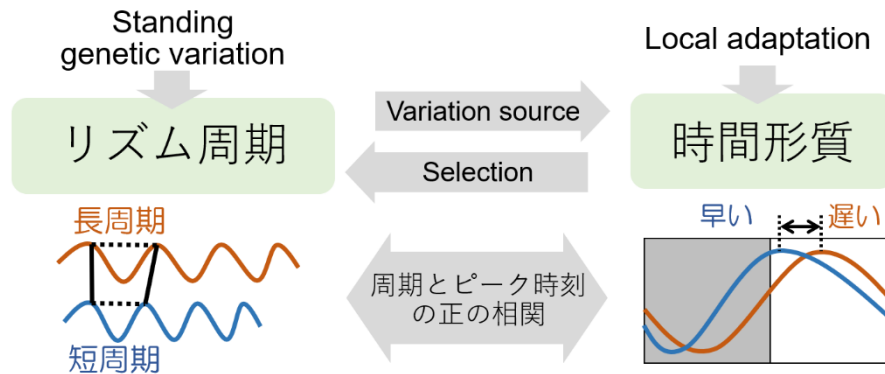


図 7. 概日リズム周期と局所適応

概日リズム周期の多様性は、時間形質の多様性を生み出す。時間形質への淘汰により 24 時間と異なる周期が選択される。このような双方向の関係により、概日リズム周期の多様性が維持され、時に迅速な局所適応を支えるのかもしれない。

謝辞

ここで紹介した研究は、京都大学の小山時隆准教授、伊藤照悟助教、工藤洋教授と共同で行ったものである。また実験に際し、京都大学の芝野郁美博士、本庄三恵准教授、鹿児島大学の榮村奈緒子助教にサポートいただいた。関係者の皆様に深く感謝いたします。また、シンポジウム「植物の多彩な生殖戦略を支える制御機構～もう一度花成を考えてみる～」を共同で企画し、執筆の機会をくださった東京大学の阿部光知教授に感謝いたします。

引用文献

Ågren, J, Oakley CG, Lundemo S, Schemske DW (2017) Adaptive divergence in flowering time among natural populations of *Arabidopsis thaliana*: Estimates of selection and QTL mapping. *Evolution* 71: 550–564. doi: 10.1111/evo.13126

- Beppu T & Takimoto A (1981a) Geographical distribution and cytological variation of *Lemna paucicostata* Hegelm. in Japan. Bot. Mag. Tokyo 94: 11–20. doi: 10.1007/BF02490199
- Beppu T & Takimoto A (1981b) Growth of various ecotypes of *Lemna paucicostata* in Japan under various temperature conditions, and their wintering forms. Bot. Mag. Tokyo 94: 107–114. doi: 10.1007/BF02488269
- Beppu T & Takimoto A (1981c) Further studies on the flowering of *Lemna paucicostata* in Japan Bot. Mag. Tokyo 94: 69–76. doi: 10.1007/BF02488265
- Bog M, Appenroth KJ, Sree, KS (2020) Key to the determination of taxa of *Lemnaceae*: an update. Nordic Journal of Botany, 38: e02658. doi: 10.1111/njb.02658
- Bratzel F, Turck F. (2015) Molecular memories in the regulation of seasonal flowering: from competence to cessation. Genome Biology 16: 192. doi: 10.1186/s13059-015-0770-6
- Cleland CF, Briggs WR. (1967) Flowering responses of the long-day plant *Lemna gibba* G3. Plant Physiol. 42: 1553–1561. doi: 10.1104/pp.42.11.1553.
- Dodd AN, Salathia N, Hall A, Kévei E, Tóth R, Nagy F, Hibberd JM, Millar AJ, Webb AA. (2005) Plant circadian clocks increase photosynthesis, growth, survival, and competitive advantage. Science. 309: 630-633. doi: 10.1126/science.1115581
- Dominoni DM, Helm B, Lehmann M, Dowse HB, Partecke J. (2013) Clocks for the city: circadian differences between forest and city songbirds Proc. R. Soc. B. 280: 20130593. doi: 10.1098/rspb.2013.0593
- Eskuche U and Romero FL, 1982: Contribución a la biología de *Wolffiella Ungulata* (*Lemnaceae*). Sociedad Argentina de Botánica 21, 259–268. <https://botanicaargentina.org.ar/wp-content/uploads/2018/09/259-268015.pdf>
- Graf A, Schlereth A, Stitt M, Smith AM. (2010) Circadian control of carbohydrate availability for growth in *Arabidopsis* plants at night. Proc Natl Acad Sci U S A. 107: 9458-63. doi: 10.1073/pnas.0914299107.
- Greenham K, Lou P, Puzey JR, Kumar G, Arnevik C, Farid H, Willis JH, McClung CR (2017) Geographic variation of plant circadian clock function in natural and agricultural settings. Journal of Biological Rhythms. 32: 26–34. doi: 10.1177/0748730416679307
- Hayama R, Yokoi S, Tamaki S, Yano M, Shimamoto K. (2003) Adaptation of photoperiodic control pathways produces short-day flowering in rice. Nature. 422: 719-22. doi: 10.1038/nature01549.
- Hayama R, Agashe B, Luley E, King R, Coupland G. (2007) A circadian rhythm set by dusk determines the expression of FT homologs and the short-day photoperiodic flowering response in *Pharbitis*. Plant Cell. 19:2988-3000. doi: 10.1105/tpc.107.052480.
- Hillman WS. (1976) Calibrating duckweeds: light, clocks, metabolism, flowering. Science 193: 453–458. doi: 10.1126/science.193.4252.453
- Hillman WS (1959). Experimental Control of Flowering in *Lemna*. I. General Methods. Photoperiodism in *L. Pepusilla* 6746. American Journal of Botany, 46: 466–473. doi: 10.2307/2439143
- Imamura S, Muramatsu M, Kitajo SI, Takimoto (1966) A varietal difference in photoperiodic *Pharbitis nil*. Bot. Mag. Tokyo 79: 714–721. doi: 10.15281/jplantres1887.79.714

- Kondo T, Tsudzuki T (1978) Rhythm in potassium uptake by a duckweed, *Lemna gibba* G3. *Plant Cell Physiol.* 19: 1465–1473. doi: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a075731
- Kooyers, NJ, Greenlee AB, Colicchio JM, Oh M, Blackman, BK (2015) Replicate altitudinal clines reveal that evolutionary flexibility underlies adaptation to drought stress in annual *Mimulus guttatus*. *New Phytologist* 206: 152–165. doi: 10.1111/nph.13153
- Landolt E (1986) Biosystematic investigations in the family of duckweeds (*Lemnaceae*) (vol. 2) The family of *Lemnaceae* - a monographic study Volume 1. Veröffentlichungen des Geobotanischen Institutes der ETH, Stiftung Rubel, Zürich, 71. doi: 10.5169/seals-308748
- Landolt E, Kandeler R (1987) Biosystematic investigations in the family of duckweeds (*Lemnaceae*) (vol. 4) The family of *Lemnaceae* - a monographic study Volume 2. Veröffentlichungen des Geobotanischen Institutes der ETH, Stiftung Rubel, Zürich, 95. doi: 10.5169/seals-308870
- Lankinen P (1993) North–south differences in circadian eclosion rhythm in European populations of *Drosophila subobscura*. *Heredity* 71: 210–218. doi: 10.1038/hdy.1993.126
- Lin X, Liu B, Weller James L, Abe J, Kong F (2021) Molecular mechanisms for the photoperiodic regulation of flowering in soybean. *J. Integr. Plant Biol.* 63: 981–994. doi: 10.1111/jipb.13021
- Meng X, Muszynski MG, Danilevskaya ON (2011). The FT-like *ZCN8* gene functions as a floral activator and is involved in photoperiod sensitivity in maize. *Plant Cell* 23: 942–960. doi: 10.1105/tpc.110.081406.
- Michael TP, Salomé PA, Yu HJ, Spencer TR, Sharp EL, McPeck MA, Alonso JM, Ecker JR, McClung CR (2003) Enhanced fitness conferred by naturally occurring variation in the circadian clock. *Science* 302: 1049–1053 doi: 10.1126/science.1082971.
- Miwa K, Serikawa M, Suzuki S, Kondo T, Oyama T (2006) Conserved expression profiles of circadian clock-related genes in two *Lemna* species showing long-day and short-day photoperiodic flowering responses. *Plant Cell Physiol.* 47: 601–612. doi: 10.1093/pcp/pcj027
- Moraes TS, Dornelas MC, Martinelli AP (2019) FT/TFL1: Calibrating plant architecture. *Front. Plant Sci.* 10:97. doi: 10.3389/fpls.2019.00097
- Müller NA, Wijnen CL, Srinivasan A, Ryngajllo M, Ofner I, Lin T, Ranjan A, West D, Maloof JN, Sinha NR, et al. (2016) Domestication selected for deceleration of the circadian clock in cultivated tomato. *Nat Genet* 48: 89–93. doi: 10.1038/ng.3447
- Muranaka T, Okada M, Yomo J, Kubota S, Oyama T. (2015) Characterisation of circadian rhythms of various duckweeds. *Plant Biol (Stuttg)*. 17 Suppl 1: 66-74. doi: 10.1111/plb.12202.
- Muranaka T, Oyama T. (2016) Heterogeneity of cellular circadian clocks in intact plants and its correction under light-dark cycles. *Sci Adv.* 2: e1600500. doi: 10.1126/sciadv.1600500.
- Muranaka T, Ito S, Kudoh H, Oyama T. (2022) Circadian-period variation underlies the local adaptation of photoperiodism in the short-day plant *Lemna aequinoctialis*. *iScience.* 25: 104634. doi: 10.1016/j.isci.2022.104634.
- Nagel DH, Kay SA. (2012) Complexity in the wiring and regulation of plant circadian networks. *Curr Biol.* 22: 648-57. doi: 10.1016/j.cub.2012.07.025.

- Qin Z, Bai Y, Muhammad S, Wu X, Deng P, Wu J, An H, Wu L. (2019) Divergent roles of FT-like 9 in flowering transition under different day lengths in *Brachypodium distachyon*. Nat Commun. 10: 812 doi: 10.1038/s41467-019-08785-y.
- Ray PM. & Alexander WE. (1966) Photoperiodic adaptation to latitude in *Xanthium Strumarium*. Am. J. Bot. 53: 806–816. doi: 10.2307/2440183
- Serikawa M, Miwa K, Kondo T, Oyama T. (2008) Functional conservation of clock-related genes in flowering plants: overexpression and RNA interference analyses of the circadian rhythm in the monocotyledon *Lemna gibba*. Plant Physiol. 146: 1952–63. doi: 10.1104/pp.107.114611.
- Servedio MR, Doorn GSV, Kopp M, Frame AM, Nosil, P (2011) Magic traits in speciation: “magic” but not rare? Trends Ecol. Evol. 26, 389–397. doi: 10.1016/j.tree.2011.04.005
- Xia Z, Watanabe S, Yamada T, Tsubokura Y, Nakashima H, Zhai H, Anai T, Sato S, Yamazaki T, Lü S, et al. (2012). Positional cloning and characterization reveal the molecular basis for soybean maturity locus E1 that regulates photoperiodic flowering. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 109: E2155. doi: 10.1073/pnas.1117982109
- Yanovsky MJ and Kay SA (2002) Molecular basis of seasonal time measurement in Arabidopsis. Nature 419: 308–312. doi: 10.1038/nature00996.
- Yoshida A, Taoka KI, Hosaka A, Tanaka K, Kobayashi H, Muranaka T, Toyooka K, Oyama T, Tsuji H. (2021) Characterization of frond and flower development and identification of FT and FD genes from duckweed *Lemna aequinoctialis* Nd. Front Plant Sci. 11: 697206. doi: 10.3389/fpls.2021.697206.
- Yukawa I. & Takimoto A. (1976) Flowering response of *Lemna paucicostata* in japan. Bot. Mag. Tokyo 89: 241–250. doi: 10.1007/BF02488346
- 別府敏夫, 柳瀬大輔, 野淵正, 村田源 (1985) 日本産アオウキクサ類の再検討 植物分類, 地理 36: 45-58. doi: 10.18942/bunruichiri.KJ00001078530
- 太田行人 (1987) 植物発生生理学 岩波書店 東京都
- 山根久代 (2020) リンゴ花芽の休眠と花成進行に関連した *DORMANCY-ASSOCIATED MADS-box*, *FLC-like* 遺伝子の発現挙動 低温生物工学会誌 66: 17-25. doi: 10.20585/cryobolcryotechnol.66.1_17