

再び脚光を浴びる極小被子植物ウキクサの植物科学と応用可能性

伊藤 照悟

京都大学大学院 理学研究科
〒606-8502 京都市左京区北白川追分町

The Revival of the Tiny Angiosperm Duckweed and Its Potential in Plant Science and Applications

Shogo Ito

Department of Botany, Graduate School of Science, Kyoto University,
Kita-shirakawa, Oiwake-cho, Sakyou-ku, Kyoto, 606-8502, Japan

Keywords: cryopreservation, duckweed, seasonal adaptation, species identification, stable transformation,

DOI: 10.24483/bsj-review.16c3.00287

1. はじめに：ウキクサ研究の再興と意義

ウキクサ植物は極小で、実験室内で無菌的、半永久的に栄養繁殖が可能であるため、我が国の植物生理学の研究で古くから使われてきた研究材料である。しかしながら、ゲノムの情報、分子生物学のツールなどが利用困難であったことから、ウキクサ研究は一旦縮小・衰退してしまった。近年の次世代シーケンサー（NGS）技術の発達により、他の作物と同様にウキクサ植物のゲノム情報が解読され、様々な分子生物学ツールが利用可能となったことで、ウキクサ植物を用いた研究分野は再び活発化している（Acosta et al. 2021）。全球的に分布するウキクサは環境への応答性や形態的な多様性・可塑性があり、植物の発達や環境応答を解析する上で理想的な研究材料である。また、非常に速い増殖速度と高いタンパク質含有量、または、高デンプン含量を達成できることから、バイオ燃料や家畜飼料への応用研究も展開されている。今後、地球温暖化による生育環境の変動が進む中で、効率的な代謝や生育制御を可能にするための分子レベルでの解析が一層発展していくと考えられる。本稿は、読者の皆様が、ウキクサ植物を研究材料として新たに導入することで、各自の研究分野をさらに進展させる契機となることを期待している。以下では、ウキクサ植物を用いる際の利点と課題を整理するとともに、我々の研究グループを含む最新の研究動向を概説したい。

2. ウキクサの形態と発達：極小被子植物の生物学的特徴

ウキクサ植物は单子葉植物であり、これまでサトイモ科（Araceae）のウキクサ亜科（Lemnoideae）に分類されてきたが、近年では旧分類体系のウキクサ科（Lemnaceae）の名称を用いることが一般的となっている。現在、5属、35種、3雑種に分類されているが、今後も

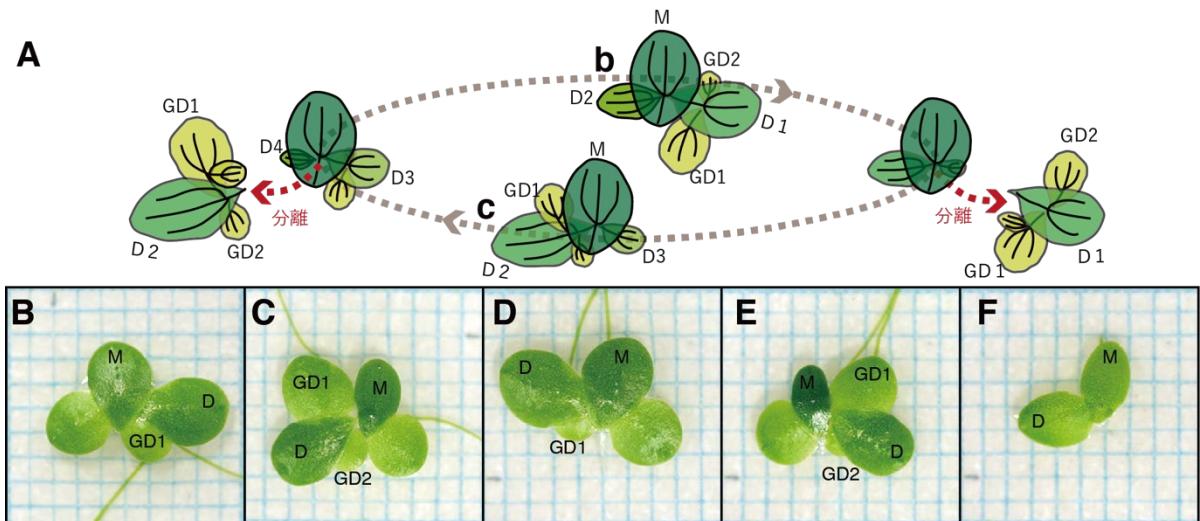


図 1. *Spirodela*, *Landoltia*, *Lemna* 属における共通したコロニーの形態と栄養成長様式

A : *Spirodela*, *Landoltia*, *Lemna* 属における共通した成長模式図。親フロンドの維管束の収束点の裏側から根が伸びる。子フロンドは親フロンドの維管束収束点付近にある左右 2箇所の分裂組織から発達する。B,C : 右利きのムラサキコウキクサ。最も成熟した親のフロンド (Mother) から右側に発達した子フロンド (Daughter 1) に着目すると、子フロンドから発達した初発の孫フロンド (Grand Daughter 1) は右側から出現している。C も親フロンド (M) から左側に発達した子フロンド (D) の初発の孫フロンド (GD1) は右側に出現している。D, E : 左利きのムラサキコウキクサ。同様に子フロンド (D) に着目することで孫フロンド (GD1) が左側から発達している。F : アオウキクサ。左右の利き手判断は不可能。

ゲノムの解読や、雑種・倍数性の解析の進展により、種分類は改訂されていくと予想される (Braglia et al. 2021a, 2024; Stepanenko et al. 2025)。本節では、まずウキクサ植物の形態と増殖様式について簡単に紹介する。個体の基本単位 (Phytomer) は、茎から進化したと思われる葉状体 (フロンド, frond) である。複数のクローナルなフロンドが結合した状態の個体群をコロニーと呼ぶ。ウキクサ属 (*Spirodela*)、ヒメウキクサ属 (*Landoltia*) では、1つのフロンドの維管束収束点の下面から複数の根が生じる。一方、アオウキクサ属 (*Lemna*) ではフロンドから1本の根が生じる。これら3属ではフロンド内の根の付け根付近に位置する左右の袋状構造 (ポケット, budding pocket) それぞれに分裂組織が存在し、左右交互に無性的な新たな葉状体 (英語では mother, daughter, ground daughter frond 表記される。本稿では親, 子, 孫フロンドとする。) を形成する (吉田 2023; Mateo-Elizalde et al. 2023)。この左右のフロンド発生順序は固定されており、半永久的に栄養成長 (繁殖) を続けるに当たり、その関係が逆転することはない。ただし、有性生殖を経て種子から発芽した個体では、左右の順序が反転した株がほぼ半数出現することから、左右の発達順序は遺伝的に固定されているわけではなく、胚発生過程のゆらぎにより確率的に決定されると考えられている。親フロンドのポケットから子フロンドが出現する側を下向き (手前側) に配置した場合、図 1A には、右側の分裂組織 (primary meristem) が先に奇数番目の子フロンドを、左側の分裂組織 (secondary meristem) が偶数番目の子フロンドを交互に発生させる *Lemna* 属のウキクサ植物の模式図を示す (筆者はこれを「右利きウキクサ」と呼称している。) 十分に成長した子フロンドは親フロンドとの物質輸送を担う連結柄 (stipe) がちぎれて独立した個体となる。図 1B は右利きのムラサキ

コウキクサ (*Le. japonica*) の例であり、図 1A 中の b に対応する。図 1C では、親フロンド (M) から発達した左側の子フロンド (D) が右側の子フロンドより大きいが、これは右側に発達した奇数番目のフロンドが独立した直後のコロニーであり、やはり右利きの株である(図 1A 中の c に対応)。左側の子フロンド (D) に着目すると、1 番目の孫フロンド (GD1) は右側から出ていることから、右利きであると判定できる。一方、図 1D および E は左側が先に発達する「左利き株」である。コロニー内の最も古い親フロンド (M) から出現している子フロンド (D) の大きさから利き手 (左右) を判断することはできず、子フロンド (D) から出現する孫フロンド (GD1) の出現順序に基づいて判定する必要があることが理解されるだろう。図 1F は親フロンドと子フロンドからなるアオウキクサ (*Le. aequinoctialis*, または、後述するように、筆者らは *Lemna aoukikusa* あるいは *Lemna × aoukikusa* の学名の使用を推奨している。) のコロニーを示す。この段階では孫フロンドが存在しないため、利き手の判定は不可能である。一般に、コロニーを構成するフロンド数は、子フロンドの発生速度と成熟した子フロンドの独立速度の関係で決まる。すなわち、生育環境が良好であればコロニーあたりのフロンド数は増加し、貧栄養条件であれば分離が優先され、フロンド数は減少する。野外の過酷な生育条件のみならず、実験室内の無菌環境においても、培地中のショ糖の有無などによって 1 コロニーあたりのフロンド数は可塑的に変化する。野外観察において、右利き・左利きの判別は容易ではないが、ウキクサ研究を進める上で、様々な生育条件に適応した自然変異株を取得することは重要である。野外で右利き・左利きのコロニーが同一地点に混在している場合、それらは同種であったとしても遺伝的に異なる(すなわち clone ではない)株であり、両方を採取して表現型比較をすることをお勧めする。右利きウキクサの場合、花成誘導時には花(雄蕊および雌蕊)は必ず反対側(左側の secondary meristem)のポケットからのみ出現する(図 4A)。したがって、花成個体を探索するときには、まず右利き・左利きを判定することが有効である。花が受粉に失敗して種子が登熟できない場合、同じポケットから新たなフロンドが出現することから、栄養繁殖を担う分裂組織は花成時期にも維持されていると考えられている。花成誘導および発達過程の詳細については、過去の BSJ レビュー 村中、吉田を参照されたい(吉田 2023; 村中 2023)。

一方、ミジンコウキクサ属 (*Wolffia*) と *Wolfiella* 属の植物体には根や維管束が存在せず、形態はさらに単純である。栄養成長時にはフロンドに 1 箇所ある分裂組織から子フロンドが発達する。進化の方向は簡略化・単純化であり、祖先的である *Spirodela*, *Landoltia* 属から根の本数を減らし *Lemna* 属が現れ、維管束をなくし、分裂組織を 2 箇所から 1 箇所に減らした *Wolffia* 属と *Wolfiella* 属が出現したと考えられている。花成時には、フロンドのほぼ中央の表皮に亀裂が入り、鉛直方向に花(雄蕊・雌蕊)が発達することから(図 4B)，栄養成長時に活性をもつ分裂組織とは別の分裂組織がフロンド中央内部に存在する可能性、または分化した細胞から脱分化を経て *denovo* での花芽分裂組織が新たに形成される可能性の 2 つが考えられているが、まだ結論に至っていない(Li et al. 2023)。前者の場合は *Lemna* 属の secondary meristem に相当する系譜を持つ分裂組織とみなすことができるかもしれない(Yang et al. 2021)。ミジンコウキクサ (*Wolffia*) のフロンドからプロトプラストを作成し、1 細胞レベル

での遺伝子発現解析が報告されているので、フロンド内部に隠れた休眠中の分裂祖組織の構造や発生過程について今後解析が進展する期待されている(Li et al. 2023; Denyer et al. 2024)。

3. ウキクサ植物のゲノム解読と系統分類：種再編の進展

3-1. ゲノム情報の整備

ウキクサ植物を再び植物分子生物学のモデル系として確立するためには、ゲノム情報の解読が必要不可欠である。最初に全ゲノムが解読されたのは、ウキクサ (*S. polyrhiza*) 7498 株である。様々なウキクサ植物の核 DNA 含量を flow cytometry (FCM) で定量したところ、個体サイズの最も小さい *Wolffia* 属の中で *Wolffia arrhiza* が約 2,200 Mbp とかなり大きく見積もられたのに対し、個体サイズが最も大きい祖先的な *S. polyrhiza* は DNA 含量からゲノムサイズが小さいことが推定されたためである(Wang et al. 2011; Hoang et al. 2019)。Joint Genome Institute (JGI) のプロジェクトで解読され $1C = 158 \text{ Mb}$ と決定された。(Wang et al. 2014) , その後、ロングリードの解析と Hi-C により染色体レベルにアセンブルされ染色体数は $2n = 40$ と決定された。*S.p.*種内の数百の株間のゲノム配列比較が行われ (*S.p.* 7498, 9509 などは配列公開) , 配列の多様性は非常に低いとされた (Michael et al. 2017; Hoang et al. 2018; Bog et al. 2020, 2022b; Harkess et al. 2021; Wang et al. 2024) 。ただし、形態的・生理的な表現型の多様性は大きく、一般的な被子植物よりも DNA のメチル化（特に非対称 mCHH）レベルが低いこと、RdDM 因子、DNA メチル化維持、および RNA サイレンシング機構をコードする遺伝子の一部がゲノムから欠損しているため、エピジェネティックな制御と表現型の多様性・可塑性との因果関係について研究が進んでいる (Dombey et al. 2025) 。

これ以降、*S.p.*種との比較で *Spirodela intermedia* (*S.i.* 7747, 8410) , $2n = 36$ (Hoang et al. 2020), コウキクサ (*Lemna minor* 5500, 7210, 9252) , $2n = 40$ (Van Hoeck et al. 2015; Ernst et al. 2025), ヒメウキクサ (*Landoltia punctata* 7733, 5635) (Baggs et al. 2022), ヒナウキクサ (*Lemna minuta* 5633) , $2n = 42$ (Abramson et al. 2022), *Wolffia arrhiza* (8872a), *Wolffia australiana* (7733) , $2n = 40$ (Michael et al. 2021; Park et al. 2021; Li et al. 2023) の全ゲノムが次々に公開されている。イボウキクサ (*Lemna gibba* 7742a) , ムラサキコウキクサ (*Lemna japonica* 7182, 8627, 9421) , キタグニコウキクサ (*Lemna turionifera*, 9434) についても染色体レベルまでアセンブルされた配列が公開されている(Ernst et al. 2025)。ナンゴクアオウキクサ (*Lemna aequinoctialis* 8011) についても現時点で論文発表されていないが、配列は Lemna.org で限定公開されている。*Le. minor* として初期に報告された一部の株は、ゲノム配列解析および後述の倍数性解析の結果に基づき、種名（雑種）が *Le. japonica* に変更されているため注意が必要である。例えば、*Le. japonica* 8627 株は、当初 *Le. minor* として報告されていたが、配列解読の結果、倍数性が確認され、*Le. japonica* として再分類された。祖先型の形質を保持している *S. polyrhiza* のゲノムサイズ $1C = 158 \text{ Mb}$ と比較して、*Lemna* 属のゲノムサイズは $1C = 300 \sim 500 \text{ Mb}$ で少し大きい。*Wolffia* 属の個体サイズは非常に小さく形態も単純化しているが、ゲノムサイズは *Wolffia* 属内の種間の差が非常に大きい。ゲノムサイズの小さい *Wolffia australiana* ($1C = 360 \sim 440 \text{ Mb}$, $2n = 40$) が最初に報告された(Park et al. 2021; Li et al. 2023)。様々な研究グループが独自に全ゲノム配列を決定しているのが現状であり、各種ごとの基礎研究用に代

表株は定まっていないが、今後株間の配列の違いなどを集約し、共通で利用できるデータベースが構築されることを期待している。上述の株に関して Lemna.org (<https://www.lemnna.org/>) , CoGe (<https://genomevolution.org/coge/>) , WolffiaDB (<https://duckweeds.plantprofile.net/home>) などで簡便にゲノム配列を取得できるので、これらをローカル利用することをお勧めする。

3-2. DNA バーコディングと倍数性による種分類の再検討

ウキクサ植物の種の同定は、前述の形態的な特徴により属レベルまでは簡単に分類できるが、小型で構造が簡略化されているため形態から種の同定を行うのは難しい。特に野外で発見したウキクサ植物については生育地の環境（栄養状態など）が様々なので、可塑性の高い個体サイズ・根の長さ・色などは同定の指標には使いにくい。これまで、葉緑体 DNA の配列解析によって、種の同定が簡便に行われていた (Bog et al. 2015)。主に、*atpF-atpH* および *psbK-psbI* の遺伝子間領域が用いられてきたが、近縁種で差がない場合は *rbcL*, *matK* 遺伝子領域、*trnK*, *rpl16* イントロン領域も使用される。*Le. minor* と *Le. japonica* については、これまで葉緑体配列 *atpF-atpH* 領域などでは完全一致し分離が不可能であった。近年のゲノム解析と後述の核ゲノムの倍数性解析により、*Le. minor* (M) を母方親、*Le. turionifera* (T) を父親（花粉）側にして、形成された雑種の存在が明らかとなった。4 (MMTT) または 3 倍体 (MMT) の倍数性を持った個体であり、世界中に分布していることがわかった(Braglia et al. 2021b; Volkova et al. 2023; Schmid et al. 2024; Ernst et al. 2025)。2 倍体の種を *Le. minor*、倍数性の雑種を *Le. japonica* とすることが国際ウキクサ会議 (International Conference on Duckweed Research and Applications; ICDRA) にて提案され、*Lemna × japonica* と今後は表記されることが増えていく可能性が高い。北海道大学植物園で森川正章博士によって取得され、日本において様々な研究で使用してきた *Le. japonica* (*Lemna × japonica*) 5512 株 (通称 Hokumori 株) は、報告初期は *Le. minor* とされたが、ゲノム解読の結果、倍数性が確認され、現在は *Le. japonica* (*Lemna × japonica*) に統一されつつある。ヨーロッパでも同様の報告があり、*Le. gibba*, *Le. minor* を父、母方親またはその逆とする雑種を *Lemna × mediterranea* として報告している (Braglia et al. 2024; Romano et al. 2025)。日本国内で分類が難しいとされてきたアオウキクサについても、倍数性の解析が進んでいる。ウキクサ植物の分類と生体研究の第一人者である Elias Landolt 博士 (1926-2013 彼の詳細なモノグラフ "Lemnaceae – a Monographic Study") は、現在もウキクサ研究の基礎文献として高く評価されている。 (Landolt and Kandeler 1987)) がカリフォルニアで採取したアオウキクサの代表株である 6746 株は、現在は学名 *Le. aequinoctialis* が使用されている (以前は *Lemna perpusilla* や *Lemna paucicostata* が使用されていた)。短日で花成し種子のできる 6746 株の倍数性を調べたところ 4 倍体の雑種であることがわかった (Stepanenko et al. 2025)。北米の限られた地域にしか存在しない *Le. perpusilla*、東南アジアを中心に分布する *Le. aequinoctialis* の両種は種内に 2 倍体、3 倍体の株が見られ、それらの雑種が 6746 株だと結論付けられた。日本国内のアオウキクサは別府博士らによって 2 種 1 亜種に分類された。広く水田に分布する *Le. aoukikusa* N1 型 (または Group B) , 九州以南の常緑ナンゴクアオウキクサ *Le. aequinoctialis* S 型 (または Group A) そして、北陸地方に分布する亜種の *Le. aoukikusa* subsp. *hokurikuensis* N2 型である(別府 et al. 1985)。日本で優

先種となっているのは、4倍体雜種のアオウキクサ *Lemna × aoukikusa* (*Le. aequinoctialis* × *Le. perpusilla*) のようだ (Lee et al. 2024)。この雜種は、6746 株と同様に、自家和合で実験室内においてもよく結実し、大量の発芽可能な種子を作ることができたことが、日本の冬季における種子での越冬を可能にし、広範囲に分布を広げることができた要因であろう。近年、筆者らはナンゴクアオウキクサ *Le. aequinoctialis* S 型を和歌山県で発見している。ナンゴクアオウキクサは自家不和合性を示し、種子形成がほぼ認められないため、日本の冬季を越せないと考えられてきた。しかし、温暖化の影響により、分布の北限が変化している可能性が示唆される。*Wolffia* 属, *Wolfiella* 属についても属内の種の分離は配列情報からは不十分なものも多く、今後もゲノム配列解読、倍数性の解析の進展とともに、分類の再検討がなされる可能性は高い。

3-3. Tubulin-Based Polymorphism (TBP) を利用した簡便な種同定

野外からのウキクサ植物を採取した場合、実験に使用する目的と、予算にもよるが、無菌化を終えたあとで、種の同定に進むことが一般的である。無菌化処理の段階において、希少なウキクサを見落とさないためにも、取得したウキクサ個体群を観察し、形態による種の予想をすると同時に、フロンド発達順序の左右性の判定を強くお勧めする。前述のように、ウキクサ植物の左右性が栄養繁殖中に反転することはほぼ無い。したがって、一見、同種に見える個体も、左右性が異なれば、別種である可能性がある。または、同種であれば遺伝的に異なる別株 (clone) である可能性が高い。例えば、貧栄養環境で生育していたウキクサ個体群を採取すると、*Le. minor*, *Le. japonica*, *Le. minuta* の3種が混在していることがある。フロンドサイズ、根の長さ、表面のツヤなどでは種数の予想さえ難しいが、左右性を見れば、少なくとも2種（または遺伝的に異なる同種2株）の存在を予想して無菌化と種同定に進むことができる。もちろん、同一箇所で取得した株において左右性が同じであっても同一クローニングではない可能性にも留意しなければならない。特に *Le. aequinoctialis* と *Le. gibba* は種子ができることからその可能性が高い。ウキクサ植物の種内 (clone 株間) の多様性は非常に大きく、生理的特性が異なり、さまざまなストレス条件下での反応にも定量的な違いがあることが示されている (Bergmann et al. 2000; Sree et al. 2015)。また、倍数性の違いによって表現型の多様性は更に高まっている (Vunsh et al. 2015)。独立に複数株を無菌化して維持しておけば、様々な形質を持った貴重な株として比較研究に用いることができる。複数の無菌化株を取得した後に、近縁種の分離と雜種の同定には、葉緑体マーカー遺伝子による配列解析に加えて、 β -tubulin 遺伝子ファミリーメンバーのイントロン長多型に基づく核分子マーカーである tubulin-based polymorphism (TBP) 解析が安価で簡便である (Braglia et al. 2021a)。

ここでは β -tubulin (*TUBB1*) 遺伝子のオルソログ間における第2イントロン領域を PCR 増幅することで種同定した結果を図2に示す。日本で頻繁に見られるウキクサ種はこのPCRで簡単に分離が可能である。写真の左から、ウキクサ *S. polyrhiza*, ヒメウキクサ *La. punctata* は固有な断片が増幅される。母性遺伝の葉緑体配列がほぼ一致してしまうコウキクサ *Le. minor* と、雑種のムラサキコウキクサ *Le. japonica* についても分離可能である。*Le. minor* と *Le. turionifera* ゲノム由来と思われる双方の断片が *Le. japonica* では増幅されている。前述の日本に分布するアオウキクサ類2種1亜種についても、国内の水田の優占種である雑種の *Lemna* \times *aoukikusa* N1型には2断片が増幅され、北陸地方に分布し2倍体と思われる *Le. aoukikusa* subsp. *hokurikuensis* N2株、鹿児島以南沖縄に分布する *Le. aequinoctialis* S型にはそれぞれ1断片が増幅され、分離可能である。外来帰化種であるイボウキクサ *Le. gibba*, ヒナウキクサ *Le. minuta*, ミジンコウキクサ *W. globosa* についても固有の断片が増幅できる。日本での分布報告のあるチリウキクサ *Le. valdiviana* については我々の研究室で日本産の株を保持していないので今回は確認できなかった。同質倍数性については本手法では分離できないので、表現型が明らかに異なると気づいたときには、必要に応じて flow cytometry (FCM) を用いたDNA含量の解析を組み合わせると良い。

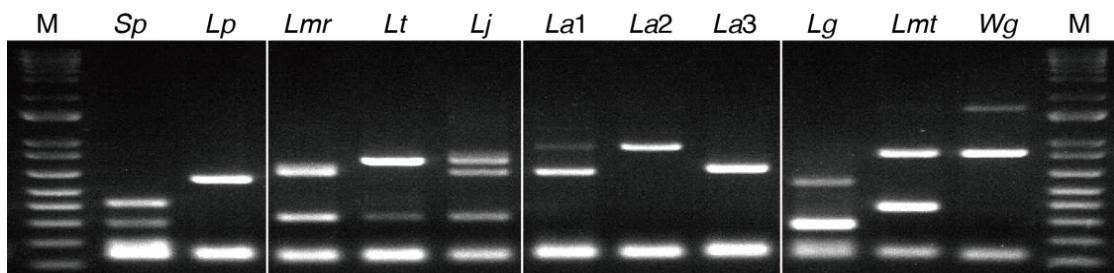


図2. Tubulin-based polymorphism (TBP) を用いた種と雑種の判定

Sp: Spirodela polyrhiza, Lp: Landoltia punctata, Lmr: Lemna minor, Lt: Lemna turionifera Lj: Lemna japonica, La1: Lemna aoukikusa N1型, La2: Lemna aequinoctialis S型, La3: Lemna aoukikusa subsp. hokurikuensis N2型, Lg: Lemna gibba, Lmt: Lemna minima, Wg: Wolffia globosa
primerF: 5'-CTSAAGCTSACBAMBCCVAGCTGT-3'
primerR: 5'-AGATBARRTGRTTCAGRTCDCCRACT-3, Braglia et al. 2021 より改変

4. ゲノム情報と分子生物学ツールを駆使したウキクサ研究

4-1. 遺伝子一過的導入法と概日時解析

ここからは、分子生物学的ツールの開発とゲノム情報を利用した、生理・生態・進化・環境研究について概説する。

我々の研究グループでは、概日リズムの解析にウキクサ植物を用いている。様々なウキクサ種において、金粒子を用いた Plasmid DNA の導入による一過的な遺伝子発現に成功している (Muranaka et al. 2013; Muranaka and Oyama 2018, 2020)。ウキクサ植物は極小・扁平で、成熟したフロンド内の細胞の位置関係がほぼ変化しないため、生物発光レポーター (ルシフェラーゼ LUC) の経時変動の非侵襲的な長期測定に理想的な材料であった (Serikawa et al. 2008; Muranaka et al. 2015; Isoda and Oyama 2018; Isoda et al. 2022)。この測定系を用いて、レポータ

一の発光を頼りに、1細胞レベルの概日リズムを検出し、連続明条件下ではフロンド内（個体内）の各細胞の概日リズム位相が徐々に脱同期することを報告している（Muranaka and Oyama 2016）。また、*CaMV35S*プロモーターや*ZmUBQ*プロモーターを用いた遺伝子過剰発現、RNAiによる遺伝子抑制のエフェクターも同時に同一細胞へ導入することができる。この共導入系では、周辺の細胞の概日時計が正常に機能していると考えられる中で、レポーターとエフェクター遺伝子を導入した細胞だけで概日リズムが攪乱され、概日時計の細胞自律的な性質が示されている（Serikawa et al. 2008; Ito-Miwa et al. 2014; Okada et al. 2017）。更に、近年では、波長の異なる発光レポーターを用いて2遺伝子の発現変動を計測したり、細胞非自律性の概日発光リズム成分の検出しており、そのリズム発生のメカニズムの解析も行っている（Watanabe et al. 2021, 2023; Horikawa et al. 2025）。一過的遺伝子導入法では様々なレポーターが導入できるため、BiFC やスプリットルシフェラーゼ（split-LUC）システム等を用いて、タンパク質の細胞内局在、タンパク質間相互作用、DNA 結合、転写活性化・抑制能など、酵母やタバコなどの代替としても使用できる。

4-2. 安定形質転換法と遺伝子機能解析および物質生産

筆者はウキクサ研究を開始した直後から安定形質転換ウキクサの作出に取り組んできた。

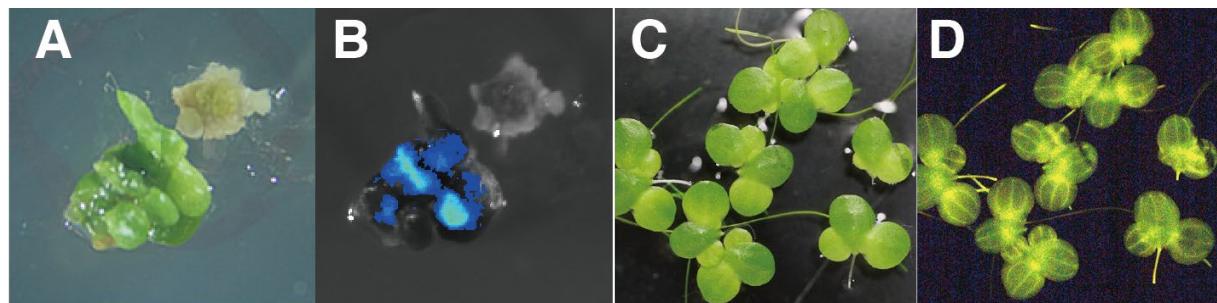


図3. ムラサキコウキクサ *Lemna japonica* 5512 株を背景とした形質転換植物体

A: アグロバクテリウム感染後、フロンド再生培地で培養後73日目の写真。カルスからフロンドが再生している。B: 導入した概日発光レポーター*AtCCA1lex4::LUC+*由来の発光を疑似カラーで示す。明視野との合成写真。C: 構成的発現プロモーター*ZmUBQ1::LUC+*を形質転換したムラサキコウキクサの明視野。D: 発光画像。植物全体で発光が観察できる。維管束や分裂組織付近で活性が高い。この植物は暗所であれば肉眼で発光を観察できるほど明るい。作出後10年ほど継代しているが、いずれの植物でも生物発光は安定して検出できる。

ウキクサ植物のカルス化を経由したアグロバクテリウムとの共培養による形質転換の成功例は2000年代初期から報告がある。*Lemna*属では*Le. gibba*, *Le. minor*または*Le. japonica*から成功報告が始まり（Yamamoto et al. 2001; Sun et al. 2007; Ko et al. 2011a; Chhabra et al. 2011; Canto-Pastor et al. 2015a; Kozlov et al. 2019），その後も現在に至るまで、*Le. turionifera* (Yang et al. 2017), *Le. aequinoctialis* (Liu et al. 2019; Wang et al. 2021), *Landoltia punctata* (Vunsh et al. 2007; Rival et al. 2008), *S. polyrhiza* (Yang et al. 2018b), *Wolffia arrhiza* (Khvatkov et al. 2018, 2021; Shvedova et al. 2023), *W. globosa* (Heenatigala et al. 2018)などについて主にレポーター遺伝子の活性に基づいた成功報告がある。しかしながら、報告初期は他の研究室での再現が難しかったようである。その原因として、種内の株間の生理学的多様性の大きさや、種

同定の不正確さ、倍数性・雑種などが考えられている。特に、株間で植物ホルモン感受性などに大きな違いがあり、成功報告のあるウキクサ種においても、形質転換植物体の作出どころか、カルス誘導もできない株も多い。つまり、安定形質転換植物の作成にはどの株 (clone) を選ぶかが成否に直結することを理解していただきたい。*Le. aequinoctialis* の成功例に関しては、台湾由来の分離株を用いているので、先述のナンゴクアオウキクサ *Le. aequinoctialis* (種子のできない S 型) における成功例であると考えられる。筆者らは、本州産のアオウキクサ *Lemna × aoukikusa N1* 型を用いて作出を試みたが未だに成功していない。また、カルス化を経ずに植物個体 (フロンド) とアグロバクテリウムを直接共培養することで安定形質転換体の作成に成功した例もある。ガラスピーズによる振盪や減圧により、アグロバクテリウムが分裂組織に感染できるように条件検討することで安定形質転換が達成できるようだ (Ko et al. 2011b; Balaji et al. 2016; Heenatigala et al. 2018; Yang et al. 2018a)。現在はカルス化を経た形質転換が現在主流であるが、カルス化に伴う意図しない Somaclonal 変異による形態異常や生理反応異常が生じる可能性がある。また導入した遺伝子または欠損させた遺伝子の機能によってホルモン感受性や形態形成に異常を呈する場合にはウキクサ個体へ再分化させることも難しい。通常のフロンド用いた形質転換法の効率・再現率が上昇すれば格段に応用の幅が上がる期待されている。

筆者らのグループでは北海道産の *Le. japonica* 5512 株で初めて形質転換体の作出に成功した。2015 年に得られたルシフェラーゼ (LUC) レポーターを導入した植物体は現在も継代培養で維持されており発現も安定している (図 3)。この植物を用いて、すべての細胞から概日発光レポーターのシグナルを検出できる特性を活かし、親・子フロンド間の時刻 (位相) 情報の関係性や、新規に発生する子フロンドの位相が比較的揃っていること、連続明条件下においてフロンド内に概日リズムの様々な位相パターンが形成されることなどを報告している (Ueno et al. 2022)。筆者らの研究室では、*Le. japonica* 5512 株に加え、日本産の *Le. minor* の 5 株、*Le. turionifera* 6619 株において形質転換に成功している (未発表)。これまでの報告では、LUC, GFP, GUS のようなレポーターだけでなく Artificial microRNA を用いた内在 *magnesium chelatase subunit* 遺伝子 (CH42) の抑制 (Canto-Pastor et al. 2015b), CRISPR/CAS9 を用いたゲノム編集により *phytoene desaturase* 遺伝子 (PDS) への変異導入にも成功している (Liu et al. 2019)。過剰発現については、ウキクサ内で恒常的発現プロモーターを用い、様々な外来の遺伝子 (ウィルスワクチン用抗原など) が導入されている。(Kubota et al. 2013; Kozlov et al. 2019)。また、 β -エストラジオールで誘導する XVE システムがムラサキウキクサ (*Le. japonica*) で機能することが示され、4 種の外来遺伝子の導入で、脂質の蓄積を乾燥質量の最大 8.7%まで増加 (理想的な培養環境では、年間あたり 1 ヘクタールあたり約 3.3 kL (= 約 3,300 L) の油を生産できる) させることにも成功しており、応用への第一歩が切り開かれている。(Liang et al. 2023)

4-3. 種子と休眠芽による生存戦略の分子解析

ウキクサ植物は至適な生育環境では爆発的に栄養繁殖する。しかし、温帯・亜寒帯における冬季や、亜熱帯地域の乾季など、季節的な環境変動が予想されるときには致死的な環境を

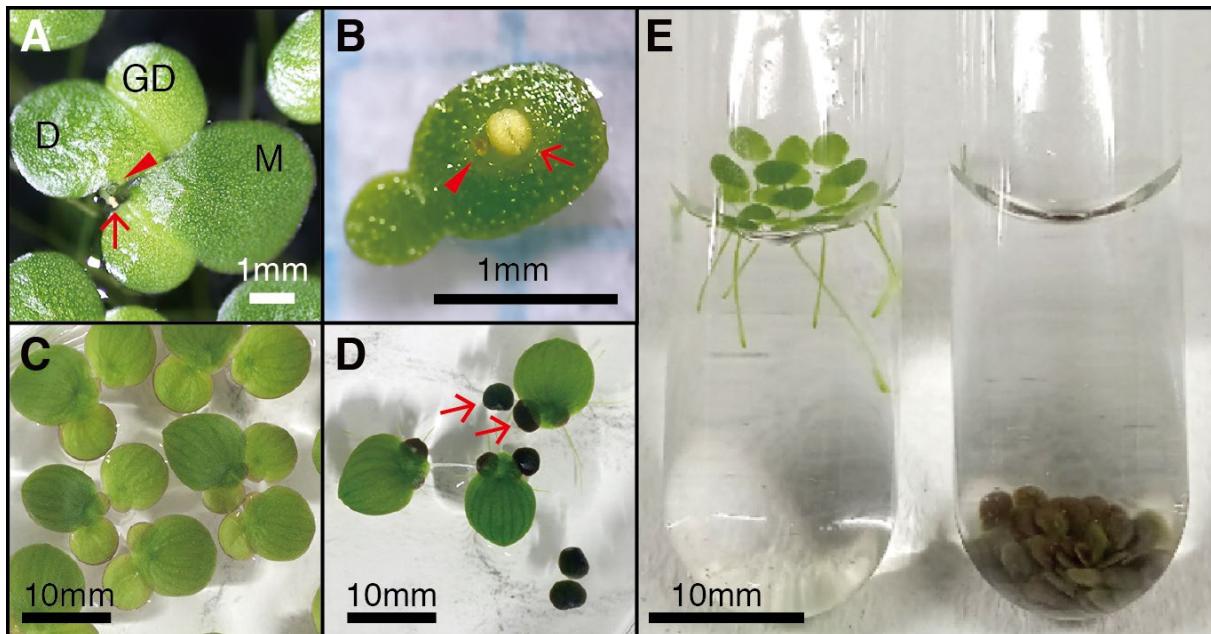


図4. ウキクサ植物の花と休眠芽の誘導

A : 花成したイボウキクサ *Lemna gibba*。長日条件 15L9D, 25°Cで生育。右利きのウキクサで、子フロンドの右側から孫フロンドが出現し、左側から雄蕊（矢印）、雌蕊（鱗）が出現している。B : 花成した *Wolffia brasiliensis*。長日条件 15L9D, 25°C, 5 μM サリチル酸処理で生育。フロンドの中央から表皮が開裂し、雌蕊（鱗）が先に出現し、その後雄蕊（矢印）が出現する。写真の葯は未成熟で開裂していない。受精せず、種子はできない。C : ウキクサ *S. polystachya* の通常栄養成長。長日条件 15L9D, 25°Cで生育。D : 低温で誘導された休眠芽（矢印）。長日条件 15L9D, 15°Cで生育。E : キタグニコウキクサ *Lemna turionifera* の通常栄養成長（左）と栄養欠乏で產生された休眠芽（右）。

回避するための生存戦略を取ることが知られている。ウキクサ植物の生活環については Mateo-Elizalde らの簡潔な総説を参照していただきたい(Mateo-Elizalde et al. 2023)。第1の生存戦略は、有性生殖で作られた種子での休眠があげられる。日本の水田に分布するアオウキクサ *Lemna × aoukikusa* N1型はその典型例であり、夏の後半に短日条件で花成が誘導され種子つけ越冬する。一方、地中海性気候地域に広く分布するイボウキクサ *Lemna gibba* は長日条件で花成し種子をつけることが古くから知られており(図4A)，生理学的な知見は蓄積している(Cleland and Briggs 1967)。しかし、日本などでは、湿潤な夏季を越せないわけではなく、長日に応答した花成と種子形成は、この種の生存に対して強い選択圧としては働いていないと考えられている。そのほかのウキクサ植物については、栄養欠乏条件やサリチル酸処理により花成が誘導されることが報告されているが(図4B)，筆者自身も種子を観察した経験がなく、自然環境下での結実条件については未解明な点が多い(Fourounjian et al. 2021)。日本の野外でコウキクサ等を観察すると、しばしば右・左利きの個体が同所で見られることから、有性生殖をしている可能性がある。しかし、自家不和合性の有無、送粉者の関与など繁殖生態に関する研究はほとんど進んでいない。日本産アオウキクサ(広義の *Le. aequinoctialis*)における花成と種子形成、短日性花成誘導、および日本各地で取得された株(clone)間での限界日長の違いと概日時計周期の関係については、原著論文およびBSJレビ

ユーにも詳細が報告されているのでそちらを参照してほしい (Yoshida et al. 2021; Muranaka et al. 2022; 吉田 2023; 村中 2023)。

第2の生存戦略は、休眠芽 (殖芽, turion) による生存である。多くの水生植物は、厳しい環境条件に対して休眠芽を発達させることができており、ウキクサ植物も同様の戦略をとる。休眠芽はフロンド内部に存在する分裂組織から通常のフロンドの代わりに発達する器官であり、その発達過程では過剰なアントシアニンおよびデンプンの蓄積を伴う。また、通常フロンドで発達する気泡組織が形成されないため、成熟すると親フロンドから離脱して水底に沈み、越冬あるいは環境条件 (光、温度、栄養状態など) が改善されるまで成長を停止する。特にウキクサ (*S. polyrhiza*) においては、研究が盛んに行われている。休眠はリン欠乏、重金属ストレス、低温など、様々な環境条件によって誘導されることが知られており、それらの条件下で網羅的な遺伝子発現変動解析も精力的に進められている (Fang et al. 2025)。これらの処理条件で内生アブシシン酸 (ABA) 濃度が上昇すること、また外因的に ABA を処理することで休眠芽形成が誘導されることから、ABA は休眠芽発達の主要な制御ホルモンであると考えられている (Wang and Messing 2012)。*S. polyrhiza* の休眠芽形成および生理については、Ziegler の総説に詳細がまとめられている (Ziegler 2024)。成熟した休眠芽は生育環境を改善しても直ちに発芽して生育を再開するわけではない。これは樹木などの越冬芽と同様に内性休眠 (endodormancy) の状態にあり、能動的な休眠機構が働いているためである。長期の低温処理などにより休眠が打破され、光刺激などの環境シグナルで発芽が誘導されると、春季に水面へ浮上し、一斉に増殖を開始する (Appenroth et al. 1989; Appenroth and Augsten 1991)。筆者らのグループは典型的な休眠芽を発達させるキタゴニコウキクサ (*Le. turionifera*) を対象として休眠誘導の分子機構の解明を進めている。*Le. turionifera* では、*S. polyrhiza* と同様に ABA 処理や低温条件に加え、我々の検討では短日条件によっても休眠誘導が引き起こされることを見出している。*S. polyrhiza* では光周期に応答した休眠の誘導は観察されていない (Appenroth 2003)。*Le. turionifera* は高緯度地域に分布する種であり、日本では主に東北地方および北海道に分布している。筆者らは *Le. turionifera* の安定形質転換系の確立にも成功しており、*Le. aequinoctialis* における短日依存性花成誘導機構と比較しながら、ウキクサ植物における季節応答 (光周期) 機構の分子基盤解明を目指している。なお、休眠芽には乾燥重量の 60–70%に相当するデンプンが蓄積することが報告されており、その発達制御機構は応用的観点からも極めて重要な研究課題である。

4-4. ウキクサホロビオントの理解と環境浄化・バイオマス生産への応用研究

ウキクサ植物は水生植物モデルとしてだけでなく、植物と共に共生・付着する微生物群を一体の生態系単位として捉える「ウキクサホロビオント (duckweed holobiont)」研究のモデルとして注目されている。ウキクサ植物は無菌化が容易であり、一般的な陸上植物と異なり、微生物群集との相互作用を制御・再構成できる優れた実験系を構築できる。ウキクサ表面の細菌群は陸上植物の葉に存在する細菌群と類似していることも報告されている (Acosta et al. 2020)。ムラサキコウキクサ (*Lemna japonica*) 5512 株では、表面に定着する細菌群の中から代表的な細菌種を選定し、合成細菌群 (SynCom) システムが構築されている (Ishizawa et al.

2020）。構築した SynCom はウキクサの生育に影響を与えることが確認されており、ウキクサをモデル植物として、植物と微生物の相互作用を詳細に解析するための新たな実験系となっている (Ishizawa et al. 2025)。さらに、ウキクサから分離されたいいくつかの細菌株が植物成長促進作用 (Plant Growth-Promoting Effect) を示すことも報告されており (Suzuki et al. 2014; Toyama et al. 2017; Makino et al. 2022)，これらの微生物はウキクサ自身の生育促進やストレス耐性向上に寄与することが明らかになっている。その分子メカニズムについては、ウキクサ植物と微生物の双方の側面から解析が進められている。(Ishizawa et al. 2017a)。ここで留意すべき点として、日本の環境工学分野の研究者が細菌の成長促進効果を評価する際に用いる自然環境水の組成に近い貧栄養条件の modified Hoagland 培地と、Sigma 社が販売する Hoagland 培地 No2 (Cat# H2395) の組成は大きく異なるため、文献参照時には混同しないよう注意が必要である。これらの研究は、ウキクサ植物—微生物共生機構の理解にとどまらず、栄養塩類や有機汚染物質の除去など、水質浄化における機能的役割の解析にも応用されている (Ishizawa et al. 2017b; Acosta et al. 2023)。近年では、これらの研究を社会実装へと展開する取り組みとして、国際科学技術協力プログラム (SATREPS) 「タイ国・生物循環グリーン経済実現に向けたウキクサホロビオント資源価値の包括的開拓 (JPMJSA2004)」が進行中である。本プロジェクトではタイ国のカセサート大学やマヒドン大学などと連携し、ウキクサとその共生微生物を基盤とした資源循環型社会の構築を目指している。筆者らのグループも本プロジェクトに参画しており、タイ国におけるウキクサ植物の種の多様性や (Senayai et al. 2025)，ウキクサホロビオントの多様性・機能解析を通じてウキクサ+ホロビオントのバンクを構築し (Bunyoo et al. 2022; Ishizawa et al. 2025)，低炭素型水処理、バイオマス生産、機能性物質利用などの応用研究を推進している (Ooi et al. 2024; Ishizawa et al. 2025)。タイ国では古くからミジンコウキクサ (*Wolffia globosa*) を食用利用しており、その必須アミノ酸含有量はダイズなど従来の植物性タンパク源と比べても高いことが報告されている (Boonarsa et al. 2024)。また、動物性食品に含まれるビタミン B12 を *W. globosa* からも摂取できることが近年明らかとなった。*W. globosa* 自身がビタミン B12 を生産している可能性が考えられていたが (Sela et al. 2020)，解析の結果、ウキクサに付着した細菌群が協調的にビタミン B12 を生産していることが明らかとなっている。(Appenroth et al. 2017, 2018)。高品質な食用の *W. globosa* を持続的に大量培養するシステムの構築も、SATREPS プロジェクトの達成目標に含まれている。中国では、水田稲作におけるウキクサの施肥の効率化や雑草防除に関する研究が進められている (Wang et al. 2022, 2023; Xu et al. 2024; Jing et al. 2024)。近年、日本の水田でも持続可能な稲作の有機農法として、ウキクサ *S. polystachya* を雑草防除用のリビングマルチとして利用する試みが報告されている。本報告では、ウキクサリビングマルチを単に雑草防除のための物理的なシートとして利用するだけでなく、不耕起栽培、イネの直播きと組み合わせることで、シアノバクテリアの窒素固定に由来する窒素源をウキクサ個体内に一旦吸収させ、イネの出穂期にウキクサを枯死・分解させることで最終的に肥料としてイネに吸収させることで持続可能な収量増大が期待できるとしている。(陶 and 小松崎 2023)

4-5. ウキクサ進化と植物ホルモン応答の理解

ウキクサ植物の極端なサイズ縮小と形態の特殊化は、陸上植物の形態形成過程や器官発達の進化的理解に新たな視点を提供する。ウキクサ植物は水生環境に高度に適応する過程で、祖先型と考えられている *S. polyrhiza* から根の数が減少し、ミジンコウキクサ属 (*Wolffia*) や *Wolffiella* 属では維管束などの主要な組織系も完全に失っている。このような形態的多様性と段階的な器官喪失は、被子植物における根や維管束形成の分子基盤を比較進化学的に解析するのに理想的なモデルである。実際、根の発生や維管束形成に関する遺伝子群の発現解析から、根を欠く *Wolffia australiana* ではオーキシン輸送およびシグナル伝達経路の主要な構成要素 (auxin efflux carrier PIN 遺伝子群、転写因子 WOX5, PLT など) の一部が欠失または転写レベルで抑制されていることが明らかとなっている (Michael et al. 2021; Lam and Michael 2022)。さらに、近年の一細胞レベルの発現解析により、ウキクサフロンドにおける細胞型の分化地図が明らかになり、茎頂分裂組織様の領域や表皮・気孔形成細胞の分化経路が明確になりつつある (Denyer et al. 2024)。特に、ウキクサでは他の被子植物とは異なり、気孔がフロンドの向軸側（上面）に限定して形成されることは古くから知られており、これは浮遊生活への形態的な適応として重要である。この気孔形成様式の分子基盤についても、SPCH や FAMA などの気孔発達制御因子の発現領域や制御ネットワークの比較から、陸上植物とは異なる発達制御機構の存在が示唆されている。また、*Wolffia* 属では、サイトカイニンおよびオーキシンのシグナル伝達系に関する遺伝子の一部がゲノムレベルで欠失していることが報告されており (Park et al. 2021; Li et al. 2023)，植物ホルモン応答経路の再構築が極端な器官喪失と密接に関連している可能性が指摘されている。これらの知見は、ウキクサ植物が単なる「極小植物」ではなく、植物器官形成の最小限モデル (minimal morphogenetic system known angiosperm) として位置づけられ、陸上植物の器官多様化・適応進化の理解における新たな実験的基盤を提供している。

5. ウキクサ植物遺伝資源の整備と保存の試み

これまで述べてきた通り、研究に用いるウキクサ種の選択は重要であるが、さらに同種内の採取地域の異なる株 (clone) 間に見られる表現型多様性を活用することも重要である。実際、比較的狭い地域で独立に取得された同一種のウキクサであっても環境耐性などに顕著な多様性が現れることが報告されている (Sree et al. 2015; Bog et al. 2022a)。多くのウキクサ種で種子形成が困難で、遺伝学的解析に成約があるものの、自然変異集団由来の多様な株を比較することで、基礎的知見の深化および応用研究の発展が期待できる。現在、各ウキクサ種において国際的に用いられる基準株 (clone) は十分に確立されておらず、ウキクサ研究者コミュニティでは、論文投稿時に使用株の種名、採取地、株名 (clone 名) を明示することを推奨している。また、使用した株の長期的維持も強く推奨されている。

Elias Landolt 博士は数百におよぶウキクサコレクションを構築し、各株に 4 枝の識別番号 (Landolt 番号) を付与した。これらの多くは Rutgers Duckweed Stock Cooperative (RDSC) など複数の国際的機関により維持されており、登録リストも公開されている。近年までは、新規株を用いた研究成果を発表する際、RDSC への登録が国際的に推奨され、登録株には Landolt

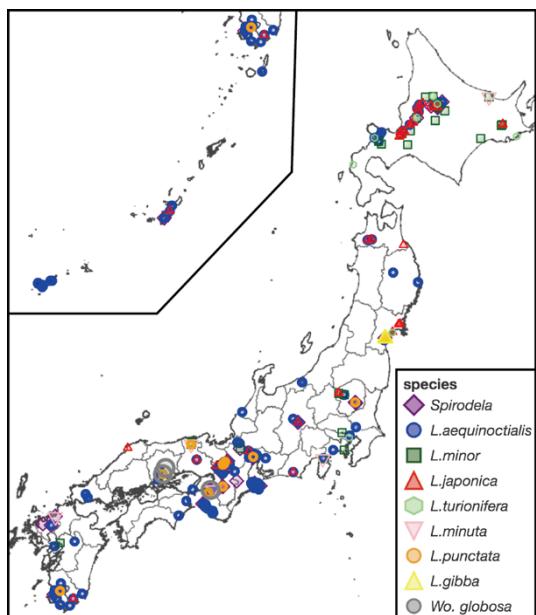


図5. 国内で採取され研修室で維持しているウキクサ植物の地理的分布

31種180株の野生株に加え、*Lemna minor*, *Le. turionifera*, *Le. japonica*を背景株とする形質転換株約300株を無菌条件下で維持している(図5)。保持している野生株リストは研究室WEBサイト(http://cosmos.bot.kyoto-u.ac.jp/clock/research/map_duckweed.html)にて公開している。

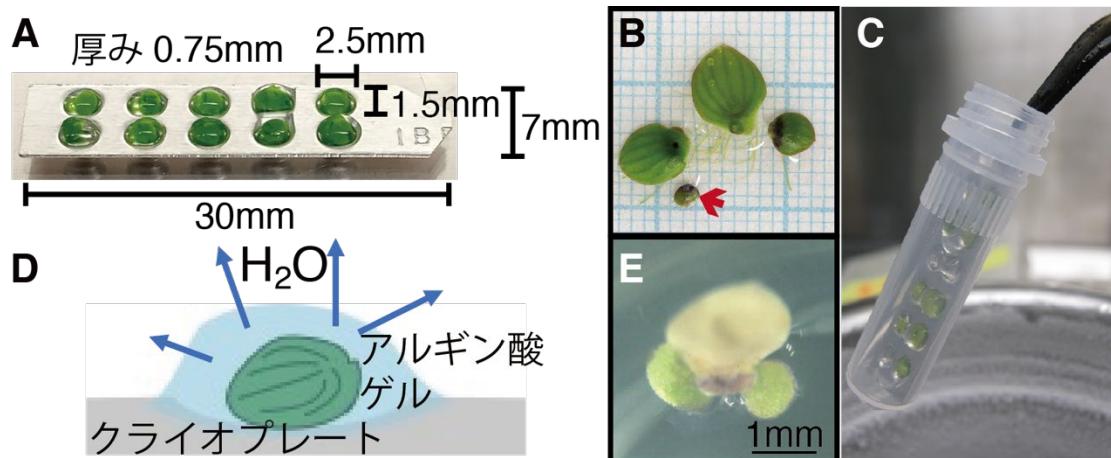


図6. ウキクサ植物のクライオプレートを用いたビーズガラス化凍結保存法

A: アルミニウムクライオプレート上でウキクサフロンドをアルギン酸ビーズに包埋。B: ウキクサ *S. polyrhiza* のコロニーからクライオプレートの窓みに入る極小サイズの子フロンドを使用する。C: 急速凍結に用いる2.0mLのクライオチューブ。D: ビーズ包埋後にPVS2液に浸しビーズ内と植物体内の水分をPVS2液に置換(20~40分間。種に依存) E: 急速解凍後、1%ショ糖入りNF培地で4日間培養した植物極小のフロンドのポケットから子フロンドが復活している。

ウキクサ株の維持は通常、継代培養が用いられるが、液体・寒天培地や生育条件の最適化により継代頻度を低減する工夫が各研究室で行われている。それでもなお、雑菌混入や取り違え、突然変異の発生による形質の変化など、株維持上の課題は残されている。

近年、これらの課題を克服する手法として、液体窒素下でのガラス化低温保存方法の導入が検討されている。Peterson らは 4 属、8 種 2 雜種 21 株について、アルミホイルと Plant Vitrification Solution 3 (PVS3) (Nishizawa et al. 1993) を用いたウキクサのバルク保存法の成功例を報告している (Peterson et al. 2023)。筆者らのグループも、農研機構の田中大介博士との共同研究により、アルミ製クライオプレートと PVS2 (Sakai et al. 1990) を用いたビーズガラス化法により、ウキクサ科 5 属にわたる複数株の長期保存と再生育に成功している (未発表)。本法では、極小クライオプレートとアルギン酸ビーズ包埋による、フロンドサイズ、ビーズの体積の均一化 (図 6) により、脱水および冷却効率を均一化し、高い再現性を得ている。極小の未熟フロンドの大部分の細胞は復活しないが、分裂組織付近は生存し、再生培地で 1 週間以内に新たな子フロンドが再生する (図 6E)。特に日本に分布する *S. polyrhiza*, *La. punctata*, *Le. minor*, *Le. turionifera*, *Le. japonica* では再生育率がほぼ 100% に達し, *Le. gibba*, *Le. minuta*, *Le. aequinoctialis*, *Wolffia globosa* においても実用レベルの再生が確認されている。さらに、*Le. minor*, *Le. turionifera*, *Le. japonica* を背景とする形質転換株についても長期保存が可能であり、これらは基礎生物学研究所に設置された、「大学連携バイオバックアッププロジェクト (IBBP)」も利用し、安全に保管されている。このような保存技術および貴重な遺伝資源の整備は、基礎・応用研究の持続的発展に資するものであり、今後、新規研究者が安心してウキクサ研究に参入できる基盤となる。

6. モデル植物としての確立への課題

ウキクサ植物を用いた基礎・応用研究において、第 7 回国際ウキクサ会議 (7th ICDRA 2024) では Klaus-J. Appenroth 博士が今後解決すべき 9 つの課題を提起された。同様の議論は、国内のウキクサ研究会においても活発に進められている。最後に、それらの主要な課題について簡潔に触れておきたい。

- 1 : 培養スケールアップの課題。ウキクサは水面付近で 2 次元的に増殖するため、広大な培養池を利用するのか、あるいは安定した多層型の培養システムの構築が必要である。
- 2 : 高タンパク質化 or 高デンプン化。好適条件下では高タンパク質含有量を示す一方、休眠誘導のセクションでも述べたが、ストレス応答でデンプンを多量に蓄積する。同時達成は困難であり、目的に応じた最適な種および株 (clone) の選抜システムが必要である。
- 3 : 種・種内分類の混乱。ゲノム解析や倍数性解析の進展が問題の解決に貢献しているが、種内の株の分類に、簡便で信頼の置けるツールの開発が求められる。
- 4 : 種内多型およびゲノム・エピゲノム比較。ウキクサ *S.p.* 種内の 100 以上の株間のゲノム配列比較が行われたが驚くほど配列の多様性が低かった。一方表現型の多様性、可塑性は高くエピジェネティックな変化がその原因になっていると考えられる。他の種に関しては種内の株のゲノムサイズ多様性もあり、比較可能な情報がそもそも少ない。
- 5 : 安定形質転換体の安定利用と維持問題。マーカー遺伝子を用いた形質転換成功報告は蓄積しているが、株依存性が高く、その原因も解明されていない。また、実際に形質転換体を用いて基礎研究を進めた例、有用物質生産に実用化した例は少ない。作出了した形質転換植物の維持と研究者間の共有方法の整備も必要である。

- 6 : 1 細胞オミクス解析技術。ウキクサの増殖、発達様式の理解のための 1 細胞レベルの遺伝子発現解析も進めていく必要がある。
- 7 : ウキクサホロビオントの理解と利用。ウキクサ表面（根、フロンド裏・表）に存在する微生物叢との相互作用に関する微生物・ウキクサ双方の知見の蓄積が必要である。
- 8 : 下・排水の処理へのウキクサ利用。排水はウキクサ植物にとっての肥料であり、持続可能な排水処理とウキクサバイオマス生産、エネルギー生産システムの開発が必要である。
- 9 : 人類の新たな栄養資源としてのウキクサ植物。タンパク質含量の増加、消化吸収を妨げる抗栄養成分の特定、収穫や収穫後の輸送・加工技術の開発が必要である。

7. 終わりに

ウキクサ研究は、古典的な植物生理学から分子・生態・応用科学を包括する学際的研究領域へと再興を遂げつつある。本稿で取り上げきれなかったホットな研究分野が数多く存在する。すべての関連研究を網羅的に紹介することはできなかつたことについてはご容赦いただきたい。国際的なウキクサ研究をまとめたニュースレターに Duckweed Forum (DF) が 1 年に 4 回出版されているので、興味のある読者は是非, Rutgers Duckweed Stock Cooperative (RDSC) の WEB サイト (<http://www.ruduckweed.org/>) から参照されたい。本稿が、上記の課題に対して基礎・応用の両面から解決に向けて貢献しようとする研究者の増加を促し、ウキクサ植物を新たな研究対象として導入する契機となれば幸いである。

謝辞

筆者はシロイヌナズナを扱う研究者であったが、京都大学に赴任後初めてウキクサ植物を扱うようになった。研究室でウキクサ研究へ導いてくださり、これまで共同で研究を支えてくださった小山時隆博士、村中智明博士及び関係者の皆様に感謝申し上げる。ウキクサ形質転換の成功と研究発展の契機となった *Lemna japonica* 5512 株を分与いただいた北海道大学の森川正章博士には、特に厚く御礼申し上げる。ガラス化凍結保存に関しては農研機構の田中大介博士から技術協力と貴重なご助言を賜った。ここに深く感謝する。また、本稿の内容に関して情報提供と今後の課題についてのご議論・ご助言をくださった Klaus-J. Appenroth 博士に深く感謝申し上げる。さらに、シンポジウム「環境ストレスに対する植物の生体応答の柔軟性」を企画され、BSJ-Review に寄稿する機会をくださった奈良先端科学技術大学の山口暢俊博士、久保田茜博士、日本植物学会電子出版物編集委員会の皆様に、心より厚く御礼申し上げる。

引用文献

- Abramson BW, Novotny M, Hartwick NT, Colt K, Aevermann BD, Scheuermann RH, Michael TP (2022) The genome and preliminary single-nuclei transcriptome of *Lemna minuta* reveals mechanisms of invasiveness. *Plant Physiol* 188: 879–897. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab564>
- Acosta K, Appenroth KJ, Borisjuk L, Edelman M, Heinig U, Jansen MAK, Oyama T, Pasaribu B, Schubert I, Sorrels S, et al (2021) Return of the Lemnaceae: duckweed as a model plant system in the

- genomics and postgenomics era. *The Plant Cell* 33: 3207–3234.
<https://doi.org/10.1093/plcell/koab189>
- Acosta K, Sorrels S, Chrisler W, Huang W, Gilbert S, Brinkman T, Michael TP, Lebeis SL, Lam E (2023) Optimization of Molecular Methods for Detecting Duckweed-Associated Bacteria. *Plants* 12: 872. <https://doi.org/10.3390/plants12040872>
- Acosta K, Xu J, Gilbert S, Denison E, Brinkman T, Lebeis S, Lam E (2020) Duckweed hosts a taxonomically similar bacterial assemblage as the terrestrial leaf microbiome. *PLoS ONE* 15: e0228560. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228560>
- Appenroth K-J (2003) No photoperiodic control of the formation of turions in eight clones of *Spirodela polyrhiza*. *Journal of Plant Physiology* 160: 1329–1334. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-01035>
- Appenroth K-J, Augsten H (1991) Photophysiology of turion germination in *Spirodela polyrhiza* (L.) Schleiden IX. Interaction of light and gibberellic acid in the removal of dormancy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 11: 343–351. [https://doi.org/10.1016/1011-1344\(91\)80039-K](https://doi.org/10.1016/1011-1344(91)80039-K)
- Appenroth K-J, Opfermann J, Hertel W, Augsten H (1989) Photophysiology of Turion Germination in *Spirodela polyrhiza* (L.) SCHLEIDEN. II. Influence of After-ripening on Germination Kinetics. *Journal of Plant Physiology* 135: 274–279. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(89\)80118-X](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(89)80118-X)
- Appenroth K-J, Sree KS, Bog M, Ecker J, Seeliger C, Böhm V, Lorkowski S, Sommer K, Vetter W, Tolzin-Banasch K, et al (2018) Nutritional Value of the Duckweed Species of the Genus Wolffia (Lemnaceae) as Human Food. *Front Chem* 6: 483. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00483>
- Appenroth K-J, Sree KS, Böhm V, Hammann S, Vetter W, Leiterer M, Jahreis G (2017) Nutritional value of duckweeds (Lemnaceae) as human food. *Food Chemistry* 217: 266–273. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.116>
- Baggs EL, Tiersma MB, Abramson BW, Michael TP, Krasileva KV (2022) Characterization of defense responses against bacterial pathogens in duckweeds lacking EDS1. *New Phytologist* 236: 1838–1855. <https://doi.org/10.1111/nph.18453>
- Balaji P, Satheeshkumar PK, Venkataraman K, Vijayalakshmi MA (2016) Expression of anti-tumor necrosis factor alpha (TNF α) single-chain variable fragment (scFv) in *Spirodela punctata* plants transformed with *Agrobacterium tumefaciens*. *Biotech and App Biochem* 63: 354–361. <https://doi.org/10.1002/bab.1373>
- Bergmann BA, Cheng J, Classen J, Stomp A-M (2000) In vitro selection of duckweed geographical isolates for potential use in swine lagoon effluent renovation. *Bioresource Technology* 73: 13–20. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00137-6](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00137-6)
- Bog M, Appenroth K-J, Schneider P, Sree KS (2022a) Intraspecific Diversity in Aquatic Ecosystems: Comparison between *Spirodela polyrhiza* and *Lemna minor* in Natural Populations of Duckweed. *Plants (Basel)* 11: 968. <https://doi.org/10.3390/plants11070968>
- Bog M, Braglia L, Morello L, Noboa Melo KI, Schubert I, Shchepin ON, Sree KS, Xu S, Lam E, Appenroth KJ (2022b) Strategies for Intraspecific Genotyping of Duckweed: Comparison of Five

- Orthogonal Methods Applied to the Giant Duckweed *Spirodela polyrhiza*. Plants 11: 3033. <https://doi.org/10.3390/plants11223033>
- Bog M, Lautenschlager U, Landrock MF, Landolt E, Fuchs J, Sowjanya Sree K, Oberprieler C, Appenroth K-J (2015) Genetic characterization and barcoding of taxa in the genera *Landoltia* and *Spirodela* (Lemnaceae) by three plastidic markers and amplified fragment length polymorphism (AFLP). Hydrobiologia 749: 169–182. <https://doi.org/10.1007/s10750-014-2163-3>
- Bog M, Sree KS, Fuchs J, Hoang PTN, Schubert I, Kuever J, Rabenstein A, Paolacci S, Jansen MAK, Appenroth K (2020) A taxonomic revision of *Lemna* sect. *Uninerves* (Lemnaceae). TAXON 69: 56–66. <https://doi.org/10.1002/tax.12188>
- Boonarsa P, Bunyatratchata A, Chumroenphat T, Thammapat P, Chaikwang T, Siripan T, Li H, Siriamornpun S (2024) Nutritional Quality, Functional Properties, and Biological Characterization of Watermeal (*Wolffia globosa*). Horticulturae 10: 1171. <https://doi.org/10.3390/horticulturae10111171>
- Braglia L, Breviario D, Giani S, Gavazzi F, De Gregori J, Morello L (2021a) New Insights into Interspecific Hybridization in *Lemna* L. Sect. *Lemna* (Lemnaceae Martinov). Plants 10: 2767. <https://doi.org/10.3390/plants10122767>
- Braglia L, Ceschin S, Iannelli MA, Bog M, Fabriani M, Frugis G, Gavazzi F, Giani S, Mariani F, Muzzi M, et al (2024) Characterization of the cryptic interspecific hybrid *Lemna* × *mediterranea* by an integrated approach provides new insights into duckweed diversity. Journal of Experimental Botany 75: 3092–3110. <https://doi.org/10.1093/jxb/erae059>
- Braglia L, Lauria M, Appenroth KJ, Bog M, Breviario D, Grasso A, Gavazzi F, Morello L (2021b) Duckweed Species Genotyping and Interspecific Hybrid Discovery by Tubulin-Based Polymorphism Fingerprinting. Front Plant Sci 12: 625670. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.625670>
- Bunyoo C, Roongsattham P, Khumwan S, Phonmakham J, Wonnarinij P, Thamchaipenet A (2022) Dynamic Alteration of Microbial Communities of Duckweeds from Nature to Nutrient-Deficient Condition. Plants 11: 2915. <https://doi.org/10.3390/plants11212915>
- Canto-Pastor A, Molla-Morales A, Ernst E, Dahl W, Zhai J, Yan Y, Meyers BC, Shanklin J, Martienssen R (2015a) Efficient transformation and artificial miRNA gene silencing in *Lemna minor*. Plant Biol (Stuttg) 17 Suppl 1: 59–65. <https://doi.org/10.1111/plb.12215>
- Canto-Pastor A, Molla-Morales A, Ernst E, Dahl W, Zhai J, Yan Y, Meyers BC, Shanklin J, Martienssen R (2015b) Efficient transformation and artificial miRNA gene silencing in *Lemna minor*. Plant biology 17 Suppl 1: 59–65. <https://doi.org/10.1111/plb.12215>
- Chhabra G, Chaudhary D, Sainger M, Jaiwal PK (2011) Genetic transformation of Indian isolate of *Lemna minor* mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and recovery of transgenic plants. Physiology and molecular biology of plants : an international journal of functional plant biology 17: 129–36. <https://doi.org/10.1007/s12298-011-0059-5>
- Cleland CF, Briggs WR (1967) Flowering Responses of the Long-day Plant *Lemna gibba* G3. Plant Physiol 42: 1553–1561. <https://doi.org/10.1104/pp.42.11.1553>

- Denyer T, Wu P-J, Colt K, Abramson BW, Pang Z, Solansky P, Mamerto A, Nobori T, Ecker JR, Lam E, et al (2024) Streamlined spatial and environmental expression signatures characterize the minimalist duckweed *Wolffia australiana*. *Genome Res* 34: 1106–1120. <https://doi.org/10.1101/gr.279091.124>
- Dombey R, Buendía-Ávila D, Barragán-Borrero V, Diezma-Navas L, Ponce-Mañe A, Vargas-Guerrero JM, Elias R, Marí-Ordóñez A (2025) Atypical epigenetic and small RNA control of degenerated transposons and their fragments in clonally reproducing *Spirodela polyrhiza*. *Genome Res* 35: 522–544. <https://doi.org/10.1101/gr.279532.124>
- Ernst E, Abramson B, Acosta K, Hoang PTN, Mateo-Elizalde C, Schubert V, Pasaribu B, Albert PS, Hartwick N, Colt K, et al (2025) Duckweed genomes and epigenomes underlie triploid hybridization and clonal reproduction. *Current Biology* 35: 1828–1847.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2025.03.013>
- Fang X, Hong Y, Fang Y, Cheng L, Li Z, Li C, Ban X (2025) Transcriptomic and Metabolic Analysis Reveal Potential Mechanism of Starch Accumulation in *Spirodela polyrhiza* Under Nutrient Stress. *Plants* 14: 1617. <https://doi.org/10.3390/plants14111617>
- Fourounjian P, Slovin J, Messing J (2021) Flowering and Seed Production across the Lemnaceae. *IJMS* 22: 2733. <https://doi.org/10.3390/ijms22052733>
- Harkess A, McLoughlin F, Bilkey N, Elliott K, Emenecker R, Mattoon E, Miller K, Czymmek K, Vierstra RD, Meyers BC, et al (2021) Improved *Spirodela polyrhiza* genome and proteomic analyses reveal a conserved chromosomal structure with high abundance of chloroplastic proteins favoring energy production. *Journal of Experimental Botany* 72: 2491–2500. <https://doi.org/10.1093/jxb/erab006>
- Heenatigala PPM, Yang J, Bishopp A, Sun Z, Li G, Kumar S, Hu S, Wu Z, Lin W, Yao L, et al (2018) Development of Efficient Protocols for Stable and Transient Gene Transformation for *Wolffia Globosa* Using Agrobacterium. *Front Chem* 6: 227. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00227>
- Hoang PNT, Michael TP, Gilbert S, Chu P, Motley ST, Appenroth KJ, Schubert I, Lam E (2018) Generating a high-confidence reference genome map of the Greater Duckweed by integration of cytogenomic, optical mapping, and Oxford Nanopore technologies. *The Plant Journal* 96: 670–684. <https://doi.org/10.1111/tpj.14049>
- Hoang PTN, Fiebig A, Novák P, Macas J, Cao HX, Stepanenko A, Chen G, Borisjuk N, Scholz U, Schubert I (2020) Chromosome-scale genome assembly for the duckweed *Spirodela intermedia*, integrating cytogenetic maps, PacBio and Oxford Nanopore libraries. *Sci Rep* 10: 19230. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75728-9>
- Hoang PTN, Schubert V, Meister A, Fuchs J, Schubert I (2019) Variation in genome size, cell and nucleus volume, chromosome number and rDNA loci among duckweeds. *Sci Rep* 9: 3234. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39332-w>

- Horikawa Y, Watanabe E, Ito S, Oyama T (2025) Model-based analysis of the circadian rhythm generation of bioluminescence reporter activity in duckweed. *Plant Biotechnology* 42: 173–177. <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.24.1226a>
- Ishizawa H, Kuroda M, Morikawa M, Ike M (2017a) Differential oxidative and antioxidative response of duckweed *Lemna minor* toward plant growth promoting/inhibiting bacteria. *Plant Physiology and Biochemistry* 118: 667–673. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.08.006>
- Ishizawa H, Kuroda M, Morikawa M, Ike M (2017b) Evaluation of environmental bacterial communities as a factor affecting the growth of duckweed *Lemna minor*. *Biotechnol Biofuels* 10: 62. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0746-8>
- Ishizawa H, Saimee Y, Sugiyama T, Kojima T, Inoue D, Ike M, Thamchaipenet A, Morikawa M (2025) Duckweed as an Emerging Model System for Plant–Microbiome Interactions. *Environmental Microbiology* 27: e70181. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.70181>
- Ishizawa H, Tada M, Kuroda M, Inoue D, Futamata H, Ike M (2020) Synthetic Bacterial Community of Duckweed: A Simple and Stable System to Study Plant-microbe Interactions. *Microb Environ* 35: n/a. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME20112>
- Isoda M, Ito S, Oyama T (2022) Interspecific divergence of circadian properties in duckweed plants. *Plant Cell & Environment* 45: 1942–1953. <https://doi.org/10.1111/pce.14297>
- Isoda M, Oyama T (2018) Use of a duckweed species, *Wolffiella hyalina*, for whole-plant observation of physiological behavior at the single-cell level. *Plant Biotechnology* 35: 387–391. <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.18.0721a>
- Ito-Miwa K, Serikawa M, Kondo T, Oyama T (2014) Overexpression of a *CO* homologue disrupts the rhythmic expression of clock gene *LgLHYH1* in *Lemna gibba*. *Plant Biotechnology* 31: 319–328. <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.14.1111a>
- Jing L, Wang X, Zhao Y, Li F, Su Y, Cai Y, Zhao F, Dong G, Yang L, Wang Y (2024) Impact of Duckweed (*Lemna minor* L.) Growing in Paddy Fields on Rice Yield and Its Underlying Causes. *Agronomy* 14: 726. <https://doi.org/10.3390/agronomy14040726>
- Khvatkov P, Firsov A, Shvedova A, Kozlov O, Chernobrovkina M, Pushin A, Shaloiko L, Dolgov S (2021) *Wolffia arrhiza* as a promising producer of recombinant hirudin. *3 Biotech* 11: 209. <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02762-3>
- Khvatkov P, Firsov A, Shvedova A, Shaloiko L, Kozlov O, Chernobrovkina M, Pushin A, Tarasenko I, Chaban I, Dolgov S (2018) Development of *Wolffia arrhiza* as a Producer for Recombinant Human Granulocyte Colony-Stimulating Factor. *Front Chem* 6: 304. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00304>
- Ko S-M, Sun H-J, Oh MJ, Song I-J, Kim M-J, Sin H-S, Goh C-H, Kim Y-W, Lim P-O, Lee H-Y (2011a) Expression of the protective antigen for PEDV in transgenic duckweed, *Lemna minor*. *Horticulture, Environment, and Biotechnology* 52: 511

- Ko S-M, Sun H-J, Oh MJ, Song I-J, Kim M-J, Sin H-S, Goh C-H, Kim Y-W, Lim P-O, Lee H-Y, et al (2011b) Expression of the protective antigen for PEDV in transgenic duckweed, *Lemna minor*. *Hortic Environ Biotechnol* 52: 511. <https://doi.org/10.1007/s13580-011-0007-x>
- Kozlov ON, Mitiouchkina TYu, Tarasenko IV, Shaloiko LA, Firsov AP, Dolgov SV (2019) Agrobacterium-Mediated Transformation of *Lemna minor* L. with Hirudin and β -Glucuronidase Genes. *Appl Biochem Microbiol* 55: 805–815. <https://doi.org/10.1134/S0003683819080076>
- Kubota A, Ishizaki K, Hosaka M, Kohchi T (2013) Efficient Agrobacterium-mediated transformation of the liverwort *Marchantia polymorpha* using regenerating thalli. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 77: 167–72. <https://doi.org/10.1271/bbb.120700>
- Lam E, Michael TP (2022) Wolffia, a minimalist plant and synthetic biology chassis. *Trends in Plant Science* 27: 430–439. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2021.11.014>
- Landolt E, Kandeler R (1987) Biosystematic investigations in the family of duckweeds ("Lemnaceae"). Vol. 4: The family of "Lemnaceae": a monographic study. Volume 2. <https://doi.org/10.5169/SEALS-308870>
- Lee Y, Kato S, Kim JY, Shimono Y, Shiga T (2024) Two lineages of *Lemna aequinoctialis* (Araceae, Lemnoideae) based on physiology, morphology, and phylogeny. *J Plant Res* 137: 359–376. <https://doi.org/10.1007/s10265-023-01509-w>
- Li F, Yang J-J, Sun Z-Y, Wang L, Qi L-Y, A S, Liu Y-Q, Zhang H-M, Dang L-F, Wang S-J, et al (2023) Plant-on-chip: Core morphogenesis processes in the tiny plant *Wolffia australiana*. *PNAS Nexus* 2: pgad141. <https://doi.org/10.1093/pnasnexus/pgad141>
- Liang Y, Yu X, Anaokar S, Shi H, Dahl WB, Cai Y, Luo G, Chai J, Cai Y, Mollá-Morales A, et al (2023) Engineering triacylglycerol accumulation in duckweed (*Lemna japonica*). *Plant Biotechnology Journal* 21: 317–330. <https://doi.org/10.1111/pbi.13943>
- Liu Y, Wang Y, Xu S, Tang X, Zhao J, Yu C, He G, Xu H, Wang S, Tang Y, et al (2019) Efficient genetic transformation and CRISPR /Cas9-mediated genome editing in *Lemna aequinoctialis*. *Plant Biotechnology Journal* 17: 2143–2152. <https://doi.org/10.1111/pbi.13128>
- Makino A, Nakai R, Yoneda Y, Toyama T, Tanaka Y, Meng X-Y, Mori K, Ike M, Morikawa M, Kamagata Y, et al (2022) Isolation of Aquatic Plant Growth-Promoting Bacteria for the Floating Plant Duckweed (*Lemna minor*). *Microorganisms* 10: 1564. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10081564>
- Mateo-Elizalde C, Lynn J, Ernst E, Martienssen R (2023) Duckweeds. *Current Biology* 33: R89–R91. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2022.12.036>
- Michael TP, Bryant D, Gutierrez R, Borisjuk N, Chu P, Zhang H, Xia J, Zhou J, Peng H, El Baidouri M, et al (2017) Comprehensive definition of genome features in *Spirodela polyrhiza* by high-depth physical mapping and short - read DNA sequencing strategies. *The Plant Journal* 89: 617–635. <https://doi.org/10.1111/tpj.13400>
- Michael TP, Ernst E, Hartwick N, Chu P, Bryant D, Gilbert S, Ortaleb S, Baggs EL, Sree KS, Appenroth KJ, et al (2021) Genome and time-of-day transcriptome of *Wolffia australiana* link morphological

- minimization with gene loss and less growth control. *Genome Res* 31: 225–238. <https://doi.org/10.1101/gr.266429.120>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.104634>
- Muranaka T, Kubota S, Oyama T (2013) A single-cell bioluminescence imaging system for monitoring cellular gene expression in a plant body. *Plant and Cell Physiology* 54: 2085–2093
- Muranaka T, Okada M, Yomo J, Kubota S, Oyama T (2015) Characterisation of circadian rhythms of various duckweeds. *Plant biology* 17 Suppl 1: 66–74. <https://doi.org/10.1111/plb.12202>
- Muranaka T, Oyama T (2018) Monitoring circadian rhythms of individual cells in plants. *J Plant Res* 131: 15–21. <https://doi.org/10.1007/s10265-017-1001-x>
- Muranaka T, Oyama T (2020) Application of Single-Cell Bioluminescent Imaging to Monitor Circadian Rhythms of Individual Plant Cells. In: Ripp S (ed) *Bioluminescent Imaging*. Springer US, New York, NY, pp 231–242
- Muranaka T, Oyama T (2016) Heterogeneity of cellular circadian clocks in intact plants and its correction under light-dark cycles. *Sci Adv* 2: e1600500. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1600500>
- Nishizawa S, Sakai A, Amano Y, Matsuzawa T (1993) Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis L.*) embryogenic suspension cells and subsequent plant regeneration by vitrification. *Plant Science* 91: 67–73. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(93\)90189-7](https://doi.org/10.1016/0168-9452(93)90189-7)
- Okada M, Muranaka T, Ito S, Oyama T (2017) Synchrony of plant cellular circadian clocks with heterogeneous properties under light/dark cycles. *Sci Rep* 7: 317. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00454-8>
- Ooi T, Sato R, Matsumoto K (2024) Utilization of duckweed-derived biomass for polyhydroxybutyrate production in *Escherichia coli* via dual enzymatic saccharification using amylase and cellulase complex. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 88: 1496–1499. <https://doi.org/10.1093/bbb/zbae127>
- Park H, Park JH, Lee Y, Woo DU, Jeon HH, Sung YW, Shim S, Kim SH, Lee KO, Kim J-Y, et al (2021) Genome of the world's smallest flowering plant, *Wolffia australiana*, helps explain its specialized physiology and unique morphology. *Commun Biol* 4: 900. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02422-5>
- Peterson A, Kishchenko O, Kuhlmann M, Tschiersch H, Fuchs J, Tikhenco N, Schubert I, Nagel M (2023) Cryopreservation of Duckweed Genetic Diversity as Model for Long-Term Preservation of Aquatic Flowering Plants. *Plants* 12: 3302. <https://doi.org/10.3390/plants12183302>
- Rival S, Wisniewski J-P, Langlais A, Kaplan H, Freyssinet G, Vancanneyt G, Vunsh R, Perl A, Edelman M (2008) Spirodela (duckweed) as an alternative production system for pharmaceuticals: a case study, aprotinin. *Transgenic Res* 17: 503–513. <https://doi.org/10.1007/s11248-007-9123-x>
- Romano LE, Braglia L, Iannelli MA, Lee Y, Gianì S, Gavazzi F, Morello L (2025) A survey of duckweed species in Southern Italy provided first distribution records of the hybrid *Lemna* ×

- mediterranea in nature. Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics 67: 125863. <https://doi.org/10.1016/j.ppees.2025.125863>
- Sakai A, Kobayashi S, Oiyama I (1990) Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. Plant Cell Reports 9. <https://doi.org/10.1007/BF00232130>
- Schmid MW, Moradi A, Leigh DM, Schuman MC, Van Moorsel SJ (2024) Covering the bases: Population genomic structure of *Lemna minor* and the cryptic species *L. japonica* in Switzerland. Ecology and Evolution 14: e11599. <https://doi.org/10.1002/ece3.11599>
- Sela I, Yaskolka Meir A, Brandis A, Krajmalnik-Brown R, Zeibich L, Chang D, Dirks B, Tsaban G, Kaplan A, Rinott E, et al (2020) Wolffia globosa-Mankai Plant-Based Protein Contains Bioactive Vitamin B12 and Is Well Absorbed in Humans. Nutrients 12: 3067. <https://doi.org/10.3390/nu12103067>
- Senayai A, Harnvanichvech Y, Vajrodaya S, Oyama T, Kraichak E (2025) Genetic and Morphological Variation Among Populations of Duckweed Species in Thailand. Plants 14: 2030. <https://doi.org/10.3390/plants14132030>
- 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 Physiology 146: 1952–1963. <https://doi.org/10.1104/pp.107.114611>
- Shvedova AN, Khvatkov PA, Dolgov SV (2023) Optimization of Factors Affecting the Efficiency of Agrobacterium-Mediated Transformation of Wolffia arrhiza. Appl Biochem Microbiol 59: 1177–1182. <https://doi.org/10.1134/S0003683823090089>
- Sree KS, Sudakaran S, Appenroth K-J (2015) How fast can angiosperms grow? Species and clonal diversity of growth rates in the genus Wolffia (Lemnaceae). Acta Physiol Plant 37: 204. <https://doi.org/10.1007/s11738-015-1951-3>
- Stepanenko A, Braglia L, Fuchs J, Schubert V, Hoang PTN, Lee Y, Chen G, Gianì S, Morello L, Schubert I (2025) Genome diversity and evolution of the duckweed section Alatae comprising diploids, polyploids, and interspecific hybrids. Plant J 122: e70158. <https://doi.org/10.1111/tpj.70158>
- Sun Y, Cheng JJ, Himmel ME, Skory CD, Adney WS, Thomas SR, Tisserat B, Nishimura Y, Yamamoto YT (2007) Expression and characterization of *Acidothermus cellulolyticus* E1 endoglucanase in transgenic duckweed *Lemna minor* 8627. Bioresource technology 98: 2866–2872
- Suzuki W, Sugawara M, Miwa K, Morikawa M (2014) Plant growth-promoting bacterium *Acinetobacter calcoaceticus* P23 increases the chlorophyll content of the monocot *Lemna minor* (duckweed) and the dicot *Lactuca sativa* (lettuce). Journal of Bioscience and Bioengineering 118: 41–44. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.12.007>
- Toyama T, Kuroda M, Ogata Y, Hachiya Y, Quach A, Tokura K, Tanaka Y, Mori K, Morikawa M, Ike M (2017) Enhanced biomass production of duckweeds by inoculating a plant growth-promoting

- bacterium, *Acinetobacter calcoaceticus* P23, in sterile medium and non-sterile environmental waters. *Water Science and Technology* 76: 1418–1428. <https://doi.org/10.2166/wst.2017.296>
- Ueno K, Ito S, Oyama T (2022) An endogenous basis for synchronisation characteristics of the circadian rhythm in proliferating *Lemna minor* plants. *New Phytologist* 233: 2203–2215. <https://doi.org/10.1111/nph.17925>
- Van Hoeck A, Horemans N, Monsieurs P, Cao HX, Vandenhoeve H, Blust R (2015) The first draft genome of the aquatic model plant *Lemna minor* opens the route for future stress physiology research and biotechnological applications. *Biotechnol Biofuels* 8: 188. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0381-1>
- Volkova PA, Nachatoi VA, Bobrov AA (2023) Hybrid between *Lemna minor* and *L. turionifera* (*L. × japonica*, *Lemnaceae*) in East Europe is more frequent than parental species and poorly distinguishable from them. *Aquatic Botany* 184: 103593. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2022.103593>
- Vunsh R, Heinig U, Malitsky S, Aharoni A, Avidov A, Lerner A, Edelman M (2015) Manipulating duckweed through genome duplication. *Plant Biol J* 17: 115–119. <https://doi.org/10.1111/plb.12212>
- Vunsh R, Li J, Hanania U, Edelman M, Flaishman M, Perl A, Wisniewski J-P, Freyssinet G (2007) High expression of transgene protein in *Spirodela*. *Plant Cell Rep* 26: 1511–1519. <https://doi.org/10.1007/s00299-007-0361-4>
- Wang F, Wang S, Xu S, Shen J, Cao L, Sha Z, Chu Q (2022) A non-chemical weed control strategy, introducing duckweed into the paddy field. *Pest Management Science* 78: 3654–3663. <https://doi.org/10.1002/ps.7008>
- Wang K-T, Hong M-C, Wu Y-S, Wu T-M (2021) Agrobacterium-Mediated Genetic Transformation of Taiwanese Isolates of *Lemna aequinoctialis*. *Plants* 10: 1576. <https://doi.org/10.3390/plants10081576>
- Wang W, Haberer G, Gundlach H, Gläßer C, Nussbaumer T, Luo MC, Lomsadze A, Borodovsky M, Kerstetter RA, Shanklin J, et al (2014) The *Spirodela polyrhiza* genome reveals insights into its neotenuous reduction fast growth and aquatic lifestyle. *Nat Commun* 5: 3311. <https://doi.org/10.1038/ncomms4311>
- Wang W, Kerstetter RA, Michael TP (2011) Evolution of Genome Size in Duckweeds (*Lemnaceae*). *Journal of Botany* 2011: 1–9. <https://doi.org/10.1155/2011/570319>
- Wang W, Messing J (2012) Analysis of ADP-glucose pyrophosphorylase expression during turion formation induced by abscisic acid in *Spirodela polyrhiza* (greater duckweed). *BMC Plant Biol* 12: 5. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-5>
- Wang Y, Chen X, Guo B, Liu C, Liu J, Qiu G, Fu Q, Li H (2023) Alleviation of aqueous nitrogen loss from paddy fields by growth and decomposition of duckweed (*Lemna minor* L.) after fertilization. *Chemosphere* 311: 137073. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.137073>
- Wang Y, Duchen P, Chávez A, Sree KS, Appenroth KJ, Zhao H, Höfer M, Huber M, Xu S (2024) Population genomics and epigenomics of *Spirodela polyrhiza* provide insights into the evolution of facultative asexuality. *Commun Biol* 7: 581. <https://doi.org/10.1038/s42003-024-06266-7>

- Watanabe E, Isoda M, Muranaka T, Ito S, Oyama T (2021) Detection of Uncoupled Circadian Rhythms in Individual Cells of *Lemna minor* using a Dual-Color Bioluminescence Monitoring System. *Plant and Cell Physiology* 62: 815–826. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcab037>
- Watanabe E, Muranaka T, Nakamura S, Isoda M, Horikawa Y, Aiso T, Ito S, Oyama T (2023) A non-cell-autonomous circadian rhythm of bioluminescence reporter activities in individual duckweed cells. *Plant Physiology* 193: 677–688. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiad218>
- Xu S, Wang F, Ding Y, Liu W, Lan Y, Jia Q, Sun P, Sha Z (2024) An Ecological Weed Control Strategy in Paddy Fields: Light Interception from Duckweed Mulching. *Agronomy* 14: 670. <https://doi.org/10.3390/agronomy14040670>
- Yamamoto YT, Rajbhandari N, Lin X, Bergmann BA, Nishimura Y, Stomp A-M (2001) Genetic transformation of duckweed *Lemna gibba* and *Lemna minor*. In *Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 37: 349–353
- Yang GL, Fang Y, Xu YL, Tan L, Li Q, Liu Y, Lai F, Jin YL, Du AP, He KZ, et al (2018a) Frond transformation system mediated by *Agrobacterium tumefaciens* for *Lemna minor*. *Plant molecular biology* 98: 319–331. <https://doi.org/10.1007/s11103-018-0778-x>
- Yang J, Li G, Hu S, Bishopp A, Heenatigala PPM, Kumar S, Duan P, Yao L, Hou H (2018b) A protocol for efficient callus induction and stable transformation of *Spirodela polyrhiza* (L.) Schleiden using *Agrobacterium tumefaciens*. *Aquatic Botany* 151: 80–86. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2018.08.004>
- Yang J, Zhao X, Li G, Hu S, Hou H (2021) Frond architecture of the rootless duckweed *Wolffia globosa*. *BMC Plant Biol* 21: 387. <https://doi.org/10.1186/s12870-021-03165-5>
- Yang L, Han Y, Wu D, Yong W, Liu M, Wang S, Liu W, Lu M, Wei Y, Sun J (2017) Salt and cadmium stress tolerance caused by overexpression of the Glycine Max Na⁺/H⁺ Antiporter (GmNHX1) gene in duckweed (*Lemna turionifera* 5511). *Aquatic Toxicology* 192: 127–135
- Yoshida A, Taoka K, 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* 12: 697206. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.697206>
- Ziegler P (2024) The Developmental Cycle of *Spirodela polyrhiza* Turions: A Model for Turion-Based Duckweed Overwintering? *Plants* (Basel) 13: 2993. <https://doi.org/10.3390/plants13212993>
- 別府敏夫, 柳瀬大輔, 野渕正, 村田源 (1985) 日本産アオウキクサ類の再検討
吉田明希子 (2023) ウキクサの繁殖メカニズムとその農学的応用. *BSJ Review* 14: 87–99. <https://doi.org/10.24480/bsj-review.14b5.00246>
- 村中智明 (2023) 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. *BSJ Review* 14: 132–142. <https://doi.org/10.24480/bsj-review.14c4.00251>
- 陶武利, 小松崎将一 (2023) 水稻有機栽培におけるウキクサのリビングマルチ利用