

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07217

研究課題名(和文)性特異的マーカーの伝達に着目した雄性両全性異株性の維持機構

研究課題名(英文)A mechanism in the maintenance of androdioecy from the view of a sex-specific marker transmission

研究代表者

三宅 崇 (MIYAKE, Takashi)

岐阜大学・教育学部・准教授

研究者番号：00380569

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：次世代シーケンサにより、性特異的マーカーを開発した。ヘテロ接合となる雄個体に関しては、繁殖ステージで確実に利用できる。ただし野生集団を対象にする際には注意が必要である。性特異的マーカーの伝達に着目して、ヘテロ接合雄個体の生産花粉での比率を調べたが、個体による差が大きく、全体としては1:1からずれなかった。しかし、個体によっては1:1からずれて雄性決定遺伝子を多く伝達する可能性も考えられた。また、雄個体と両性個体の比較では、花粉の発芽率および伸長速度は、ばらつきが大きく、集団や日により結果が異なったため、一貫した結論は出せなかった。生存率は、移植環境では雄個体と両性個体で異ならなかった。

研究成果の概要(英文)：Using NGS, we developed a sex-specific marker for androdioecious *Schizopepon bryoniaefolius*. This can be used in the reproductive stage of heterozygotic males, although there is a restriction in using in natural populations. From the view of the transmission advantage, we investigated the ratio of a sex-specific marker in pollen grains of heterozygotic males. Because of large differences among individuals, the ratio was not deviate from 1:1. However, it may imply that there remains a possibility that some males produce more pollen with the male-determinant gene. We did not find significant differences between sexes in pollen germination rate, growth rate, and survival rate.

研究分野：進化生態学

キーワード：性表現 雄性両全性異株 性特異的マーカー

## 1. 研究開始当初の背景

雌性両全性異株性（雌個体と両性個体の共存）と雄性両全性異株性（雄個体と両性個体の共存）は、雌雄同体から雌雄異体への中間の段階として注目されてきた。前者は後者より広く見られ、これは理論的にも予測されている。前者では、多くは母系遺伝するミトコンドリアゲノムに雄性不稔遺伝子があり、この因子により雌個体ができるため、雌個体は集団中に広まりやすい。このような“仕掛け”がない後者の場合、雄個体は両性個体より2倍の花粉親成功が必要（近交弱勢なし、自殖なしの場合）だと理論的に予測されている

（菊沢 1995）。しかし両性個体は自分の花粉を授粉する傾向にあり、単純には雄個体が花粉生産を増やしたところで、それに比例した花粉親成功は見込めない。

実証研究では、*Phillyrea angustifolia*（モクセイ科）が唯一明快であり、この種は異型花柱性の自家不和合性により必要条件を満たしている（Saumitou-Laprade *et al.* 2010）が、このメカニズムは例外であろう。そこで申請者は、雄性両全性異株性においては、雄性決定遺伝子が他の対立遺伝子よりも有利に伝達されている何らかのメカニズムが存在するという仮説を立てている。具体的には、減数分裂時の性染色体の分離ひずみ（Bachtrog *et al.* 2011）、花粉競争や受精における優先性等により達成されている可能性が挙げられる。

本研究では、ミヤマニガウリを用いてこの仮説を検証する。ミヤマニガウリの含まれるウリ科植物は性表現が多様で、性表現の進化を研究する上で非常に恵まれた材料である（Schaefer & Renner 2011）。これまで進化的視点から研究の進められた雄性両全性異株性の植物は *Mercurialis annua*（トウダイグサ科）、*Phillyrea angustifolia*（モクセイ科）、*Datisca glomerata*（ダテイスカ科）が挙げられるが、科レベルでの性表現の多様性はウリ科が最も多様であり、他の材料にない独創性と優位性を示す。

また、ミヤマニガウリは稀な雄性両全性異株性の植物の中でも数少ない一年生草本であるため生涯繁殖成功を評価しやすく、また実生から開花期までの生存率が短期間で評価できる点が、多くの雄性両全性異株植物と異なる特色・利点である。これまでも、①雄個体と両性個体の花粉に形態上の違いはない（Fukuhara & Akimoto 1999）、②雄個体の頻度は集団間でばらつき、雄個体無し集団もある、③雄個体頻度と近交係数に負の相関がみられる（＝雄個体無し集団はほぼ自殖し、雄個体が増えると他殖する；Akimoto *et al.* 1999）、など雄性両全性異株性進化に関する研究が進められてきた。

## 2. 研究の目的

本研究ではミヤマニガウリの雄特異的マーカーを作成した上で、以下のアプローチによ

り雄性決定遺伝子が他の対立遺伝子よりも有利に伝達されているメカニズムを明らかにする。

- 花粉 PCR により葯内花粉の性決定遺伝子の比を調べ、花粉生産時の伝達有利性を検証する。
- 雄個体と両性個体の花粉の発芽率や伸長速度を *in vitro* で比較し、花粉生理上の伝達有利性を検証する。
- 雄個体と両性個体の花粉の同時授粉後に種子の花粉親解析を行い、花粉競争時の伝達有利性を検証する。
- 雄個体と両性個体の実生の生存率を比較し、栄養成長時の伝達有利性を検証する。

これらのアプローチにより、雄性両全性異株性において、雄性決定遺伝子が他の対立遺伝子よりも有利に伝達されているメカニズムが明らかになると考えた。

## 3. 研究の方法

### (1) RAD-Seq による塩基配列解析

岐阜県、新潟県、福井県の全7集団から両性個体と雄個体の葉を偏りなく採集した（両性30個体、雄29個体）。抽出DNAを制限酵素 *Bgl*III および *Eco*RI-HF を用いて断片化し、切断部位から51塩基の配列を Hi-seq2000（Illumina）で解析した。

Illumina から得られたデータは SNP の発見に有効なソフトウェア stacks を用いて分析した。その際、質の低いリードやアダプターの配列に関してはソフトウェア Trimomatic を用いて取り除いた（Bolger 2014）。

### (2) Roche 454 GS Junior による塩基配列解析

山形県で採集（2016年9月）した雄個体からDNAを抽出し、Roche 454 GS Junior で塩基配列解析を行った。

### (3) 性特異的マーカーの探索

Stacks によって解析されたデータをもとに、Excel で性と連鎖する SNPs の検出を行った。

全 contigs 中サンプルの約半数の30個体以上でマッチ（同一の遺伝子座での配列が得られた）した contig を解析対象とした。性決定遺伝子と連鎖している配列では、性によって、その配列内に見られる SNP 比率が異なる。比率が雄個体と両性個体で異なれば、性決定遺伝子と関連する配列である可能性が高い。そこで性別に遺伝子型を集計し、対立遺伝子のヘテロ接合度をカウントした。カイ二乗検定を用いて雄個体と両性個体の同一遺伝子座におけるヘテロ接合割合の差を検定した。

さらに、雄決定遺伝子と最も緊密に連鎖していると判断された座位について、SiteFinding-PCR 法（Tan *et al.* 2005）により染色体ウォーキングを行い、座位を挟み込むプライマーペア 10116SNP7F、10116SNP7R を

作成した。

#### (4) マイクロサテライトマーカーの開発

マイクロサテライトマーカーは2つの方法開発した。1つは、Roche 454 GS Junior で読んだ配列に基づき、マイクロサテライト部位を検出し、部位を挟み込むようにプライマーペアを設計し、多型を解析した。もう1つは、RAD-Seq のデータ内からマイクロサテライト部位を検出し、隣接部位の配列から同一座位と判断されるものをまとめて、繰り返し数に多型が見られるものをリストアップした。それらのうち、3つ以上の多型が見られるものについて、SiteFinding-PCR 法により一方向に染色体ウォーキングを行なってプライマーを設計した。多型は新潟県十日町市で採集したの20個体用いて検出した。Qiagen の Multiplex PCR kit を用い、Applied Biosystems 3130 DNA Analyzer で解析した。

#### (5) 葯内花粉の性決定遺伝子の解析

9個体の雄個体(福井県大野市1個体、山形県西村山郡西川町8個体)の花序を2016年9月に採集した。

双眼実体顕微鏡下で、先端にワセリン(健栄製薬)を塗ったテグス(VARIVAS エクセラ鮎 スーパーメタル 0.03号(MORRIS))に花粉一粒を付着させ、空の200  $\mu$ L チューブにテグスの先端を入れ、はさみで切り落とし、フタをした。これを鋳型に、PCR-RFLPにより花粉の持つ性決定遺伝子の判定を行なった(プライマーは開発した10116SNP7Fと10116SNP7R、制限酵素はDra I)。

雄個体が生産する花粉の持つ性決定遺伝子の分離比が雄性:両性=1:1からずれているかを解析した。検定はRを用いて、カイ二乗検定で行った。

#### (6) in vitro での花粉の発芽率と伸長速度

岐阜県郡上市石徹白、岐阜県揖斐郡揖斐川町(徳山ダム)、福井県大野市から開花中の花を研究室に持ち帰り実験に用いた。石徹白集団では両性個体しか見つからなかった。石徹白集団の両性21個体、徳山集団の雄3個体、両性6個体、大野市集団の雄29個体と両性12個体を用いた。採集した花は、1.5 mL チューブに入れて持ち帰り、研究室の冷蔵庫内で保管した。全ての花粉実験は、花を採集してから3日以内に行った。

スポイトを用いて、花粉管観察用ゲル(砂糖5g、DDW 95 mL、寒天1gを含む)を電子レンジで溶解し、スライドガラスの上にたらした。ゲルが固まったら、カミソリで1cmに切った。花をピンセットで逆さにして持ち、葯を直接ゲルにつけて花粉を播いた。花粉が集中している場所は、虫ピンを使って散らした。これをタッパーの中に入れフタをし、低温インキュベーター(FMU-0531、福島工業株式会社)で、25°C3時間インキュベートした。その後70%エタノールで固定し、

アニリンブルーで染色を行った(Jacquemart 2007)。

顕微鏡(Axio Lab.A1, Carl Zeiss)を用いて、花粉管の写真を撮り、画像を取得した。この時、顕微鏡の倍率は100倍に設定して、写真を撮ったらステージをずらしてゲル上に播いた花粉を全て写真に撮った。取得した写真画像はパソコンで読み取り、個体ごとの花粉の合計数と発芽した花粉の数を目視で計測した。花粉が1つも発芽しなかった個体も発芽率データの中に含めた。同じ写真を用い、ソフトウェアImageJを使って花粉管の長さを測定した。この時、花粉と花粉管との境から花粉管の末端までを花粉管の長さとした。また、長さを測るために、ツールSegmented Lineを用いて花粉管の中心を通るよう線を描いた。一枚の写真の中で花粉管が複数伸びている場合は、無作為に2個ずつ選び長さを計測した。花粉管が1本も伸びなかった個体は解析に含めなかった。

一般化線形混合モデルGLMM(glmml、二項分布、ロジットリンク関数、個体をランダム効果とした)を用いて、徳山集団の雄個体と両性個体間、大野集団の雄個体と両性個体間、または石徹白集団内のサンプリング日の異なる両性個体間で、花粉の発芽率に有意な違いが存在するかを検定した。また、線形混合モデル(lme4パッケージの関数lmer、個体数をランダム効果とした)を用い、発芽率と同様のペア間で、花粉の伸長速度に有意な違いが存在するかを検定した。

#### (7) 実生の生存率

2017年5月22日に福井県大野市の3地点で計74個体の実生を採集し、翌23日に岐阜県山形市の栽培地に植え付けを行った。そのうち、6月16日時点で生存していた64個体を定着した個体とし、以降6~11日間隔で生存を観察した。開花まで生存していたものは性を視認し、途中で枯死したものは、作成した性特異的マーカーで性を判別した。雄株と両性株の生存率を比較した。Rを用いてコックス比例ハザード回帰分析により検定した。

## 4. 研究成果

### (1) RAD-Seq 解析と雄特異的マーカー

Stacks 解析に用いられたのは、Hi-seq2000によって得られたリードの約31%にあたる合計36,013,440リードで、1個体あたりの平均は610,397リードであった。stacks処理により、用いられたリードは286,682のcontigsにまとめられ、そのcontigs中に23,962のSNPsが得られた。これをcontigごとにヘテロ接合とホモ接合としてカウントし、両性個体と雄個体で比率が有意に異なるものをカイ二乗検定で判別したところ、8つの候補が得られた。さらに、データを詳細に検討した結果、ID10116という座位で性表現との関連が明瞭な結果が得られた。この座位のSNPはA/G

であり、両性個体はすべて G のホモ接合 (G/G)、雄個体では 8 割が G と A のヘテロ接合 (G/A) で残りの 2 割が G のホモ接合 (G/G) であった。A のホモ接合 (A/A) はいずれの性でもみられなかった。この結果から、(1) 雄性決定は、主要な遺伝子が 1 つあること、(2) 雄性がヘテロ接合となる XY 性決定システムであり、A allele が Y 染色体上、G allele が X 染色体上にある、ということが強く示唆された。

この ID10116 の配列データから染色体ウォーキングを行ってプライマーを作成した。A allele は Dra I で切断される配列を有する。PCR-RFLP 法によって G/G ホモ接合と G/A ヘテロ接合の判別が機能することが確認された (図 1)。

また、その後の解析から、雄の G/G ホモ接合は、特定の集団に限定されるものではないことがわかったため、100%の正確性で性を特定するマーカーとはなりえなかった。すなわち、ヘテロ接合を雄個体、ホモ接合を両性個体と判定すると、雄個体数を過小評価することになる。しかしながら、この ID10116 以上に優れたマーカーは見つけられなかった。

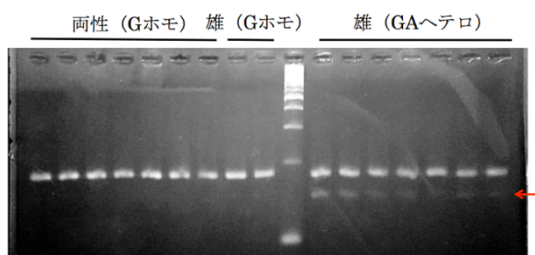


図 1 PCR-RFLP 処理による性特異的マーカーの電気泳動像。赤矢印は A allele 由来の断片を示す。

## (2) Roche 454 GS Junior による塩基配列解析とマイクロサテライトマーカー開発

この解析では合計で 145,339 リード、25,317,473 塩基が解読され、1 リードあたり平均して 174.2 塩基を読むことができた。このデータから 48 のマイクロサテライト座位でプライマーを設計し、19 座位で多型が得られた。

RAD-Seq データからは、多型があると推測される座位が 54 得られた。このうち多型が 3 以上の 13 座位について染色体ウォーキングを試みた。その結果、4 座位において最初に設計したプライマー (最終的に Forward primer となる) から 100 bp 以上先まで配列を得ることができたため、Reverse primer を設計した。これを新潟県の 1 集団 20 個体でフラグメント解析したところ、3 座位で多型が得られた (表 1)。

Locus	Repeat motif	Size range (bp)	n	a	H <sub>0</sub>	H <sub>e</sub>	F <sub>IS</sub> (W&C)
Sb261943	(CT) <sub>n</sub>	210-237	20	6	0.65	0.704285	0.0792
Sb266520	(TA) <sub>n</sub>	191-211	20	7	0.4	0.683335	0.4221*
Sb254174	(CAA) <sub>n</sub>	199-205	20	4	0.45	0.541025	0.1719

## (3) 雄個体の花粉形成時の性決定遺伝子の分離

雄 9 個体の花から計 106 個の花粉を単離し、PCR を行ったところ、48 個の花粉で DNA の増幅が見られた (成功率 45.3%)。これらの DNA を制限酵素処理したところ、28 花粉 (58.33%) が A allele (=Y 染色体)、20 花粉 (41.67%) が G allele (=X 染色体) を有していた。合計すると比率は 1:1 から有意にずれてはいなかった ( $\chi^2 = 1.33$ ,  $df = 1$ ,  $P = 0.248$ )。ただし個体ごとにみると (図 2)、A allele を持つ花粉のみみられた個体

(YDP1)、G allele を持つ花粉のみみられた個体 (THL1) があり、特定の個体では偏りがみられるという可能性は残された。

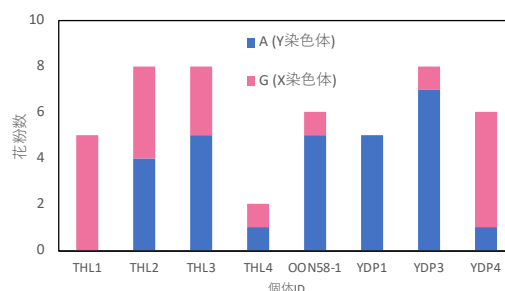


図 2 雄株が生産した花粉の性決定遺伝子の割合。

## (4) in vitro での花粉の発芽率と伸長速度

スライドガラスの前処理が悪かったのか、大野集団を用いた 1 回目の実験が芳しくなかったため、大野集団のサンプルは 1 回目と 2 回目の実験を別に解析した。

全個体の平均花粉発芽率は 0.230 であった。大野集団 (2 回目) の雄個体花粉の平均発芽率が 0.494 と一番大きく、石徹白集団の両性個体の発芽率が 0.085 と一番小さかった

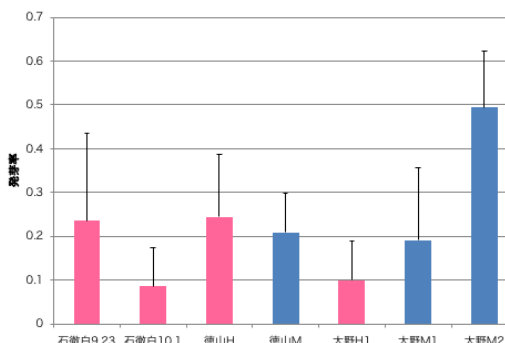


図 3 発芽率における各集団間の比較。

大野集団の数字は、何回目に行った実験かを示す。ピンク色の棒グラフは両性株の発芽率の平均を示す。エラーバーは標準偏差を表している。実験に使った個体数と解析した花粉数は以下の通りである。石徹白 9.23 : n 植物 = 8, n 花粉 = 802、石徹白 10.1 : n 植物 = 3, n 花粉 = 1850、徳山 H : n 植物 = 6, n 花粉 = 1817、徳山 M : n 植物 = 3, n 花粉 = 1210、大野 H1 : n 植物 = 18, n 花粉 = 1523、大野 M1 : n 植物 = 11, n 花粉 = 7431、大野 M2 : n 植物 = 11, n 花粉 = 2901

(図3)。

徳山集団の雄株と両性個体の花粉の間の花粉発芽率には有意差が見られなかった ( $P = 0.936$ , 表 2b)。大野集団では、1 回目の再利用のスライドガラスを用いた実験の雄個体と両性個体の間で雄株の方が有意に高い発芽率を示した。 ( $P < 0.05$ , 表 2d)。

また、1 回目に実験した雄個体と 2 回目に実験した雄個体を比較したときにも有意差が見られた ( $P < 0.05$ , 表 2c)。2 回目に実験した雄個体は、1 回目に実験した雄個体よりも約 61.5 % の高い発芽率を得た。採集した時期が異なる花粉の比較は石徹白集団で行った。1 回目に採集 (9 月 23 日) した花粉と 2 回目に採集 (10 月 1 日) した花粉の間にも有意差が見られ、1 回目に採集した花から採った花粉の方が発芽率は高かった ( $P < 0.05$ , 表 2a)。

表2 各集団における花粉発芽率に関する一般化線形混合モデルGLMMを用いた解析。Hは両性、Mは雄を示す。

	coef	SE (coef)	z	P
a) H1 vs. H2 (Itoshiro)				
(Intercept)	-1.044	0.442	-2.361	0.018
H1	-1.278	0.139	-9.187	0.000
b) H vs. M (Tokuyama)				
(Intercept)	-1.443	0.392	-3.680	0.000
M	-0.054	0.674	-0.080	0.936
c) M1 vs. M2 (Ono)				
(Intercept)	-2.694	0.233	-11.310	0.000
M2	0.928	0.030	30.820	0.000
d) H1 vs. M1 (Ono)				
(Intercept)	-0.839	0.675	-1.244	0.214
M1	-1.089	0.479	-2.275	0.023

全集団の雄個体と両性個体ごとに平均花粉伸長をそれぞれ求め、これらを比較したとき、大野集団の新品のスライドガラスで実験を行った雄個体が  $0.494 \mu\text{m}$  と一番長かった。集団内で平均長を比べてみると、徳山の雄個体と両性個体との間が  $0.036 \mu\text{m}$  と一番差が小さかった。両性個体の平均長は雄株の平均長の 75% であった。大野集団の再利用のスライドガラス用いて行った 1 回目の実験の両性個体と新品のスライドガラスで 2 回目に実験を行った雄個体との間の差が  $0.694 \mu\text{m}$  で一番大きかった (図 4)。

徳山集団の雄個体と両性個体の間における花粉管伸長では、有意差は見られなかった ( $P = 0.648$ , 表 3a)。大野集団の再利用のスライドガラスを用いた 1 回目の実験が行われた雄個体と両性個体の間にも有意差は見られなかった ( $P = 0.169$ , 表 3d)。大野集団の実験方法が異なる雄個体の間を比較すると有意差があり、新品のスライドガラスで実験した時の方が伸長速度は約 1.6 倍速かった ( $P = 0.003$ , 表 3b)。大野集団の花粉管伸長では、再利用のスライドガラスで実験した両性株と新品のスライドガラスで実験した雄個体の間では、雄個体の方が有意に速い伸長速度を示し、雄個体は両性個体の約 2.6 倍の伸長

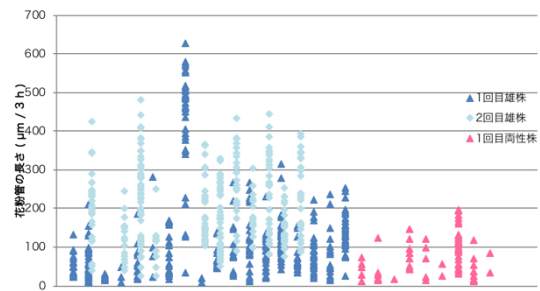


図 4 大野集団の雄株と両性株の花粉管伸長速度。個体ごとに測定した花粉管の長さを縦に並べてプロットした。▲は 1 回目に実験した花粉を示す。◆は 2 回目に実験した雄株由来の花粉を示す。

表3 各集団における花粉伸長速度に関する線形混合モデルを用いた解析。Hは両性、Mは雄を示す。

	Estimate	Std. Error	df	value	P
a) H vs. M (Tokuyama)					
(Intercept)	54.385	7.160	4.210	7.596	0.001
M	3.896	8.170	7.120	0.477	0.648
b) M1 vs. M2 (Ono)					
(Intercept)	100.490	22.000	17.700	4.569	0.000
M2	90.440	26.950	19.120	3.356	0.003
c) H1 vs. M2 (Ono)					
(Intercept)	67.349	13.496	9.419	4.990	0.001
M2	123.545	19.976	18.786	6.185	0.000
d) H1 vs. M1 (Ono)					
(Intercept)	64.420	12.200	9.790	5.279	0.000
M1	35.410	25.000	25.650	1.416	0.169

速度だった ( $P < 0.05$ , 表 3c)。

### (5) 実生の生存率

観察対象の 64 個体のうち、8 個体は繁殖ステージまで生存した。これらのうち 4 個体が雄花を、別の 4 個体が両性花を咲かせたため、直接性別が決定できた。開花前に枯死したため直接性別が決定できなかった 56 個体のうち、42 個体では性特異的のマーカにより性が判別された：6 個体が G/A ヘテロ接合であり、雄個体と判定された。そこで、ホモ接合を両性個体とみなし (雄個体の可能性が

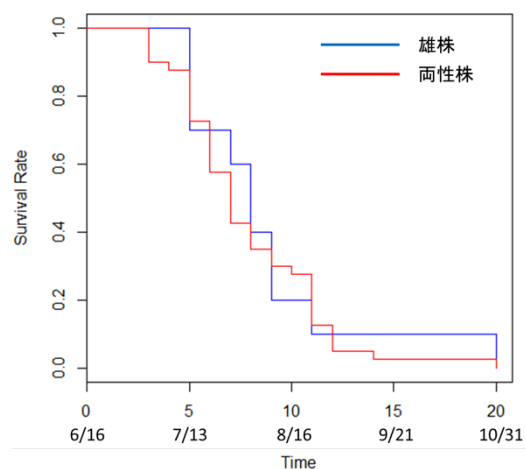


図 5 雄個体と両性個体の生存曲線。縦軸は性別ごとの全個体が生存している場合を 1 とした生存率、横軸は観察した回数によって個体の生存を確かめた時間を示している。

あるため、両性個体数はおそらく過大評価である)、50 個体を用いて生存率を性間で比較したが、有意な差は見られなかった (図 5、Exp(coef) = 1.14、df = 1、P = 0.714)。

以上の結果をまとめると、

- 1) 次世代シーケンサ (NGS) により、性特異的マーカーを開発した。ヘテロ接合となる雄個体に関しては、繁殖ステージで確実に利用できる。ただし野生集団を対象にする際には注意が必要である。
- a) マイクロサテライトマーカー開発は、NGS の想定外の不具合のため、大きくずれ込み、そのため野外繁殖を調べる上で間に合わなかった。しかし、確実にミヤマニガウリで利用可能なマーカーが作成された意義は大きく、今後これを利用した解析が進むことが期待できる。
- b) 雄個体と両性個体の花粉の発芽率および伸長速度は、ばらつきが大きく、集団や日により結果が異なった：両性個体の方が高い数値を出すことはなかったが、雄個体と両性個体は差がない結果となることもあれば、雄個体の方が大きいという結果となることもあった。条件をうまくコントロールして、結論を得たい。
- c) 移植環境では、生存率は雄個体と両性個体で異ならなかった。ただし、途中で枯死した実生の性判定が確実ではないため、マーカーによる性判別の精度が高まった際に再解析したい。

#### <引用文献>

- Akimoto, J., Fukuhara, T. and Kikuzawa, K., (1999) Sex ratios and genetic variation in a functionally androdioecious species, *Schizopepon bryoniaefolius* (Cucurbitaceae). *American Journal of Botany*, 86: 880-886.
- Bachtrog, D., Kirkpatrick, M., Mank, J.E., McDaniel, S.F., Pires, J.C., Rice, W. and Valenzuela, N. (2011) Are all sex chromosomes created equal? *TRENDS in Genetics*, 27: 350-357.
- Fukuhara, T. and Akimoto, J. (1999) Floral Morphology and Vasculature of *Schizopepon bryoniaefolius*. *Acta Phytotax. Geobot.* 50: 59-73.
- Jacquemart, A.L. (2007) Methods for determining compatibility and pollinator efficiency in temperate fruit species. *Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology*, 1:26-38.
- 菊沢喜八郎. (1995) 植物の繁殖生態学. 蒼樹書房, 東京.
- Saumitou-Laprade P., Vernet P., Vassiliadis C., Hoareau Y., de Magny G., Dommée B. and Lepart J. (2010) A self-incompatibility system explains high male frequencies in an androdioecious plant. *Science*, 327:1648-1650.
- Schaefer, H. and Renner, S.S., 2011. Phylogenetic relationships in the order Cucurbitales and a

new classification of the gourd family (Cucurbitaceae). *Taxon*, 60: 122-138.

- Tan, G., Gao, Y., Shi, M., Zhang, X., He, S., Chen, Z. and An, C. (2005) SiteFinding-PCR: a simple and efficient PCR method for chromosome walking. *Nucleic Acids Research*, 33:e122.

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Miyake, T., Satake, I. and Miyake, K. Sex-biased seed predation in gynodioecious *Dianthus superbus* var. *longicalycinus* (Caryophyllaceae) and differential influence of two seed predator species on the floral traits. *Plant Species Biology* 査読有 33: 42-50, 2018 年 DOI: 10.1111/1442-1984.12191
- ② Suetsugu, K., Hsu, T. C., Toma, T., Miyake, T. and Saunders, R. M. K. Emended description and resurrection of *Kadsura matsudae* (Schisandraceae). *Phytotaxa* 査読有 311: 255-262, 2017 年 DOI: 10.11646/phytotaxa.311.3.5

[学会発表] (計 1 件)

- ① 三宅崇・吉家卓未・田中翔太・永野惇・手塚あゆみ・牧雅之「雄性両全性異株性植物ミヤマニガウリの生活史形質の性的二型」日本生態学会第 64 回全国大会 2017 年 3 月

[図書] (計 0 件)

なし

[産業財産権]

なし

[その他]

ホームページ等  
特になし

#### 6. 研究組織

- (1)研究代表者  
三宅 崇 (MIYAKE, Takashi)  
岐阜大学・教育学部・准教授  
研究者番号：00380569
- (2)研究分担者  
牧 雅之 (MAKI, Masayuki)  
東北大学・学術資源研究公開センター・教授  
研究者番号：60263985
- (3)連携研究者  
なし
- (4)研究協力者  
なし