

〈第60回 静岡県学生科学賞 県科学教育振興委員会賞〉
花と葉の表面構造の違いについて part V

静岡県立磐田南高等学校

生物部 2年 上川 純平・高田 佳樹・杉山 大悟・鈴木裕陽

1 動機

平成23年度に本研究の part I となる研究が行われた。「花卉は花粉媒介者を呼ぶため、葉とは異なる表面構造を持つ」という仮説を立て、走査型電子顕微鏡を用いて、8種類の被子植物の花弁と葉の表面構造について観察を行った。その結果、7種類の植物の花弁には、葉には見られない突起があることが分かったが、残り1種のキキョウだけは花弁に突起が見られなかった(図1)。このことが part II 以降の研究テーマとなった。解決すべき疑問は、「キキョウが何故花弁表面に他の花が持つような突起を持たないのか」ということだった。文献調査の結果、多くの花は花弁表面に円錐状の突起を持っており、そのことは植物体の中で花に特異的な形質であるということが分かった(Kay et al. 1981)。さらにその表面の突起の形成に MIXTA という遺伝子ファミリーが関わっていることが分かった。

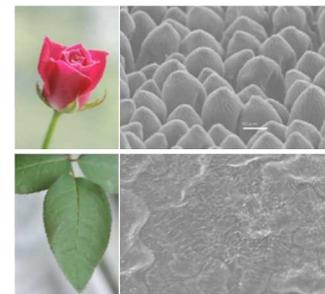
そこで、「キキョウが花弁表面に突起を持たないのは MIXTA 遺伝子を持たないか、または、持ってもそれが変異しているためである。」という仮説のもと、キキョウの蕾の中で発現している遺伝子の解析に取り組んできた。part III~IVの研究は、キキョウの蕾から mRNA を抽出し、cDNA を作成後、AmMIXTA のシーケンスを基に設計したプライマーで PCR を行い、1個の遺伝子を捕らえた。なお、AmMIXTA とはキンギョソウ (*Antirrhinum majus*) の花弁に突起形成を起こす遺伝子の一つである(Noda et al. 1994)。その後の実験により、発見した遺伝子の全長のシーケンスを解明し、それを PgMIXTA と名付けた。

この遺伝子と他の MIXTA 遺伝子との系統関係を調べたところ MgMYBML8 遺伝子が最も近縁であることが分かった。MgMYBML8 は、ミムラス (*Mimulus guttatus*) の葉においてトリコーム形成を抑制する遺伝子である(Scoville et al. 2011)

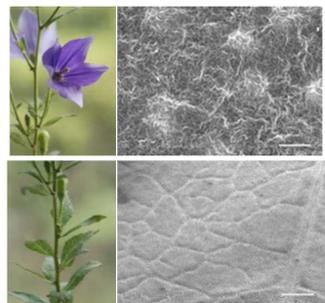
もし PgMIXTA が同様のはたらきを持っているなら、花弁において突起形成を抑制していることになり、キキョウの花弁が突起を持たないことの説明が見つかる。

しかしながら、MIXTA 遺伝子は植物の中で数多く発現している MYB 遺伝子の仲間であり、1組のプライマーで発見した PgMIXTA 以外にもまだ遺伝子がある可能性が高かった。そこで本研究では、次世代シーケンサーと呼ばれる RNA シーケンス解析機器を用い、キキョウの蕾の中の mRNA のすべての塩基配列を把握した上で、関係する遺伝子をコンピューターを用いた情報処理により探し出し、その働きを探求することにした。

2 材料と方法 (1) 材料



バラ (*Rosaceae Rosa*)



キキョウ (*Platycodon grandiflorus*)

図1 キキョウとバラにおける花弁と葉の表面構造の違い。花と葉の写真の右にそれぞれの表面構造の SEM 画像を示した

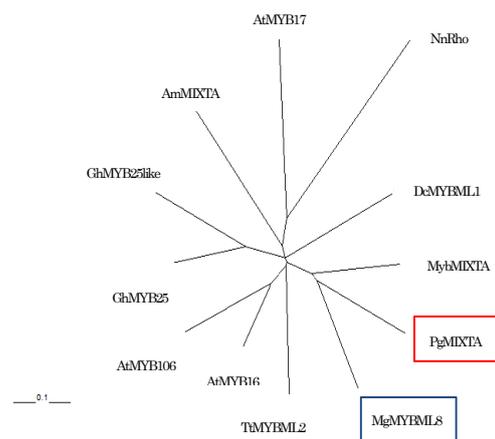


図2 PgMIXTA と他の MIXTA 遺伝子の系統樹

その働きを探求することにした。

キキョウ科 キキョウ (*Platcodon grandiflorus*) 品種名は『五月雨』 1株から蕾を3個採取した。

(2) 方法

ア キキョウの蕾からのRNA抽出

RNAの抽出にはTaKaRa社のRNeasy Mini Kitを使用した。キキョウから蕾を採取し、マイクロチューブに金属球と共に入れ、それを液体窒素で凍結した。RNeasy スピニングカラムに設置し、粉砕した。Buffer RLTを用いて450μlをサンプルに添加した。2ml コレクションチューブを設置したQIAshredder スピニングカラムにサンプルを添加し、最高スピードで2分間遠心操作を行い、ろ液の上清を新たに用意したコレクションチューブに、細胞破片ペレットを乱さないよう添加した。サンプルに半量の96~100%エタノールを添加し、ピペットで混和した。サンプルを2ml コレクションチューブを設置したRNeasy スピニングカラムに注入し、10,000rpm以上で15秒間遠心操作を行い、ろ液を捨てた。700μlのBuffer RW1をRNeasy スピニングカラムに添加し、10,000rpm以上で15秒間遠心操作を行い、ろ液を捨てた。RNeasy スピニングカラムに500μlのBuffer RPEを添加し、10,000rpm以上で15秒間遠心操作を行い、ろ液を捨てた。RNeasy スピニングカラムに500μlのBuffer RPEを添加し、10,000rpm以上で2分間遠心操作を行い、ろ液を捨てた。RNeasy スピニングカラムに新たに2ml コレクションチューブを設置し、ろ液の入ったコレクションチューブを捨て、サンプルを添加し最高スピードで1分間遠心操作を行い、RNAを溶出した。RNA溶液を1.5ml コレクションチューブに移し、変性Buffer1/5量を添加して混和した。ホットブロックを用いて75°Cで5分間暖めてRNAを変性させた。RNA変性後、泳動するまでコレクションチューブを氷上に移して静置した。1.3%アガロースゲルを用いて、電気泳動を行い、UVイルミネーターを用いてバンドの検出を行った。

イ RNAクリーンアップとRNAシーケンス

RNaseフリー水をサンプルに添加して100μlに調整し、次に350μlのBuffer RLTを添加し、混和した。希釈したRNAに250μlの96~100%エタノールを添加し、ピペットで混和した。10000rpm以上で15秒間遠心操作を行い、ろ液を捨てた。RNeasy スピニングカラムに500μlのBuffer RPEを添加し、10,000rpm以上で15秒間遠心操作をし、ろ液を捨てた。RNeasy スピニングカラムに500μlのBuffer RPEを添加し、10000rpm以上で2分間遠心操作を行った。RNeasy スピニングカラムに新たに2ml コレクションチューブを設置し、サンプルを2ml コレクションチューブに移し、ろ液の入ったコレクションチューブを捨て、最高スピードで1分間遠心操作を行った。RNeasy スピニングカラムに新たに1.5ml コレクションチューブを設置し、RNaseフリー水30~50μlとサンプルを添加し、10,000rpm以上で2分間遠心操作を行い、RNAを溶出した。溶出したRNAを用いてRNAのクオリティーチェックを行い、クオリティーの良いRNAを用いて静岡大学大学院農学研究科の一家先生の研究室で、RNAシーケンスを行った。

ウ シークエンスの比較

ORF finder プログラムを用いて、RNAシーケンスで得た翻訳領域を検索した。得られた各翻訳領域に通し番号を付け、BLASTプログラムを用いて、近縁性がある既知のタンパク質を探し出した。PartIVの研究よりも詳しく *PgMIXTA* の働きを調べる為に、他の *MIXTA* 遺伝子ファミリーの遺伝子とどれだけ違っているかを比較した。*MIXTA* ファミリーのいくつかの配列を入手し、

表1 キキョウの蕾の中で発現している遺伝子産物

タンパク質名	アミノ酸配列	最も近縁性のあるタンパク質
1	MELPPLPSLYSGNLVVLKLFHSSPTSSPTIPSSQDPDEFPTNSIKLVELSPVIVSVDDGDSCSNPLPQPQPPHALRMSRRHRGGTTRGTTGLTWSWSSAEPSSRVSELERCLDCFTSLASASSRALSH	該当無し
2	MWLKLAVLLDWPSLDKRVFFGLWLTGSIPLANLFLRWVFG	ScMYB60
3	MWRIRWGRHGIQKNTIPVIVIIIITISAAATTTNIRITTALCQSPTPITAGTCDIIIQKQVRKTLQE VFTCHVLTITISN	unnamed protein product.partial(Vitis vinifera)
4	MGIPVIFYFVVCFSRQVSRYSRPSVAQQSMKLNDFLVELAPLNIIRSKISQSPATFPPTSL	unnamed protein product.partial(Vitis vinifera)
5	MVGYSDSLAEKNRQRNKKLLEYPSEQVGGQNGN	該当無し
6	MSTATAAGALSPPKPGYKDVGVKQVAG	hypothetical protein H310_05563(Aphanomyces invadans)
7	MEWVVMKWERNGKASAAALQPGCRNIMEGVVIPFRSTHQEWECHQWMDGPQGSQLLVIIVTSTWQVKT S WRVLRTEFC	該当無し
<i>PgMIXTA</i>	MGRSPCCDKVGLKKGPTFEEDQKLLAYIDEHGHGSWRALPSKAGLORCGKSQRWNTNLYLRPDIKRGKFSQHEEGTQLHALLGNRWSAIAIHLKRTDNEIKNYWNHLKRLAKMGIDPVSHPKNDTLSSDGGSKSTANLSHMAQWESARLEAEARLVKQSKQRSSQLTLLGSAELSQLVPLV/PPRCLDLKAWTGGWGGSGFGEQESPSSTLSTTGIGESSTNFIEFVGNSSGSCEDGMVGDVEVGEENKFSFGSTTTRLPEYKDRG GNSIPFNSSGMGMSMENGWTTAEISITSDNSNEHVASENFLSFDTLLNNITSTGGDRSGGLAEGGGDSDIGGGRGGCNSCYDDNYKNYNSLNLVNSPPDPSPHF	MgMYBL8

ClustalW プログラムを用いて *PgMIXTA* と比較した。

3 結果

(1) キキョウの蕾の中で発現している遺伝子

RNA シークエンスで得ることができた mRNA のデータが多く、すべては解析できなかったが、新たに7種類のタンパク質が発現していると推測できた。表1にはそれらのタンパク質のアミノ酸配列、およびそれに近縁性がある既知のタンパク質の検索結果を示した。*PgMIXTA* は今回の解析でもキキョウの蕾の中で発現していることが分かった。

最も近縁性のあるタンパク質の欄については以下のとおりである。通し番号1、5、7の「該当無し」とは、NCBI 上に登録されていないタンパク質を示している。通し番号3、4と近縁性を示す「unnamed protein product partial (*Vitis vinifera*)」、通し番号6の「hypothetical protein H310 — 08563 (*Aphanomyces incadanss*)」とは、タンパク質としては知られているが、遺伝子名が決まっていないものである。

7種の新しく発見されたタンパク質の中では、通し番号2が *ScMYB60* というタンパク質と近縁性があった。

(2) *PgMIXTA* と他の *MIXTA* との配列比較

PgMIXTA のアミノ酸残基数は 391 だが、比較した他の9種類の遺伝子では246~405 と差が見られた。表中各段の下に*が付されているのは、そのアミノ酸が10種の遺伝子すべてで共通していることを示している。比較結果を図3に記した。図3が示すように、*MIXTA* 遺伝子同士の配列の一致している部分は、主に170残基までに見られ、それ以降は一致している部分は見られなかった。そこで、*PgMIXTA* の配列を基準とし、他の9種類の *MIXTA* と比較した。紙面の都合で、それらのシークエンスは割愛する。この比較の結果は、次のとおりである。*PgMIXTA* と *MgMYBL8* の配列が一致している部分が多く、特に *PgMIXTA* の216~275残基と *MgMYBL8* の215~268残基を比較したところ、配列の一致している部分が54%、その次に一致している部分が多い *TtMYBML2* の178~289残基では17%であった。

4 考察

(1) キキョウの蕾の中で発現している遺伝子について

RNA シークエンスで得られたデータの解析から、今回は *PgMIXTA* を含め8種類の mRNA が見つかり、それから翻訳されるタンパク質のアミノ酸配列が明らかになった。その中の一つ、通し番号2のタンパク質は *ScMYB60* に近いことが分かった。その名称から *MYB* 転写因子の一つであることは分かるので、その作用について文献調査したが、サトウキビ (*Saccharum*) の雑種から単離されたものであること以外は分からなかった。つまり、その働きは不明である。

今回の解析では、キキョウの蕾の中で発現している遺伝子で *MIXTA* ファミリーに属するものが見つからなかったため、そのことが「キキョウの花弁に突起が形成されない原因」と結論づけられそうであるが、前述のように解析できていない転写産物がある可能性が高いため、今後検討を続けたい。

(2) *PgMIXTA* と他の *MIXTA* との配列比較について

GhMYB25	MGRSPCCDKVGLKGGPWTPEEDQKLLVIEEHGGWSRSLPKAKGLRGGKSORLRINWY
GhMYB25_like	MGRSPCCDKVGLKGGPWTPEEDQKLLVIEEHGGWSRSLPKAKGLRGGKSORLRINWY
PgMIXTA	-----LKKGPWTPEEDQKLLVIEEHGGWSRSLPKAKGLRGGKSORLRINWY
MgMYBL8	MGRSPCCDKVGLKGGPWTPEEDQKLLVIEEHGGWSRSLPKAKGLRGGKSORLRINWY
AtMYB16	MGRSPCCDKVGLKGGPWTPEEDQKLLVIEEHGGWSRSLPKAKGLRGGKSORLRINWY
AtMYB106	MGRSPCCDKVGLKGGPWTPEEDQKLLVIEEHGGWSRSLPKAKGLRGGKSORLRINWY
TtMYBML2	MGRSPCCDKVGLKGGPWTPEEDQKLLVIEEHGGWSRSLPKAKGLRGGKSORLRINWY
AmMIXTA	MGRSPCCDKVGLKGGPWTPEEDQKLLVIEEHGGWSRSLPKAKGLRGGKSORLRINWY
DcMYBML1	MGRSPCCDKVGLKGGPWTPEEDQKLLVIEEHGGWSRSLPKAKGLRGGKSORLRINWY
AtMYB17	-----LKKGPWTPEEDQKLLVIEEHGGWSRSLPKAKGLRGGKSORLRINWY
GhMYB25	LRPD1KRKGFSLQEGEIT1QLHALLGNRWSA1ATHLPRKTONEIKNYWNTLKKRLTKMG
GhMYB25_like	LRPD1KRKGFSLQEGEIT1QLHALLGNRWSA1ATHLPRKTONEIKNYWNTLKKRLTKMG
PgMIXTA	LRPD1KRKGFSLQEGEIT1QLHALLGNRWSA1ATHLPRKTONEIKNYWNTLKKRLTKMG
MgMYBL8	LRPD1KRKGFSLQEGEIT1QLHALLGNRWSA1ATHLPRKTONEIKNYWNTLKKRLTKMG
AtMYB16	LRPD1KRKGFSLQEGEIT1QLHALLGNRWSA1ATHLPRKTONEIKNYWNTLKKRLTKMG
AtMYB106	LRPD1KRKGFSLQEGEIT1QLHALLGNRWSA1ATHLPRKTONEIKNYWNTLKKRLTKMG
TtMYBML2	LRPD1KRKGFSLQEGEIT1QLHALLGNRWSA1ATHLPRKTONEIKNYWNTLKKRLTKMG
AmMIXTA	LRPD1KRKGFSLQEGEIT1QLHALLGNRWSA1ATHLPRKTONEIKNYWNTLKKRLTKMG
DcMYBML1	LRPD1KRKGFSLQEGEIT1QLHALLGNRWSA1ATHLPRKTONEIKNYWNTLKKRLTKMG
AtMYB17	LRPD1KRKGFSLQEGEIT1QLHALLGNRWSA1ATHLPRKTONEIKNYWNTLKKRLTKMG
GhMYB25	IDPVTHKPKTDALGSTT---GNP1DAANLSHMAQWESARLEAEARLVRESKLVPSNPPQ---
GhMYB25_like	IDPVTHKPKTDALGSTT---GNP1DAANLSHMAQWESARLEAEARLVRESKLVPSNPPQ---
PgMIXTA	-----PKDAANLSHMAQWESARLEAEARLVRESKLVPSNPPQ---
MgMYBL8	-----DGGKSTANLSHMAQWESARLEAEARLVRESKLVPSNPPQ---
AtMYB16	-----DGGKSTANLSHMAQWESARLEAEARLVRESKLVPSNPPQ---
AtMYB106	-----DGGKSTANLSHMAQWESARLEAEARLVRESKLVPSNPPQ---
TtMYBML2	-----DGGKSTANLSHMAQWESARLEAEARLVRESKLVPSNPPQ---
AmMIXTA	-----DGGKSTANLSHMAQWESARLEAEARLVRESKLVPSNPPQ---
DcMYBML1	-----DGGKSTANLSHMAQWESARLEAEARLVRESKLVPSNPPQ---
AtMYB17	-----DGGKSTANLSHMAQWESARLEAEARLVRESKLVPSNPPQ---
GhMYB25	-----SMHTAVAPSPPTP-----ATRPQOOLVLAQGGVGGVGLFT-----FNMDN
GhMYB25_like	-----SMHTAVAPSPPTP-----ATRPQOOLVLAQGGVGGVGLFT-----FNMDN
PgMIXTA	-----SMHTAVAPSPPTP-----ATRPQOOLVLAQGGVGGVGLFT-----FNMDN
MgMYBL8	-----SMHTAVAPSPPTP-----ATRPQOOLVLAQGGVGGVGLFT-----FNMDN
AtMYB16	-----SMHTAVAPSPPTP-----ATRPQOOLVLAQGGVGGVGLFT-----FNMDN
AtMYB106	-----SMHTAVAPSPPTP-----ATRPQOOLVLAQGGVGGVGLFT-----FNMDN
TtMYBML2	-----SMHTAVAPSPPTP-----ATRPQOOLVLAQGGVGGVGLFT-----FNMDN
AmMIXTA	-----SMHTAVAPSPPTP-----ATRPQOOLVLAQGGVGGVGLFT-----FNMDN
DcMYBML1	-----SMHTAVAPSPPTP-----ATRPQOOLVLAQGGVGGVGLFT-----FNMDN
AtMYB17	-----SMHTAVAPSPPTP-----ATRPQOOLVLAQGGVGGVGLFT-----FNMDN
GhMYB25	NNLGSPSTSLNFMENITTLPMSSSSVNGMNFENGNSSINPCEGSD-----
GhMYB25_like	NNLGSPSTSLNFMENITTLPMSSSSVNGMNFENGNSSINPCEGSD-----
PgMIXTA	-----FIDDFVGNSSINPCEGSD-----
MgMYBL8	-----FIDDFVGNSSINPCEGSD-----
AtMYB16	-----FIDDFVGNSSINPCEGSD-----
AtMYB106	-----FIDDFVGNSSINPCEGSD-----
TtMYBML2	-----FIDDFVGNSSINPCEGSD-----
AmMIXTA	-----FIDDFVGNSSINPCEGSD-----
DcMYBML1	-----FIDDFVGNSSINPCEGSD-----
AtMYB17	-----FIDDFVGNSSINPCEGSD-----
GhMYB25	-----ILKVEYSGDOTPELKERLHPMLHEM---DSSSEGTWQELFGFNGL---
GhMYB25_like	-----ILKVEYSGDOTPELKERLHPMLHEM---DSSSEGTWQELFGFNGL---
PgMIXTA	-----GNSIFPNSSGMSMENGWTTAETITSDNSNEIHVASENFLESTDLLNN
MgMYBL8	-----GNSIFPNSSGMSMENGWTTAETITSDNSNEIHVASENFLESTDLLNN
AtMYB16	-----GNSIFPNSSGMSMENGWTTAETITSDNSNEIHVASENFLESTDLLNN
AtMYB106	-----GNSIFPNSSGMSMENGWTTAETITSDNSNEIHVASENFLESTDLLNN
TtMYBML2	-----GNSIFPNSSGMSMENGWTTAETITSDNSNEIHVASENFLESTDLLNN
AmMIXTA	-----GNSIFPNSSGMSMENGWTTAETITSDNSNEIHVASENFLESTDLLNN
DcMYBML1	-----GNSIFPNSSGMSMENGWTTAETITSDNSNEIHVASENFLESTDLLNN
AtMYB17	-----GNSIFPNSSGMSMENGWTTAETITSDNSNEIHVASENFLESTDLLNN
GhMYB25	SDTLMVCGSDGDKSLMEPRONFNVTGNSASFEEN---KNYVNNLNFANASPGSSVFF
GhMYB25_like	SDTLMVCGSDGDKSLMEPRONFNVTGNSASFEEN---KNYVNNLNFANASPGSSVFF
PgMIXTA	-----RGLPTGKNEATAGVNESEVNYVDN---KNYVNNLNFANASPGSSVFF
MgMYBL8	-----RGLPTGKNEATAGVNESEVNYVDN---KNYVNNLNFANASPGSSVFF
AtMYB16	-----RGLPTGKNEATAGVNESEVNYVDN---KNYVNNLNFANASPGSSVFF
AtMYB106	-----RGLPTGKNEATAGVNESEVNYVDN---KNYVNNLNFANASPGSSVFF
TtMYBML2	-----RGLPTGKNEATAGVNESEVNYVDN---KNYVNNLNFANASPGSSVFF
AmMIXTA	-----RGLPTGKNEATAGVNESEVNYVDN---KNYVNNLNFANASPGSSVFF
DcMYBML1	-----RGLPTGKNEATAGVNESEVNYVDN---KNYVNNLNFANASPGSSVFF
AtMYB17	-----RGLPTGKNEATAGVNESEVNYVDN---KNYVNNLNFANASPGSSVFF

図3 *PgMIXTA* と他の9種の *MIXTA* 遺伝子とのアミノ酸配列の比較

比較した他の9種類の遺伝子では246~405 と差が見られた。表中各段の下に*が付されているのは、そのアミノ酸が10種の遺伝子すべてで共通していることを示している。比較結果を図3に記した。図3が示すように、*MIXTA* 遺伝子同士の配列の一致している部分は、主に170残基までに見られ、それ以降は一致している部分は見られなかった。そこで、*PgMIXTA* の配列を基準とし、他の9種類の *MIXTA* と比較した。紙面の都合で、それらのシークエンスは割愛する。この比較の結果は、次のとおりである。*PgMIXTA* と *MgMYBL8* の配列が一致している部分が多く、特に *PgMIXTA* の216~275残基と *MgMYBL8* の215~268残基を比較したところ、配列の一致している部分が54%、その次に一致している部分が多い *TtMYBML2* の178~289残基では17%であった。

PgMIXTA は *MgMYBML8* と一番近縁性があることが分かっていた。この遺伝子はミムラス (*Mimulus guttatus*) の葉において、普段はトリコーム形成を抑制しているが、葉に昆虫による食害を受けると *MgMYBML8* の発現量が低下しトリコームが生じる (Scoville *et al.* 2011)。そこでキキョウに食害を受けさせ、花に突起形成が起こるか実験をしたが、突起形成は見られなかった (澤他 2015)。したがって、*PgMIXTA* には突起形成抑制機能は無いと判断できる。つまり、その機能のために重要である配列部分に変異していることが考えられる。

MIXTA 遺伝子を含む巨大な遺伝子ファミリーを形成しているのが、*MYB* 遺伝子である。そのタンパク質は、動物から植物まで非常によく保存された DNA 結合ドメインとほとんど相同性が見られない転写活性化ドメインから構成されている。DNA 結合ドメインはアミノ酸配列開始位置に存在し、転写活性化ドメインはアミノ酸配列後半部に位置している。転写活性化ドメインの相同性はあまり見られず、配列の転写因子の違いが、機能の多様性を生じさせている要因の一つだと考えられている (浦尾 他 1995, H. Du *et al.* 2012)。

図3より、比較した遺伝子は120残基までは配列がよく一致しているので、ここまでにDNA結合ドメインが含まれると考えられる。したがって注目すべきは、それ以降の転写活性化ドメインの存在する領域である。結果を見ると、*PgMIXTA* と配列の一致する部分が最も多い *MgMYBML8* でも、配列の異なる部分は多く、同じ機能を持つとは考えにくい。今後の課題としては、コンピュータ上での両者のタンパク質の立体構造の比較、また実験室では、キキョウにおいて *PgMIXTA* をノックアウトしてその機能を探ることが挙げられる。

謝辞

お忙しい中、遺伝子解析実験の原理の御教示、実験の御指導及び、実験器具や薬品を提供して下さった、静岡大学大学院農学領域総合科学技術研究科助教、一家崇志先生、静岡大学大学院農学研究科、博士課程1年の田中靖乃さん、同修士1年の山下寛人さんに心より感謝申し上げます。また、この研究活動の一部は、本校のSSH事業の一環として、予算的な支援を受けています。

参考文献・参考Webサイト

- Q. O. N. Kay, H. S. Daoud and C. H. Stirton. 1981. Pigment distribution, light reflection and cell structure in petals. *Botanical Journal of Linnean Society*. vol. 83. P. 57-84
- K. Noda, B. J. Glover, P. Linstead, C. Martin, Flower colour intensity depends on specialized cell shape controlled by a Myb-related tran-scription factor, *Nature* 369(1996)661-664
- ScovilleAG, Barnett LL, Bodby-Roels S, Kelly JK, Hileman LC. 2011. Differential regulation of a MYB transcription factor is correlated with transgenerational epigenetic inheritance of trichome density in *Mimulus guttatus*. *New Phytol.* 191:251-263
- H. Du, B-R. Feng, S-S. Yang, Y-B. Huang&Y-X. Tang 2012. The R2R3-MYB Transcription Factor Gene Family in Maize. *PLoS one* Vol. 7(6) e37463
- 澤 康一, 鈴木 萌絵, 山本 珠永, 2015. 花と葉の表面構造の違いについて partIV. 第59回静岡県学生科学賞科学教育振興委員会賞受賞作品
- 浦尾 剛, 岩崎 俊介, 柴崎 一雄, 1995. 植物のMYB転写因子の多様な機能. *化学と生物* Vol. 33, No. 1.
- BLASTX (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)
- ORF finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)
- ClustalW (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp>)
- TREEVIEW
- Grasslus (Grass Regulatory Information Server) (<http://grassius.org/family.html?KEYWORDS=MYB&SPECIES=4>)