セントポーリア (*Saintpaulia*) 花卉に蓄積する黄色色素の同定

出口亜由美^{1,2}・大野 翔¹・立澤文見³・土井元章¹・細川宗孝^{1*}

¹ 京都大学大学院農学研究科 606-8502 京都府京都市左京区北白川追分町

² 日本学術振興会特別研究員 (DC2)

³ 岩手大学農学部 020-8550 岩手県盛岡市上田

Identification of the Yellow Pigment in *Saintpaulia* Flowers

Ayumi Deguchi^{1,2}, Sho Ohno¹, Fumi Tatsuzawa³, Motoaki Doi¹ and Munetaka Hosokawa^{1*}

¹ Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606-8502, Japan

² Research fellow of Japan Society for the Promotion of Science

³ Faculty of Agriculture, Iwate University, Morioka 020-8550, Japan

Abstract

A yellow flavonoid pigment was isolated from *Saintpaulia* ‘Tomorrow’s Snowy Night’ with pale yellow pigmentation at the petal base. The pigment, chalcononaringenin 2’,4’-diglucoside, was identified using chemical and spectroscopic methods. The amount of this pigment in somaclonal mutants from ‘Tomorrow’s Snowy Night’ whose petals looked yellow visually was eight-times higher than that in the mother plant, confirming that the accumulated yellow pigment in *Saintpaulia* petals was chalcononaringenin 2’,4’-diglucoside. Moreover, this yellow pigment also accumulated in the stamen filaments, and it was detected in the stamen filaments but not in the petals of the pink cultivar ‘Thamires’. This suggests that the yellow pigment generally accumulates in the stamen filaments of *Saintpaulia* and that most cultivars have the capability to biosynthesize this yellow pigment regardless of their flower colors. These results may be useful to reveal the genetic mechanism for chalcononaringenin 2’,4’-diglucoside biosynthesis.

Key Words : glucose, NMR, somaclonal variation

キーワード : グルコース, NMR, 組織培養変異

緒 言

セントポーリア (*Saintpaulia* sp.) は南アフリカ原産の多年草で、鉢花として最も人気のある花卉園芸作物の一つである。花色は白、ピンク、赤、紫および青紫があり、それらの花色を形成するフラボノイド色素はこれまでに同定されている (Griesbach, 1998; Harborne, 1966; Khokhar ら, 1982; Tatsuzawa ら, 2012, 2015; Tatsuzawa・Hosokawa, 2016)。セントポーリアには濃黄色色素のカルコンやオーロン、カロテノイドは蓄積されず、アジサイなどと同様に花卉全体が濃い黄色の品種は存在しないが、花卉の一部のみが黄色を呈する品種が、現在黄色セントポーリアとして流通している。しかしながら、この黄色セントポーリアに蓄積する黄色色素はまだ同定されていない。我々は花卉の基部が薄く黄色に着色する ‘Tomorrow’s Snowy Night’ において組織培養により花卉の大部分が薄く黄色を呈する変異個体を得た。本研究では、この ‘Tomorrow’s Snowy Night’ の黄色

変異体の解析からセントポーリアに蓄積する黄色色素を特定し、構造を決定した。

材料および方法

1. 供試材料

セントポーリア ‘Tomorrow’s Snowy Night’ を用いた。栽培は寒冷紗で 10000 lx 以下に調節した最低気温 12°C の京都大学のガラスハウスで行った。黄色色素の構造決定のために乾燥花卉約 20 g を用意した。また、HPLC 分析には ‘Tomorrow’s Snowy Night’ の親個体 (第 1 図 A)、後述の組織培養により生じた「黄色変異体」(第 1 図 B)、およびピンク地に青斑の入った ‘タミレス」(第 1 図 C) の花卉および花糸を供試した。

2. 組織培養変異体の獲得

‘Tomorrow’s Snowy Night’ の完全展開葉を有効塩素濃度 0.5% の次亜塩素酸ナトリウム溶液で 10 分間殺菌し、滅菌水でよくすすいだ。主脈を含むように 1 cm 角で切り取った葉片あるいは葯を外植体とし、1-Naphthaleneacetic acid (NAA) 0.1 ppm, Benzyl adenine (BA) 0.5 ppm を含む MS 培地 (Murashige・Skoog, 1962) に置床した。培養は白色蛍

2015 年 7 月 13 日 受付. 2015 年 9 月 14 日 受理.

* Corresponding author. E-mail: mune@kais.kyoto-u.ac.jp

第1図 供試したセントポーリア

A: 'Tomorrow's Snowy Night' 親個体

B: 'Tomorrow's Snowy Night' 黄色変異体

C: 'タミレス'

光灯で 3000 lx, 16 時間日長, 25°C の条件下で行った. 発生した不定芽を寒冷紗で 10000 lx に調節した最低気温 12°C のガラスハウス内で育成した. 培地はバーミキュライト: パーライト: ピートモス=2:2:1 (v/v/v) で混合した混合培地を用いた. 適宜, 液体肥料 (花工場, 住友化学園芸 (株)) を与えて開花させた. 変異は目視で確認し, 開花してすぐに花卉の大部分が黄色を呈する「黄色変異体」を HPLC 解析に用いた.

3. 'Tomorrow's Snowy Night' 花卉に蓄積する黄色色素の精製

'Tomorrow's Snowy Night' 親個体の乾燥花卉約 20 g を 2 L のメタノールに 24 時間浸漬し, 抽出液をろ紙でろ過した. ダイイオン HP-20 ((株) 三菱化学) およびセファデックス LH-20 (GE ヘルスケア・ジャパン (株)) カラムクロマトグラフィーの後, BAW (*n*-ブタノール: 酢酸: 水=4:1:2, v/v/v) を展開溶媒とするペーパークロマトグラフィー (ADVANTEC) により黄色色素を精製した. 精製された色素を調べるために HPLC 分析を行った. 分析は Tatsuzawa ら (2012) と同様に, C18 カラム (Spherisorb ODS2 Column 4.6 ϕ $\times$ 250 mm, Waters) を装着した LC-10A HPLC システム ((株) 島津製作所) 用いて, 40°C, 流速 1 mL $\cdot$ min⁻¹, 検出波長 350 nm で行った. 溶出液として A 液 (1.5% リン酸水溶液) および B 液 (1.5% リン酸, 20% 酢酸, 25% アセトニトリル水溶液) を用意し, サンプル注入後 40 分間で B 液の割合が 20% から 85% に, 続く 5 分間で再び 20% になるように濃度勾配を設定した.

4. 黄色色素の化学分析

精製した色素の吸収スペクトルは分光光度計 (MPS-2450, (株) 島津製作所) を用いて測定した. 溶媒には, メタノール (MeOH), メタノール+ナトリウムメトキシド (MeOH+NaOMe), メタノール+塩化アルミニウム (MeOH+AlCl₃), メタノール+塩化アルミニウム+塩酸 (MeOH+AlCl₃+HCl), メタノール+酢酸ナトリウム (MeOH+NaOAc) およびメタノール+酢酸ナトリウ

ム+ホウ酸 (MeOH+NaOAc+H₃BO₃) の 6 種類を用いた.

精製した色素 0.5 mg を 1 mL の 2N 塩酸に溶解させ, 沸騰浴中で 2 時間処理することで加水分解した. サンプルを冷却した後, 5 mL のエタノールを加えてエバポレーターで濃縮した. 精製色素の糖を薄層 (セルロース薄層板, 20 $\times$ 20 cm, Merck) クロマトグラフィー (TLC) により分析した. 糖の分析には BAW と ETN (エタノール: アンモニア: 水=16:1:3) を展開溶媒として用い (Tatsuzawa ら, 2015), 標品との比較により同定した. 糖は AHP (1.66 g の *o*-フタル酸と 0.91 mL のアニリンを水で飽和した *n*-ブタノールで 10 mL とした) を噴霧して発色させた (Harborne, 1984). また, 加水分解処理の開始後 1 分後の色素溶液を部分加水分解物として用い, アサガオ (*Ipomoea nil* (L.) Roth.) の chalcononaringenin 2'-glucoside とともに HPLC 分析した.

5. 黄色色素の構造決定

精製した黄色色素 1 mg を High resolution fast atom bombardment mass spectra (HR-FABMS) (JEOL JMS-700, 日本電子 (株)) により分析し, 分子量を決定した. さらに精製黄色色素 5 mg を CD₃OD に溶かし, NMR (JEOL AL-400, 日本電子 (株)) の測定 [¹H (400 MHz), ¹³C (100 MHz), ¹H-¹H COSY (correlation spectroscopy), ¹H-¹H NOESY (nuclear Overhauser enhancement and exchange spectroscopy), ¹H-¹³C HMQC (heteronuclear multiple quantum correlation), および ¹H-¹³C HMBC (heteronuclear multiple bond coherence)] を行い, 測定後に色素を回収し, さらに乾燥後, DMSO-*d*₆ に溶かし再度 NMR の測定を行い, 構造解析を行った.

6. 花卉および花糸抽出液の HPLC 分析

'Tomorrow's Snowy Night' 親個体, 黄色変異体および 'タミレス' の生花卉を液体窒素中で磨砕し, 生花卉 100 mg 当たり 1 mL の 5% 酢酸水を加えた. 遠心分離により残渣を取り除き, HPLC 分析に供試した. 分析は Deguchi ら (2015) と同様に, C18 カラム (Spherisorb ODS2 Column 4.6 ϕ $\times$ 250 mm) を装着した L-7000 シリーズ HPLC システム ((株) 日立製作所) を用いて, 40°C, 流速 1 mL $\cdot$ min⁻¹,

検出波長 350 nm で行った. 溶出液の組成および濃度勾配は先述のとおりとした. また, 花糸からの色素抽出は 10 mg 当たり 1 mL の 5% 酢酸水で行い, 同様に HPLC 分析を行った. HPLC データの全ピーク面積および黄色色素のピーク面積について, ‘Tomorrow’s Snowy Night’ の親個体を基準とした時の相対値を算出した.

結 果

1. 黄色色素の精製

‘Tomorrow’s Snowy Night’ 親個体の花卉抽出液の HPLC 分析の結果, 十数本のピークが確認できた (第 2 図 A). 305 個体の組織培養個体中で得られた 2 個体の黄色変異体と親個体とで HPLC のピークを比較すると, ピークの種類に違いはなかったものの, 保持時間 (Rt) 18.8 min 付近

のピークに顕著な差があり, いずれの黄色変異体でもこのピークが高かった (第 2 図 B). 親個体の乾燥花卉から黄色色素を分離精製し, HPLC 分析を行った結果, 親個体と黄色変異体とで顕著に差のあった Rt 18.8 min 付近のピークのみが検出された. これらの結果から, このピークがセントポーリアの黄色発現の原因となるピークであると考え, 乾燥花卉 20 g から精製された 7 mg の色素を続く解析に使用した.

2. 黄色色素の化学分析

加水分解の結果, 精製された黄色色素からはグルコースが検出された. 部分加水分解物の HPLC 分析の結果, 新たに 2 つのピークが生じ, そのうちの 1 つはアサガオの chalcononaringenin 2'-glucoside のピークと一致した.

6 種類の溶媒での吸収スペクトルは以下のとおりであっ

第 2 図 ‘Tomorrow’s Snowy Night’ 親個体 (A) および黄色変異体 (B) の花卉抽出液のクロマトグラム (350 nm)
数字は保持時間を示す

18.22 (A) および 18.18 (B) のピーク (同一ピーク) は検出上限を超えていた

第 3 図 セントポーリアの黄色色素 chalcononaringenin 2',4'-diglucoside の構造
NOESY : nuclear Overhauser enhancement and exchange spectroscopy
HMBC : heteronuclear multiple bond coherence

た. UV : $\lambda_{\max}$ (nm) MeOH 368,305sh,243sh; MeOH + NaOMe 435sh,369,314sh,243sh; MeOH + AlCl₃ 421,324,252sh; MeOH + AlCl₃ + HCl 421sh,388,319,254sh; MeOH + NaOAc 368,305sh,243sh; MeOH + NaOAc + H₃BO₃ 368,305sh,243sh.

3. 黄色色素の構造決定

HR-FABMS により m/z 597.1823 [M+H]⁺ が得られ, 分子式 C₂₇H₃₃O₁₅ (597.1819) と判定した. この結果はカルコノナリゲニン1分子およびグルコース2分子に相当した. また, NMR の測定結果から各分子に相当するシグナルが検出され, さらにそれらの結合様式も ¹H-¹H NOESY, ¹H-¹³C HMBC により決定された (第3図). DMSO-*d*₆ および CD₃OD での NMR スペクトルデータ [¹H (400 MHz), ¹³C (100 MHz)] を以下に示す.

DMSO-*d*₆ ¹H NMR; chalcononaringenin: 7.65 (*d J* = 8.6 Hz, H-2), 6.83 (*d J* = 8.6 Hz, H-3), 6.83 (*d J* = 8.6 Hz, H-5), 7.65 (*d J* = 8.6 Hz, H-6), 7.88 (*d J* = 15.9 Hz, H-7(α)), 7.63 (*d J* = 15.9 Hz, H-8(β)), 6.37 (*d J* = 2.0 Hz, H-3'), 6.21 (*d J* = 2.0 Hz, H-5'); glucose(2'): 5.13 (*d J* = 7.1 Hz, H-1), 3.33 (*t J* = 8.6 Hz, H-2), 3.29 (*m*, H-3), 3.15^a (*m*, H-4), 3.45^b (*m*, H-5), 3.51^c (*m*, H-6a), 3.73^d (*m*, H-6b); glucose(4'): 4.99 (*d J* = 7.3 Hz, H-1),

3.26 (*t J* = 8.3 Hz, H-2), 3.24 (*m*, H-3), 3.18^a (*m*, H-4), 3.47^b (*m*, H-5), 3.49^c (*m*, H-6a), 3.68^d (*m*, H-6b); ¹³C NMR; chalcononaringenin: 125.9 (C-1), 130.9 (C-2), 115.9 (C-3), 160.0 (C-4), 115.9 (C-5), 130.9 (C-6), 123.9 (C-7(α)), 143.7 (C-8(β)), 192.6 (C-9(CO)), 107.4 (C-1'), 159.2 (C-2'), 94.5 (C-3'), 162.5 (C-4'), 97.5 (C-5'), 164.3 (C-6'); glucose(2'): 100.1 (C-1), 73.5 (C-2), 76.3 (C-3), 69.6^e (C-4), 77.0^f (C-5), 60.6^g (C-6); glucose(4'): 99.2 (C-1), 72.9 (C-2), 76.6 (C-3), 69.7^e (C-4), 77.2^f (C-5), 60.6^g (C-6). ^{a-g} は入れ替わり得る.

CD₃OD ¹H NMR; chalcononaringenin: 7.62 (*d J* = 8.5 Hz, H-2), 6.84 (*d J* = 8.5 Hz, H-3), 6.84 (*d J* = 8.5 Hz, H-5), 7.62 (*d J* = 8.5 Hz, H-6), 7.97 (*d J* = 15.4 Hz, H-7(α)), 7.71 (*d J* = 15.4 Hz, H-8(β)), 6.51 (*d J* = 2.4 Hz, H-3'), 6.28 (*d J* = 2.4 Hz, H-5'); glucose(2'): 5.20 (*d J* = 7.3 Hz, H-1), 3.53 (*t J* = 8.7 Hz, H-2), 3.51 (*m*, H-3), 3.36^a (*t J* = 9.0 Hz, H-4), 3.66^b (*m*, H-5), 3.60–3.80 (H-6a), 3.80–4.00 (H-6b); glucose(4'): 5.04 (*d J* = 7.1 Hz, H-1), 3.47 (*m*, H-2), 3.45 (*m*, H-3), 3.33^a (*t J* = 9.3 Hz, H-4), 3.77^b (*m*, H-5), 3.60–3.80 (H-6a), 3.80–4.00 (H-6b); ¹³C NMR; chalcononaringenin: 128.4 (C-1), 132.0 (C-2), 117.0 (C-3), 161.4 (C-4), 117.0 (C-5), 132.0 (C-6), 125.7 (C-7(α)),

第4図 花弁および花系抽出液のHPLCピーク面積の比較

A: 花弁抽出液の全ピーク面積の相対値

B: 花弁抽出液の黄色色素 chalcononaringenin 2',4'-diglucoside ピーク面積の相対値

C: 花系抽出液の全ピーク面積の相対値

D: 花系抽出液の黄色色素 chalcononaringenin 2',4'-diglucoside ピーク面積の相対値

^a すべて 'Tomorrow's Snowy Night' の親個体を1とした

^y n = 4 パーは標準誤差を示す

^x Tukeyの多重検定により異なる英文字 (a-c) 間に有意差 (5%) があることを示す

145.2 (C-8(β)), 195.0 (C-9(CO)), 109.3 (C-1'), 161.2 (C-2'), 95.8 (C-3'), 164.5 (C-4'), 99.7 (C-5'), 166.5 (C-6'); glucose(2'): 101.7 (C-1), 75.0 (C-2), 78.4 (C-3), 71.6^e (C-4), 78.5^d (C-5), 62.7^e (C-6); glucose(4'): 101.2 (C-1), 74.7 (C-2), 77.9 (C-3), 71.6^e (C-4), 78.5^d (C-5), 62.8^e (C-6). ^{a-e}は入れ替わり得る.

以上の結果より, 'Tomorrow's Snowy Night' の花卉から精製された黄色色素は chalcononaringenin 2',4'-diglucoside であることが明らかになった.

4. 黄色変異体の色素蓄積および花糸における色素蓄積の解析

'Tomorrow's Snowy Night' の黄色変異体では, 親個体と比較して, HPLC 全ピーク面積が約 1.6 倍に増加しており (第 4 図 A), chalcononaringenin 2',4'-diglucoside のピーク面積は約 8 倍に増加していた (第 4 図 B). chalcononaringenin 2',4'-diglucoside のピークを除いた全ピーク面積も親個体の約 1.4 倍であったため (データ略), 黄色変異体では色素量が全体的に増加していると考えられたが, なかでも chalcononaringenin 2',4'-diglucoside 蓄積量のみが顕著に増加していると考えられた. また, ピンク品種 'タミレス' の花卉からは chalcononaringenin 2',4'-diglucoside は検出されなかった (第 4 図 B). 花糸抽出液の HPLC 分析の結果, 花糸では chalcononaringenin 2',4'-diglucoside のピーク面積が最も大きく, 主要色素であった (データ略). 黄色変異体では, 花糸においても親個体と比較して全ピーク面積が増加していたが (第 4 図 C), 黄色色素ピーク面積は全ピーク面積の増加に伴い増加しており, 特異的に増加しているわけではなかった (第 4 図 D). また, 花糸では蓄積のみられなかった 'タミレス' においても花糸では黄色色素のピークが検出された (第 4 図). よって, 'Tomorrow's Snowy Night' の花卉に蓄積する黄色色素は花糸に蓄積する黄色色素と同一であり, 花糸においては他品種でも蓄積していることが明らかになった.

考 察

1. セントポーリアの黄色色素

本研究でセントポーリア 'Tomorrow's Snowy Night' の花卉基部に蓄積する黄色色素として chalcononaringenin 2',4'-diglucoside が同定された. chalcononaringenin 2',4'-diglucoside はカンアオイ属 (*Asarum*) およびタカアシサイシン (*Saruma henryi*) の葉に蓄積していることが報告されているが (Iwashina・Kitajima, 2000; Iwashina ら, 2002, 2005), 花卉での蓄積はセントポーリアを用いた本誌が初めての報告である. 'Tomorrow's Snowy Night' 以外の黄色品種でも chalcononaringenin 2',4'-diglucoside が検出されたことから (データ略), 現在流通しているセントポーリアの黄色品種はこの色素により黄色を呈していると考えられた.

2. chalcononaringenin 2',4'-diglucoside の合成機構

アサガオおよびカーネーション (*Dianthus caryophyllus*

L.) の花卉に蓄積する黄色色素 chalcononaringenin(chalcone) 2'-glucoside は, アントシアニン合成経路上のカルコン異性化酵素 (CHI) の機能欠損により合成されることが報告されている (Forkmann・Dangelmayr, 1980; Itoh ら, 2002; Saito ら, 2011). また, この黄色色素の合成にはカルコンへのグルコース転移酵素 (CHGT) のはたらきが重要であることも示唆されている (Itoh ら, 2002). よって, セントポーリア 'Tomorrow's Snowy Night' の花卉基部での chalcononaringenin 2',4'-diglucoside の蓄積には CHI および CHGT の発現が関与している可能性があり, 今後はこれらの遺伝子発現を中心に解析を進めていくことになる. また, この黄色色素は, 花卉には本色色素を蓄積しないピンク品種 'タミレス' の花糸でも検出されたため, 花糸においては一般的に蓄積する色素であることが示唆された. 従って, 黄色品種だけでなくその他の花色を示す品種も広く chalcononaringenin 2',4'-diglucoside 合成能力を有している可能性が示唆された.

3. 'Tomorrow's Snowy Night' の黄色変異体

組織培養で得られた 'Tomorrow's Snowy Night' の黄色変異体は, 花卉全体での全色素量が親個体と比較して増加しており (第 4 図 A), 特に黄色色素 chalcononaringenin 2',4'-diglucoside の蓄積量が著しく増加していた (第 4 図 B). 花卉基部での黄色色素蓄積量を親個体と比較すると 1.5 倍程度であったことから (データ略), 黄色変異体における花卉全体での黄色色素蓄積量の大幅な増加は, 見た目に明らかなように花卉上の蓄積部位の拡大の結果であると考えられた. すなわち, 黄色変異体では黄色色素合成が花卉の大部分で生じるような変異が起こっていると考えられた. 今回, セントポーリアの黄色色素が chalcononaringenin 2',4'-diglucoside であることが明らかになったことから, 今後, 合成遺伝子の特定や部位特異的な着色機構の解明といった進展が期待できる.

摘 要

セントポーリア 'Tomorrow's Snowy Night' の親個体および組織培養変異体として出現した黄色変異体の花卉から黄色色素を単離し, 化学分析およびスペクトル分析により chalcononaringenin 2',4'-diglucoside であることを明らかにした. 黄色変異体では主に蓄積部位の拡大により花卉全体での chalcononaringenin 2',4'-diglucoside 蓄積量が増加していた. また, chalcononaringenin 2',4'-diglucoside はセントポーリアの花糸においては花卉での蓄積とは関係なく蓄積しており, この合成能力は黄色品種以外にも広く存在すると考えられた. これらの情報はセントポーリアにおける chalcononaringenin 2',4'-diglucoside 合成の遺伝子機構の解明に役立つだろう.

引用文献

Deguchi, A., F. Tatsuzawa, M. Hosokawa, M. Doi and S. Ohno.

2015. Tobacco streak virus (strain dahlia) suppresses post-transcriptional gene silencing of *flavone synthase II* in black dahlia cultivars and causes a drastic flower color change. *Planta*. 242: 663–675.
- Forkmann, G. and B. Dangelmayr. 1980. Genetic control of chalcone isomerase activity in flowers of *Dianthus caryophyllus*. *Biochem. Genet.* 18: 519–527.
- Griesbach, R. J. 1998. Flavonoids in *Saintpaulia ionantha* expressing the fantasy mutation. *Phytochemistry* 48: 829–830.
- Harborne, J. B. 1966. Comparative biochemistry of flavonoids—II.: 3-Desoxyanthocyanins and their systematic distribution in ferns and gesnerads. *Phytochemistry* 5: 589–600.
- Harborne, J. B. 1984. *Phytochemical methods*, second ed. Chapman and Hall, London and New York.
- Itoh, Y., D. Higeta, A. Suzuki, H. Yoshida and Y. Ozeki. 2002. Excision of transposable elements from the chalcone isomerase and dihydroflavonol 4-reductase genes may contribute to the variegation of the yellow-flowered carnation (*Dianthus caryophyllus*). *Plant Cell Physiol.* 43: 578–585.
- Iwashina, T. and J. Kitajima. 2000. Chalcone and flavonol glycosides from *Asarum canadense* (Aristolochiaceae). *Phytochemistry* 55: 971–974.
- Iwashina, T., J. Kitajima, T. Shiuchi and Y. Itou. 2005. Chalcones and other flavonoids from *Asarum sensu lato* (Aristolochiaceae). *Biochem. Syst. Ecol.* 33: 571–584.
- Iwashina, T., W. Marubashi and T. Suzuki. 2002. Chalcones and flavonols from the Chinese species, *Saruma henryi* (Aristolochiaceae). *Biochem. Syst. Ecol.* 30: 1101–1103.
- Khokhar, J., J. Humphreys, K. Short and B. Grout. 1982. Anthocyanins in African Violet. *HortScience* 17: 810–811.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 473–497.
- Saito, N., F. Tatsuzawa, A. Hoshino, Y. Abe, M. Ichimura, M. Yokoi, K. Toki, Y. Morita, S. Iida and T. Honda. 2011. Anthocyanin pigmentation controlled by *speckled* and *c-1* mutations of Japanese morning glory. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 80: 452–460.
- Tatsuzawa, F. and M. Hosokawa. 2016. Flower colors and their anthocyanins in *Saintpaulia* cultivars (Gesneriaceae). *Hort. J.*, in press.
- Tatsuzawa, F., M. Hosokawa, N. Saito and T. Honda. 2012. Three acylated anthocyanins and a flavone glycoside in violet-blue flowers of *Saintpaulia* ‘Thamires’. *S. Afr. J. Bot.* 79: 71–76.
- Tatsuzawa, F., S. Matsuda, K. Kato and M. Hosokawa. 2015. Acetylated anthocyanidin 3-*O*-di-glycosides in red-purple flowers and grayed-purple leaves of *Saintpaulia* ‘Tomoko’. *Hort. J.* 84: 77–82.