九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

ブドウにおける果実成熟と果皮アントシアニン

白石，眞一
九州大学農学部果樹生産学

渡部，由香
九州大学農学部果樹生産学

https://doi.org/10.15017/23523

出版情報：九州大學農學部學藝雜誌. 48 (3/4), pp.247-254, 1994-03. 九州大學農學部
バージョン：
権利関係：

九大農学芸誌 (Sci. Bull. Fac. Agr., Kyushu Univ.)
第48巻 第3・4号 247-254 (1994)

ブドウにおける果実成熟と果皮アントシアニン

白石眞一・渡部由香
九州大学農学部果樹生産学
(1994年1月17日受理)

Fruit Ripes and Anthocyanin Pigments in the Skin of Grapes (*Vitis spp.*)

Shinichi SHIRAISHI and Yuka WATANABE
Fruit Science Laboratory, Faculty of Agriculture,
Kyushu University, Fukuoka 811-23

緒言

ブドウ果実が生長期を経て成熟期にはいると，果粒の柔軟化と共に果実の糖含量の増加，酸含量の減少など成分に変化が起こる．これらの成分の中で，果実の糖含量は果実の着色と密接な関係があるとされている．例えば，'Concord' では還元糖が8％以上で着色し始めると報告されている（Webster *et al.*, 1934）．また，'Delaware' の着色良好果は少なくとも糖含量が17.5％以上であることが報告されている（小林・細井，1953）．

しかしながら，果実内の成分の変化と果皮アントシアニンの組成との関係についてはほとんど明らかにされていない．また，ブドウ果実は成熟期間が長期にわたるため，成熟過程において果皮アントシアニン組成が変化することも考えられる．

果皮アントシアニン組成をそれぞれの品種の遺伝的背景に基づく特徴として捉える場合，果実の成熟段階において，その品種本来のアントシアニン組成の発現する時期を明らかにする必要がある．

また，近年'甲州'において，果実内に糖が蓄積せず着色も進まない"味無し果"の発生が問題になっているが，これは，ウイルスが原因で起こる成熟遅延現象とされている．他の品種でも果実の糖度の減少や着色不良の原因の一つにウイルスが関与していると推測されている．

果実の糖含量と果皮の着色が関連していることを前提にすると，ウイルスにり病し，成熟が進まない果実では品種本来のアントシアニン組成が発現し得ない可能性がある．

以上のことから，本報告では着色開始期からの果実の糖と酸の変化を調査することにより，果実の成熟過程を把握すると共に，果皮アントシアニン組成の変化を調査した．また，ウイルス接種樹と健全樹について果皮アントシアニンを調査，比較した．

材料および方法

1．果皮アントシアニンの時期的変化

九州大学農学部実験圃場のビニルハウス内で無加温栽培を行った自根3年生のブドウ品種 'Royal', 'Queen', 'Schuyler', 'Russki Concord' を用い1984年に実験を行った．

果実の糖含量，有機酸含量を約10日おきに調査した．採取量は5粒以上，あるいは50g以上とし－20℃で凍結保存して実験に供した．

果粒の種子を除去した後，果肉量を測定し乳鉢で磨砕後脱イオン水を加えて遠心分離を行い上澄液を得た．この操作を3反復した後250mlに定容し，糖および有機酸含量の測定に供した．

①糖の定量

ブドウ果肉中の糖の大部分は還元糖であるブドウ糖と果糖であり，非還元糖であるショ糖はほとんど含まれていないことが明らかにされている（能塚・白石，1981）ことから，還元糖のみを定量した．還元糖はソモギ法（赤塚・船橋，1957）により，また還元糖中の果糖量は，システイン・カルバゾール硫酸改良法（能塚・白石，1981）によって定量し，還元糖量から果糖量を差し引いた値をブドウ糖量とした．

②有機酸の定量

抽出液の一部を用い0.1 規定の水酸化ナトリウム溶液で滴定を行い遊離酸量を求めた．全酸の定量は陽イオン交換樹脂アンバーライト IR-120 カラムに通液した後同様にして求めた．当量点は pH7.8 とした．また全酸量から遊離酸量を差し引いた値を結合酸量とし，慣行に従い酒石酸量に換算した（白石，1980）．

③アントシアニン量

果実の着色が始まった時点から果皮を剝皮し，脱イオン水で洗浄した後凍結乾燥した．乾燥させた果皮に1％塩酸酸性メタノールを加え，十分に磨砕した後吸引ろ過，定容した後 530nm での吸光度を測定し，乾燥果皮 1g 抽出液 1l 当たりに換算した．

④アントシアニン組成

凍結乾燥果皮を1％塩酸酸性メタノールで抽出し，塩基性酢酸鉛法（太田ら，1976）で精製した後，アントシアニンの分離同定を前報（Shiraishi and Watanabe, 1986）に従って行った．

2．ウイルス接種が果皮アントシアニンに及ぼす影響

山梨県果樹試験場においてリーフロールとフレックを接種しウイルス検定が行われた‘甲斐路（Kaiji)’，‘甲州（Koshu)’，‘シャインレッド（Shine red)’および‘巨峰（Kyoho)’を用いた．果実の測色と果皮アントシアニン組成比の調査は前項と同様に行った．果皮アントシアニン含量は乾燥果皮を1％塩酸酸性メタノールで抽出し，定容後シアニジン-3-モノグルコシド量として表示した．

結　　果

1．果皮アントシアニンの時期的変化

第1図に‘Royal’の糖含量と酸含量の時期的変化を示す．糖含量の上昇は2段階あり，7月21日に最初の糖の上昇が見られ横ばい状態になった後，8月9日から再び急激に増加し8月19日には17％を示し可食期に達した．遊離酸含量は7月10から30日にかけて急激に低下し，以後ほぼ横ばい状態となった．

第1表に‘Royal’のアントシアニン含量と組成の時期的変化を示す．遊離酸含量が低下した7月30日に着色が始まった．着色開始期から大量のアントシアニンが存在し，その量は8月19日に最大値を示し，以後暫減したが，成熟過程を通して高い値を維持した．アントシアニン組成は着色初期から主要色素であるマルビジン-3-モノグルコシドが存在し，成熟期間を通して変化はみられなかった．

第2図に‘Queen’の糖含量と酸含量の時期的変化を示す．‘Queen’は遊離酸含量が低下した7月30日から着色を開始した．着色初期のアントシアニン含量は少なく，後に増大した．成熟期の果実の主要色素はマルビジン-3-モノグルコシドとペオニジン-3-モノグルコシドであるが，着色開始期からこれらの主要色素が認められた．成熟が進むにしたがってシアニジン-3-モノグルコシドが出現し，マルビジン-3-モノグルコシドとペオニジン-3-モノグルコシドの組成割合が減少した．

第3図に‘Schuyler’の糖含量と酸含量の時期的変化を示す．遊離酸含量は6月30日に減少し始め，糖

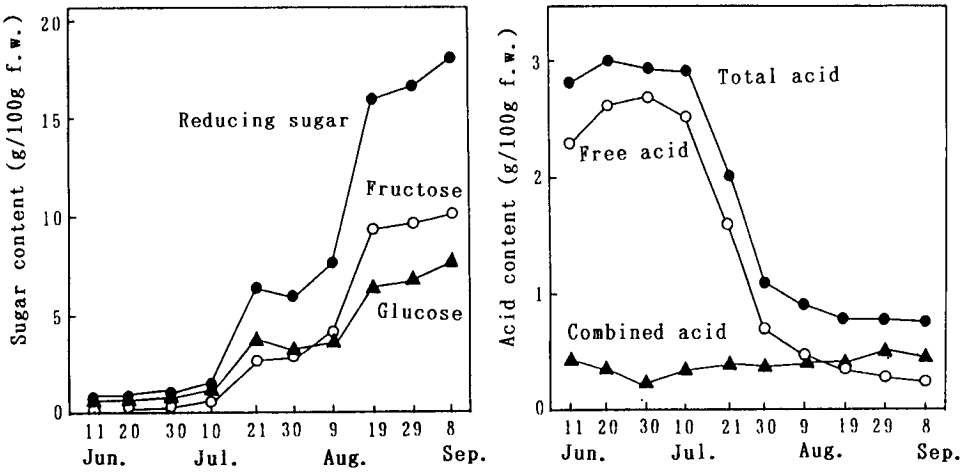

Fig. 1. Seasonal changes of sugar and acid contents in grape berries of ‘Royal’.

Table 1. Changes of anthocyanin content and composition (%) in skin of grape cultivar 'Royal'.

Date	Anthocyanin content[x]	Anthocyanidin[y]					Dl[z] type	Me-An[w]	Glycoside[u]		
		Cy	Pn	Dl	Pt	Mv			MG	DG	Acy
7.30	1.028	3	2	8	10	77	95	89	100	0	17
8.19	1.400	5	5	4	8	78	90	91	100	0	28
8.29	1.259	6	7	7	12	68	87	87	100	0	27
9.8	1.186	7	5	5	7	76	88	88	100	0	26

[x] OD 530 nm/g dry peel/*l* 1% HCl Me-OH
[y] CY ; Cyanidin, Pn ; Peonidin, Dl ; Delphinidin, Pt ; Petunidin, Mv ; Malvidin.
[z] Dl type ; Dl+Pt+Mv. [w] Me −An ; Pn +Pt+Mv.
[u] MG ; Monoglucoside, DG ; Diglucoside, Acy ; Acylated anthocyanin.

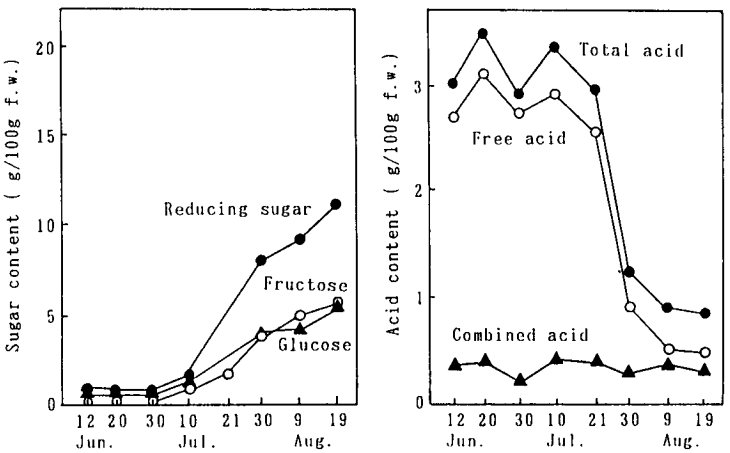

Fig. 2. Seasonal changes of sugar and acid contents in grape berries of 'Queen'.

Table 2. Changes of anthocyanin content and composition (%) in skin of grape cultivar 'Queen'.

Date	Anthocyanin content[x]	Anthocyanidin[y]					Dl[z] type	Me-An[w]	Glycoside[u]		
		Cy	Pn	Dl	Pt	Mv			MG	DG	Acy
7.30	0.100	0	5	10	8	77	95	90	100	0	0
8.09	0.368	12	14	7	10	57	74	81	100	0	0
8.19	0.457	28	15	9	13	35	57	63	100	0	0

[x] OD 530 nm/g dry peel/*l* 1% HCl Me-OH
[y] CY ; Cyanidin, Pn ; Peonidin, Dl ; Delphinidin, Pt ; Petunidin, Mv ; Malvidin.
[z] Dl type ; Dl+Pt+Mv. [w] Me −An ; Pn +Pt+Mv.
[u] MG ; Monoglucoside, DG ; Diglucoside, Acy ; Acylated anthocyanin.

含量は6月30日には増加し始めた．着色開始期はそれよりやや遅れ，7月10日であった．

第3表に 'Schuyler' のアントシアニン含量と組成の変化を示す．アントシアニン含量は着色初期（7月10日）から8月9日までは僅かずつ増加するに留まったが，以後の10日間（8月19日）で着色は急激に進

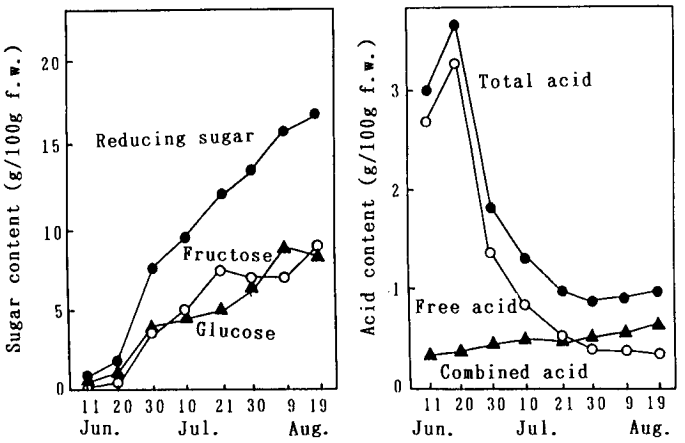

Fig. 3. Seasonal changes of sugar and acid contents in grape berries of 'Schuyler'.

Table 3. Changes of anthocyanin content and composition (%) in skin of grape cultivar 'Schuyler'.

Date	Anthocyanin content[x]	Anthocyanidin[y]					Dl[z] type	Me-An[w]	Glycoside[u]		
		Cy	Pn	Dl	Pt	Mv			MG	DG	Acy
7.10	0.306	1	0	11	24	64	99	88	70	30	69
7.21	0.494	1	0	17	29	53	99	82	66	34	62
7.30	0.638	0	0	12	36	52	100	88	62	38	58
8.9	0.700	0	1	13	29	57	99	87	64	36	62
8.19	1.133	0	0	13	26	61	100	87	65	35	61

[x] OD 530 nm/g dry peel/l 1% HCl Me-OH
[y] CY ; Cyanidin, Pn ; Peonidin, Dl ; Delphinidin, Pt ; Petunidin, Mv ; Malvidin.
[z] Dl type ; Dl+Pt+Mv. [w] Me −An ; Pn +Pt+Mv.
[u] MG ; Monoglucoside, DG ; Diglucoside, Acy ; Acylated anthocyanin.

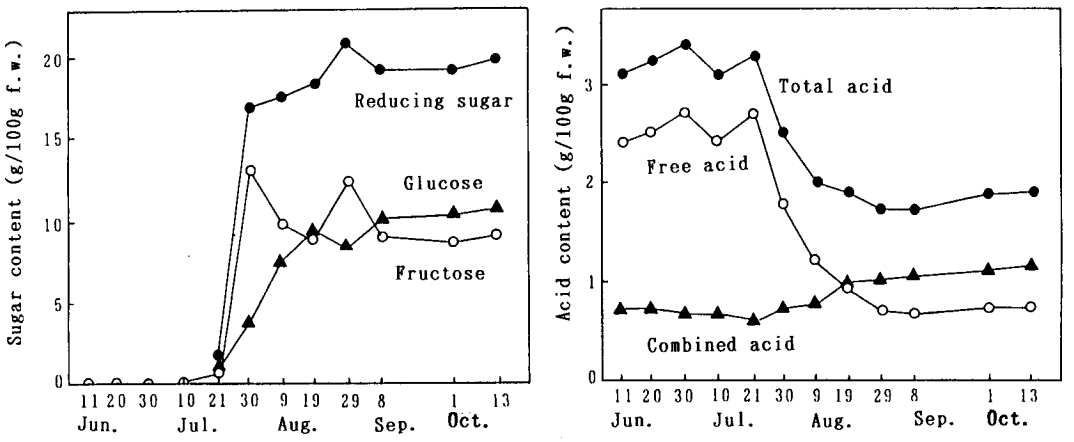

Fig. 4. Seasonal changes of sugar and acid contents in grape berries of 'Russki Concord'.

行し，その含量は 1.5 倍に達した．アントシアニン組成は着色初期から主要アントシアニジンであるマルビジンが出現し，その組成割合はほとんど変化しなかった．

Table 4. Changes of anthocyanin content and composition (%) in skin of grape cultivar 'Russki Concord'.

Date	Anthocyanin content[x]	Anthocyanidin[y]					Dl[z] type	Me-An[w]	Glycoside[u]		
		Cy	Pn	Dl	Pt	Mv			MG	DG	Acy
7.30	0.827	2	0	16	27	55	98	82	50	50	43
8.9	1.759	0	0	15	23	62	100	85	58	42	37
8.19	2.956	0	0	11	23	66	100	89	55	45	50
9.8	3.766	0	0	14	19	67	100	86	41	59	43
10.1	4.250	0	0	13	19	68	100	87	46	54	41
10.13	4.203	0	0	13	19	68	100	87	46	54	41

[x] OD 530 nm/g dry peel/l 1% HCl Me-OH
[y] CY ; Cyanidin, Pn ; Peonidin, Dl ; Delphinidin, Pt ; Petunidin, Mv ; Malvidin.
[z] Dl type ; Dl+Pt+Mv. [w] Me −An ; Pn +Pt+Mv.
[u] MG ; Monoglucoside, DG ; Diglucoside, Acy ; Acylated anthocyanin.

第4図に'Russki Concord'の糖含量と酸含量の時期的変化を示す．糖含量に関しては7月下旬に高くなったが，遊離酸含量は8月になってもあまり低下せず，10月までやや高い値で推移した．

第4表に'Russki Concord'のアントシアニン含量と組成の変化を示す．着色開始期は，糖含量が急速に上昇し酸含量が減少する7月30日と一致した．アントシアニン含量は着色初期から順調に増大し，10月1日に最大値に達し，10月13日まで変化しなかった．一方アントシアニジンの組成は成熟過程を通してほとんど変化が認められなかった．またジグルコシドやアシル化色素の組成割合もほとんど変化がみられなかった．

2．ウイルス接種が果皮アントシアニンに及ぼす影響

'甲斐路'ではリーフロール+，フレックーの区がアントシアニン含量が高かった．アントシアニン組成はシアニジン-3-モノグルコシドが主要色素であり，いずれの区も大きな差はなかった（第5表）．

'甲州'でも'甲斐路'と同様リーフロール+，フレックーの区でアントシアニン含量が高かった．アントシアニン組成はシアニジン-3-モノグルコシドが主要色素とし，他にペオニジン-3-モノグルコシドを含んでおり，いずれの区でも大きな差は認められなかった（第6表）．

'シャインレッド'でも'甲斐路'同様の傾向がみられ，リーフロール+，フレックーの区でアントシアニン含量が多く，アントシアニン組成はいずれの区でも大きな差はなかった（第7表）．

'巨峰'においてはリーフロール+，フレックーの区ではL*値，b*値が高く，いわゆる赤熟れの状態となった．しかしながらアントシアニン組成には大きな差はなかった（第8表）．

Table 5. Anthocyanin composition (%) in skin of grape cultivar 'Kaiji' infected by virus.

Virus		Brix	L*	a*	b*	Anthocyanin content[x]	Anthocyanidin					Dl[z] type	Me-An[w]	Glycoside[v]	
Leafroll	Flex						Cy	Pn	Dl	Pt	Mv			MG	Acy
−	−	20.8	27.5	14.0	5.5	417.5	91	4	5	0	0	5	4	100	0
−	+	18.9	31.3	13.9	6.6	384.1	89	5	5	0	0	5	5	100	1
+	−	18.7	27.2	14.7	4.6	963.8	90	4	5	0	0	5	4	100	0
+	+	18.1	29.4	14.2	5.4	654.8	89	3	8	0	0	8	3	100	1

[x] μg (cyanidin-3-monoglucoside) /g dry peel
[y] Cy ; Cyanidin, Pn ; Peonidin, Dl ; Delphinidin, Pt ; Petunidin, Mv ; Malvidin.
[z] Dl type ; Dl+Pt+Mv. [w] Me−An ; Pn +Pt+Mv.
[v] MG ; 3-monoglucoside, Acy ; Acylated with p-coumaric acid.

Table 6. Anthocyanin composition (%) in skin of grape cultivar 'Koshu' infected by virus.

Virus		Brix	L*	a*	b*	Anthocyanin content[x]	Anthocyanidin					Dl[z] type	Me-An[w]	Glycoside[v]	
Leafroll	Flex						Cy	Pn	Dl	Pt	Mv			MG	Acy
−	−	17.5	31.0	12.0	1.9	742.6	49	38	3	3	7	13	48	100	0
−	+	17.3	29.6	13.8	1.9	417.6	56	28	3	3	10	16	41	100	0
+	−	16.3	31.3	10.2	3.7	906.1	50	26	3	3	15	21	47	100	3
+	+	14.7	31.2	10.8	3.5	844.7	46	37	5	5	7	17	49	100	3

[x] μg. (cyanidin-3-monoglucoside) /g dry peel
[y] Cy ; Cyanidin, Pn ; Peonidin, Dl ; Delphinidin, Pt ; Petunidin, Mv ; Malvidin.
[z] Dl type ; Dl+Pt+Mv. [w] Me−An ; Pn +Pt+Mv.
[v] MG ; 3-monoglucoside, Acy ; Acylated with *p*-coumaric acid.

Table 7. Anthocyanin composition (%) in skin of grape cultivar 'Shine Red' infected by virus.

Virus		Brix	L*	a*	b*	Anthocyanin content[x]	Anthocyanidin					Dl[z] type	Me-An[w]	Glycoside[v]	
Leafroll	Flex						Cy	Pn	Dl	Pt	Mv			MG	Acy
−	−	19.3	26.9	14.7	3.6	1115.7	58	18	20	4	0	24	22	100	0
−	+	17.1	27.2	13.9	4.3	1710.1	57	20	14	3	0	17	23	100	3
+	−	17.8	27.1	14.8	4.2	3085.4	58	27	9	4	0	13	31	100	1
+	+	17.3	26.8	16.0	3.5	946.5	58	24	10	3	0	13	27	100	2

[x] μg (cyanidin-3-monoglucoside) /g dry peel
[y] Cy ; Cyanidin, Pn ; Peonidin, Dl ; Delphinidin, Pt ; Petunidin, Mv ; Malvidin.
[z] Dl type ; Dl+Pt+Mv. [w] Me−An ; Pn +Pt+Mv.
[v] MG ; 3-monoglucoside, Acy ; Acylated with *p*-coumaric acid.

Table 8. Anthocyanin composition (%) in skin of grape cultivar 'Kyoho' infected by virus.

Virus		Brix	L*	a*	b*	Anthocyanin content[x]	Anthocyanidin					Dl[z] type	Me-An[w]	Glycoside[v]		
Leafroll	Flex						Cy	Pn	Dl	Pt	Mv			mg	DG	Acy
−	−	21.4	22.3	24.7	0.3	196.2	0	35	1	0	64	65	99	62	38	52
+	+	20.3	26.5	24.8	3.5	59.4	1	25	2	5	67	74	97	62	38	51

[x] μg (cyanidin-3-monoglucoside) /g dry peel
[y] Cy ; Cyanidin, Pn ; Peonidin, Dl ; Delphinidin, Pt ; Petunidin, Mv ; Malvidin.
[z] Dl type ; Dl+Pt+Mv. [w] Me−An ; Pn +Pt+Mv.
[v] MG ; 3-monoglucoside, Acy ; Acylated with *p*-coumaric acid.

考　　察

ブドウの果実中に含まれる主な糖はブドウ糖と果糖である．これらの糖含量の割合は，果実の発育初期にはブドウ糖が多く，成熟するにしたがって果糖が増し，成熟期にはやや果糖含量が高まるとされている（小林，1970）．今回の調査では，その傾向に当てはまるのはヨーロッパブドウの 'Royal' と 'Queen' であり，'Schuyler'，'Russki Concord' では成熟段階におけるブドウ糖と果糖の量は上下入れ替わりながら，その比率を1：1前後に保ちつつ上昇する動向を示した．

ヨーロッパブドウの 'Royal'，'Queen' はまず糖含量が上昇し始めた後しばらくしてから遊離酸含量が減少し，遊離酸含量が急激に減少する7月30日に着色

が始まることから，これらの品種では遊離酸含量の変化の動向と着色が密接な関係にあることが明らかとなった．

'Schuyler' は糖含量の上昇，酸含量の低下が6月30日頃であり，成熟過程にはいる時期が早い早熟型品種と言えるが，果実の成熟の開始に比べると着色が遅れ気味であることを認めた．'Russki Concord' は着色開始が7月30日であり，糖含量の増加と酸含量の減少が起こる時期に一致した．

以上のことから成熟過程の糖，酸含量の動向と着色開始期の関係については，品種間の差異が認められたが，アントシアニン組成に関しては，'Royal'，'Russki Concord'，'Schuyler' の3品種については，成熟初期と後期ではほとんど変化がみられなかったことや，成熟過程においてアントシアニン組成の変化が認められた 'Queen' でも，着色初期から最も複雑な型のアントシアニンが形成されたことから，アントシアニン生合成は着色初期の時点で速やかに最終段階まで進むと考える．

また，アントシアニン含量が増大する過程で，アントシアニン組成がほとんど変化しないことから，アントシアニンB環のヒドロキシル化，メチル化，また，配糖体化，アシル化は成熟過程の相当期間で活性があると考える．'Queen' に関しては成熟後期にメチル化アントシアニンの割合が減少したが，'Queen' の場合，糖と酸の含量からみると，8月9日にはほぼ成熟に達しており，8月19日の果実の状態は過熟であったため，メチル化の能力が落ちたと考える．しかし，この段階でも色素含量の順位の変化は見られなかったことから，ブドウの場合，成熟の相当長期間にわたって品種特有のアントシアニン組成を示すと考えられる．

ブドウ果皮アントシアニン組成の時期的変化は Gonzalez-Sanjose *et al.* (1990) がヨーロッパブドウ 'Tempranillo' を用いて調査を行っており，アシル化色素に関しては変化が激しいと報告しているが，今回の調査ではそのような傾向は見られなかった．

以上のことから，糖含量の増加や酸含量の減少など成熟過程に入ったと思われる何らかの特徴をもつブドウ果実であれば，品種特有のアントシアニン組成を持つとことが明らかとなった．

'巨峰' のウイルス接種区においてアントシアニン含量が低下したことは，一般的に言われているウイルスによる着色不良説を支持するものであり，ウイルスが原因でアントシアニジン生合成経路が十分に働いていないと考えられる．しかしながら，'甲斐路'，'甲州'，'シャインレッド' ではウイルス接種区においても高いアントシアニン含量を示しているので，単にウイルスに感染することによって，果実の着色に直ちに影響がでるとは考えられない．

アントシアニン含量が処理区によって2倍から3倍程度の差がある場合でもアントシアニン組成比の差が認められなかったことは，アントシアニン含量が増すに従ってヒドロキシル化，メチル化，配糖体化，アシル化の活性も平行して上昇することを示しており，結果的にはアントシアニン含量の多少によって，アントシアニン組成が変化することはないと結論される．

現在日本国内で古くから栽培されているブドウ品種のほとんどがウイルスに感染しているといわれ，ウイルスフリー苗への更新が進められている．これまでの分析実験において使用したブドウ果実もウイルスに感染している可能性があるが，この調査によりウイルスにり病している果実でも，ある程度の着色がみられた場合は品種特有のアントシアニン組成を持つことが明示された．

要　　約

'Royal'，'Russki Concord'，'Schuyler'，'Queen' のアントシアニンの時期的変化を調査した．'Royal'，'Russki Concord'，'Schuyler' では着色初期からアントシアニン組成はほとんど変化が認められなかった．'Queen' ではアントシアニン組成の変化がみられたが，着色初期から構造的に最も複雑なアントシアニンが形成されたことから，アントシアニン生合成は着色初期の時点で速やかに最終段階まで進むと考えた．またウイルスの接種によるアントシアニン含量の変化は品種によって異なり，単なるウイルス感染のみで果実の着色に直ちに影響がでるとは考えられなかった．またウイルス接種によってアントシアニン含量が減少した場合でも，アントシアニン組成の変化はなく，ウイルスにり病した場合でも品種特有のアントシアニン組成を示すと考えた．

文　　献

赤塚四郎・船橋三郎　1957　科学実験講座．23巻　丸善．東京

González-Sanjosê, M. L., L. J. R. Barron and C. Díez 1990 Evolution of anthocyanins during maturation of Tempranillo grape variety (*Vitis vinifera*) using polynomial regression models. *J. Sci. Food Agric.*, **51**: 337-343

小林　章　1970　ブドウ園芸．養賢堂，東京

小林　章・細井寅三　1953　葡萄樹に及ぼす肥料3要素の影響．園学要旨，昭28春: 7-8
能塚一徳・白石眞一　1981　施設ブドウ育種に関する基礎的研究（第2報）成熟過程における果実糖の分別定量分析調査．福岡園試験報，**19**: 21-28
太田英明・筬島豊・沢村正義・中村浩・芥田三郎　1976　ブドウ果汁の品質に関する研究（第1報）貯蔵中における濃縮ブドウ果
白石眞一　1980　施設ブドウ育種に関する基礎的研究（第1報）成熟過程における果実有機酸の分析調査．福岡園試験報，**18**: 9-17
Shiraishi, S. and Y.Watanabe 1986 Anthocyanin Pigments of Black-purple Grapes Related to Variety 'Kyoto' (*Vitis vinifera* L. x *V. labrusca* L.). *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, **55**(2): 123-129
Webster, J. E., E. Anderson and F. Cross 1934 Chemical and enzymatic studies of uneven riping of Concord grapes. *Pro. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **32**: 365-369

Summary

In 'Royal', 'Russki Concord' and 'Schuyler' grapes, anthocyanin composition was slightly changed during ripening. However, the anthocyanin composition of 'Queen' showed evolution. Major anthocyanin, malvidin glucoside, was appeared in the early period of ripening. Because the end product as malvidin glucoside was appeared soon, the biosynthesis of anthocyanin was rapidly proceeded to last step at an early stage of fruit color development.

The anthocyanin compositions of 'Kaiji', 'Koshu', 'Sekirei' and 'Kyoho', infected by virus were investigated. Some cultivars, infected by virus, showed a reduction in anthocyanin content but its composition was stable.