

ブドウ‘黒王’の成熟期における温度が果実の着色および アントシアニン関連酵素活性に及ぼす影響

森 健太郎^{1*}・菅谷純子²・弦間 洋²

¹ 筑波大学大学院農学研究科 305-8572 茨城県つくば市天王台 1-1-1

² 筑波大学農林学系 305-8572 茨城県つくば市天王台 1-1-1

Changes in the Coloration and Activities of Enzymes Involved in Anthocyanin Synthesis of ‘Kokuo’ Grapes Grown under Different Temperature Conditions During Ripening

Kentaro Mori^{1*}, Sumiko Sugaya² and Hiroshi Gemma²

¹ Doctoral Program in Agricultural Science, University of Tsukuba, Tsukuba, 305-8572

² Institute of Agriculture and Forestry, University of Tsukuba, Tsukuba, 305-8572

Summary

To clarify the mechanism regulating anthocyanin biosynthesis in ‘Kokuo’ grapes grown under high night temperatures, we examined flavonoid accumulation and the activities of related enzymes in the grapes. When grapes were grown at 25°C day temperature and high night temperatures (25°C), anthocyanin content in the skin was higher than that of grapes grown under low night temperatures (15°C). On the contrary, at 30°C day temperature conditions, anthocyanin content in the skin of grapes grown under high night temperatures (30°C) was markedly lower than that of grapes grown under low night temperatures (15°C). Flavonol and proanthocyanin contents in the skin of grapes grown under high temperatures were higher than that of grapes grown under low night temperatures. Although there was little effect of night temperatures on phenylalanine ammonia lyase (PAL) activity in the skin, UDP-glucose:flavonoid 3-O-glucosyltransferase (UFGT) activity in the skin of grapes grown under high night temperatures was lower than that of grapes grown under low night temperature. These results suggest that anthocyanin accumulation in the skin of grapes grown at continuous high night temperatures is decreased due to decreased UFGT activities.

キーワード： アントシアニン, 酵素活性, 温度, PAL, UFGT

緒 言

ブドウ果実における着色, すなわちアントシアニン蓄積は, 外観上の果実品質を決定する重要な要因であり, 市場価値の尺度となる。また, 近年の健康志向の高まりから, アントシアニンの抗酸化性による動脈硬化防止作用など機能性も注目されており, 果皮のアントシアニン含量はブドウ果実の商品価値の中で重要な因子となりつつある。

ブドウ果実の着色は気温や光条件の影響を受けやすく, 特に高温条件下では赤熟れ果と呼ばれる着色不良果実が生じることが知られている(苦名ら, 1979)。着色不良は市場での商品価値を著しく下げするため, 西南暖地や施設下での栽培において深刻な問題であるが, 効果的な防止対策は確立していないのが現状である。

アントシアニンを始めとするポリフェノールは, アン

トシアニン生合成経路においてフェニルアラニンからフェニルアラニンアンモニリアーゼ (PAL), カルコンシンターゼ (CHS), カルコンイソメラーゼ (CHI), フラバノン 3-ヒドロキシラーゼ (F3H), ジヒドロフラボノール 4-リダクターゼ (DFR), ロイコアントシアニンジジオキシゲナーゼ (LDOX), UDP グルコースフラボノイド 3-O-グルコシルトランスフェラーゼ (UFGT) などの働きによって生成される (Harbone, 1994)。これまでにブドウ果実における PAL 活性とアントシアニン生合成における温度との関係についていくつかの報告があり (片岡, 1986; Roubelakis-Kliwer, 1986), PAL は温度要因の影響を受け, 不適温度条件下でのアントシアニン生合成の制御に関与していることが示唆されている。一方, Boss ら (1996) はブドウ果実のアントシアニン生合成における鍵酵素はアントシアニン生合成の最終段階で働く酵素である UFGT であると報告している。従って, 不適な温度条件下で生育したブドウ果実では PAL だけでなく UFGT も何らかの影響を受けていると予想される。しかしながら, プ

2003年10月1日 受付, 2004年1月30日 受理。

*Corresponding author.

ドウ果実において UFGT 活性と温度要因との関係は明らかにされていない。また、アントシアニン生合成経路ではアントシアニンだけでなくフラボノールやプロアントシアニンなどの中間代謝産物も生成されるため、これらの物質の生合成もアントシアニンの生合成と何らかの関係を持っていることが予想されるが、これまでブドウ果実において環境条件がアントシアニンの生合成経路中の物質生成に与える影響を報告した例はほとんど見られない。

アントシアニン生合成に対する温度の影響については、1) 昼間の高温で抑制される、2) 夜間の高温で抑制される、3) 昼夜の温度差が必要であることが明らかにされている (Kliewer, 1970; Kobayashi ら, 1967; Saure, 1990; 苦名ら, 1979)。特に気温の日較差が大きい地域はブドウの産地として成立しているところが多く、栽培地の重要な環境要因であると思われる。気温の日較差が大きく、夜温が低い条件で着色が優れる原因として、夜間の同化産物の消費抑制 (Westwood, 1978) が考えられているが、アントシアニン生合成経路自体に対する影響についての報告は少ない。

そこで本研究では、‘巨峰’の枝変わり品種であり優れた着色を示す‘黒王’果実を異なる温度条件で生育させ、果皮中のフラボノイド含量、関連酵素である PAL および UFGT 活性を調査し、温度条件、特に夜間温度がブドウ果実のアントシアニン生合成に及ぼす影響を明らかにすることを試みた。

材料および方法

実験は 2000 年および 2001 年に行ない、それぞれブドウ‘黒王’の 3 年生および 4 年生鉢植個体を供試した。

実験 1

2000 年に、ベレーゾン前まで茨城県農業総合センター園芸研究所内で慣行の露地栽培を行ない、ベレーゾン直前からグロースキャビネット内で生育させた。温度条件は昼 25°C 夜 25°C の恒温区と昼 25°C 夜 15°C の変温区とした。なお、かん水は 2 日に一度の割合で十分な量を与えた。果粒をベレーゾン以降 10 日おきに採取した後、色彩色差計 (ミノルタ, CR-300) を用いて果皮色を測定した。果粒は液体窒素で凍結し、分析開始まで -80°C で凍結保存した。

実験 2

2001 年に、ベレーゾン前まで筑波大学農林技術センターの実験圃場で慣行の露地栽培を行ない、ベレーゾン直前から実験 1 と同様に管理した。温度条件は昼 30°C 夜 30°C の恒温区と昼 30°C 夜 15°C の変温区とした。果粒をベレーゾン以降 15 日おきに採取し、実験 1 と同様に果皮色を測定した後凍結保存した。

アントシアニン・フェノール物質含量の測定

Lister ら (1994) の方法を一部改変して分析した。果皮 1 g を液体窒素中で破碎し、100% メタノール 30 ml を加え、4°C で 24 時間抽出した。得られた粗抽出液を 40°C で

乾固させ、1 ml のメタノールに溶解させた。得られた抽出液を遠心分離し (10,000 × g, 5 分間)、残渣を除去した後、0.45 μm Millipore Filter でろ過し、フォトダイオードアレイ高速液体クロマトグラフ (HPLC: 日本分光, MD-910) を用いて各成分の分離を行なった。HPLC の条件はカラム: Crestpak C18S, カラム温度: 40°C, 流量: 1.0 ml/min, 検出波長: アントシアニンは 525 nm, フラボノールは 350 nm, プロアントシアニンは 280 nm, 試料注入量: 10 μl とした。移動相溶媒は (A) 10% 酢酸, (B) アセトニトリルを用い、以下のようなプログラムでグラジエントをかけ溶出させた。すなわち、B 液の割合を 30 分間で 0% から 20% まで直線的に増加させ、30 分以降は A 液: B 液 = 80:20 の一定の割合で 10 分間溶出させた。終了後 30 分間 A 液を流し、HPLC を安定させてから次のサンプルを注入した。測定は 3 回繰り返した。クロマトグラムのピークの同定は、アントシアニンについては標品および文献 (Hebrero ら, 1989; Shiraishi ら, 1986) の保持時間と吸収スペクトルの比較によって行なった。フラボノール、プロアントシアニンについては、フォトダイオードアレイ検出器を用いたスペクトル測定を同時に行ない、ピークの同定および定量を行なった。具体的には、350 nm 付近に最大吸収波長をもつピークをフラボノールとして、280 nm 付近に最大吸収波長をもつピークをプロアントシアニンとして推定した。定量方法は、アントシアニンは 525 nm の波長で検出されたすべてのピークを malvidin-3-glucoside 当量で算出した。フラボノールは 350 nm の波長で検出されたピークの中からアントシアニンのピークを除き、それらのピーク総面積の相対値を算出した。同様に、プロアントシアニンは 280 nm の波長で検出された全てのピークからアントシアニン、フラボノールのピークを除きピーク総面積から相対値を算出した。

酵素の抽出

Ozeki ら (1987) の方法を一部改変して行なった。5 g の果皮を液体窒素中で破碎し、1.4 mM メルカプトエタノール、2 g ポリビニルポリピロリドン (PVPP) を含む 100 mM リン酸緩衝液 (pH 8.0) 15 ml 中で抽出した。得られた粗抽出液は Dowex 1 × 4 (HCl 型, 抽出緩衝液で平衡化) を加え色素を除去した後、硫酸沈殿で濃縮し、沈殿を抽出液に溶かし酵素液を得た。全ての抽出作業は 4°C 下で行なった。タンパク質の定量は BSA を標準物質として Bradford (1976) の方法で行なった。

PAL 活性の測定

Ozeki ら (1987) の方法を一部改変して測定した。すなわち、40 mM フェニルアラニン 0.5 ml と 100 mM リン酸緩衝液 (pH 8.0) 0.5 ml を加えた反応液中に酵素液を 0.5 ml 加え、40°C で 1 時間反応させた。得られた上清の 280 nm の波長における吸光度を測定し、酵素液中のタンパク質当たりの t-桂皮酸生成量を PAL 活性とした。測定は 3 回繰り返した。

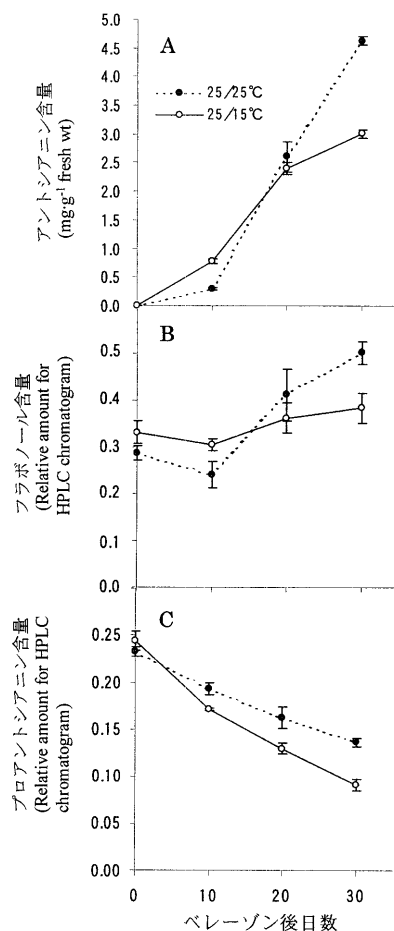
UFGT 活性の測定

Lister ら (1996) の方法を一部改変して行なった. 100 mM リン酸緩衝液 (pH 8.0) 100 μ l に, 2 mg/ml クェルセチン 15 μ l, 15 mg/ml UDP-グルコース 10 μ l および酵素液 100 μ l を加え, 30°C で 30 分間反応させた後, 20% トリクロロ酢酸を含むメタノール 75 μ l を加えて反応を停止させた. 得られた上清を 0.45 μ m Millipore Filter でろ過後, HPLC でクェルセチン-3-グルコシドを測定し, 酵素液タンパク質当たりのクェルセチン-3-グルコシド生成量を UFGT 活性とした. 測定は 3 回繰り返した.

第1表 異なる温度条件下で生育したブドウ‘黒王’果実のベレーゾン 30 日後における着色程度

実験年	生育温度(昼/夜)	色相角度	L値
2000	25/25°C	-63.25 $\pm$ 1.46	26.44 $\pm$ 0.33
	25/15°C	-50.45 $\pm$ 1.64	26.58 $\pm$ 0.57
2001	30/30°C	-51.49 $\pm$ 3.19	30.94 $\pm$ 1.10
	30/15°C	-63.23 $\pm$ 7.77	30.24 $\pm$ 0.93

平均値 $\pm$ 標準誤差(n=10)



第1図 異なる温度条件 (25/25°C および 25/15°C) 下で生育したブドウ‘黒王’の果皮中アントシアニン含量 (A), フラボノール含量 (B), プロアントシアニン含量 (C) の経時的変化 (2000年) 図中の縦線は標準誤差 (n=3) を示す

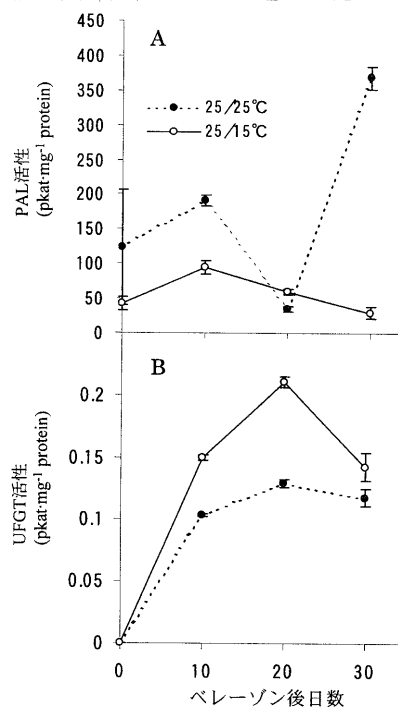
結 果

実験 1

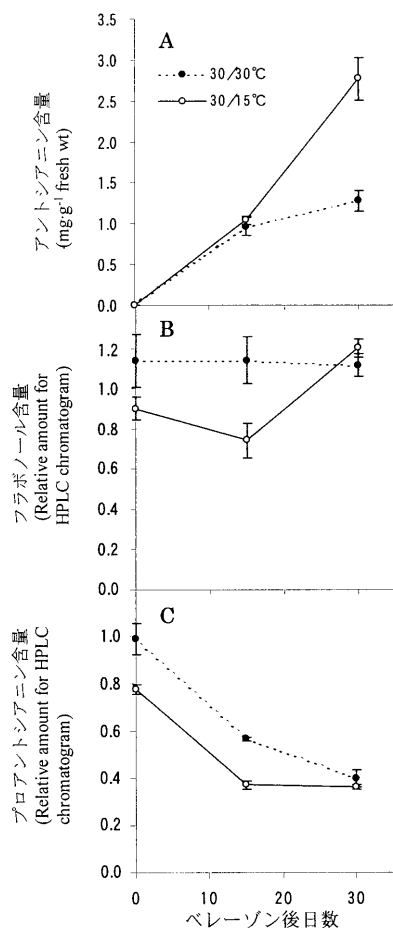
‘黒王’果実の着色程度は温度条件の違いによって異なった (第1表). 通常, 黒色系ブドウ果実では, 着色が進むと色相角度の値は小さくなり, L値も減少する. 2000年の昼温 25°C 条件では, L値に変温, 恒温による違いは認められなかったが, 色相角度は変温区の果実と比べ恒温区の果実で値が小さく, 着色が優れていた. アントシアニン含量は, ベレーゾン直後では変温区の果実でやや高かったが, ベレーゾン 30 日後には恒温区の果実で高かった (第1図 A). 同様に, フラボノール含量についても, ベレーゾン直後は変温区の果実で高かったが, その後成熟が進むにつれて恒温区の果実で高いレベルで推移した (第1図 B). プロアントシアニン含量は漸減傾向にあり, 温度との関係からみるとフラボノール含量と同様の傾向であった (第1図 C). 関連酵素活性については, 昼温 25°C 条件の場合, PAL活性は変温区の果実と比べ恒温区の果実で高く推移し, 特にベレーゾン 30 日目において著しく高かった (第2図 A). UFGT活性は変温区の果実で特にベレーゾン 20 日目において高かったが, 恒温区の果実においても成熟後半には変温区とほぼ同じレベルであった (第2図 B).

実験 2

2001年の昼温 30°C 条件では, 恒温区の果実と比べ, 変温区の果実で色相角度の値が小さく着色が優れていた (第1表). L値は変温, 恒温による違いは認められなかった



第2図 異なる温度条件 (25/25°C および 25/15°C) 下で生育したブドウ‘黒王’の果皮中 PAL 活性 (A), および UFGT 活性 (B) の経時的変化 (2000年) 図中の縦線は標準誤差 (n=3) を示す

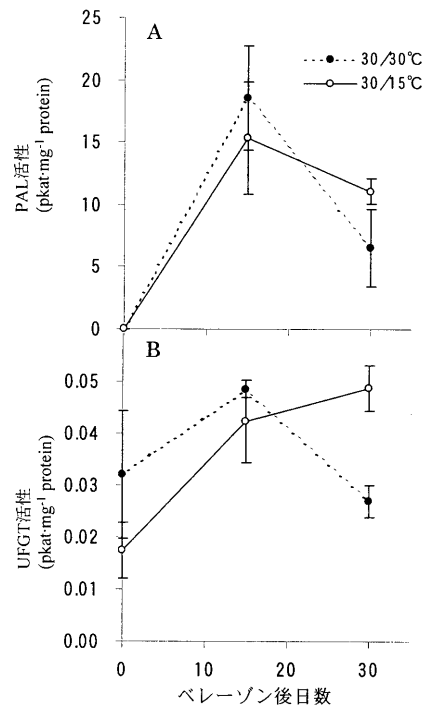


第3図 異なる温度条件(30/30°Cおよび30/15°C)下で生育したブドウ「黒王」の果皮中アントシアニン含量(A), フラボノール含量(B), プロアントシアニン含量(C)の経時的変化(2001年) 図中の縦線は標準誤差(n=3)を示す

が, 実験1の昼温25°C条件と比べ昼温30°C条件の果実が高かった。昼温30°C条件では, 変温区の果実に比べ, 恒温区の果実でアントシアニン含量が低かった(第3図A)。フラボノール含量はベレーゾン後恒温区の果実が高かったが, ベレーゾン30日後では恒温区と変温区の間で差は認められなかった。(第3図B)。プロアントシアニン含量については恒温区の果実で高いレベルで推移したものの, フラボノール含量の推移と同様にベレーゾン30日後では恒温区と変温区の間で差は認められなかった(第3図C)。昼温30°C条件では, PAL活性は夜間温度の違いによる差は認められなかったが, UFGT活性は変温区の果実でベレーゾン30日後において高かった(第4図A, B)。

考 察

ブドウ果実の着色は夜間の低温で促進される(Kobayashiら, 1967; 菅谷ら, 1979)ことが報告されているが, 本研究では成熟期間中の夜間温度が「黒王」果実の着色に及ぼす影響について異なる昼間の温度条件下において検討した。2000年の実験では昼温をブドウ果実の着色に適するとされる25°Cに設定した。この場合, 変温条件より



第4図 異なる温度条件(30/30°Cおよび30/15°C)下で生育したブドウ「黒王」の果皮中PAL活性(A), およびUFGT活性(B)の経時的変化(2001年) 図中の縦線は標準誤差(n=3)を示す

も恒温条件で果実の着色が優れ, アントシアニン含量も高かった。従って, 着色に適した温度条件下では, 夜間の低温は果実着色に対して必ずしも必要ではないことが示唆された。これに対し, 2001年の実験では昼温を着色に不適とされる30°C条件にしたところ, 前年度の25°C条件と比較して着色が劣り, アントシアニン含量も低かった。本研究において, 昼温の違いは実験年が異なることから単純に比較できないものの, 25°C条件と30°C条件との間で見られたアントシアニン含量の差異はブドウ果実の着色は昼間の高温条件で抑制されるという報告(Kliewer, 1970; Kobayashiら, 1967)と一致している。また, 昼温が高い条件であっても, 変温条件で成熟した果実の着色は恒温条件と比べ優れており, 夜間の低温によりアントシアニン蓄積が促進されたと考えられた。

ブドウ果実においてアントシアニン蓄積と温度との関係に関する報告はいくつかあるが, フラボノール, プロアントシアニン生成と温度との関係はほとんど検討されていない。通常の発育条件では, フラボノール蓄積は幼果期および成熟後期に多く, フラボノールシンターゼ(FLS)の関与が示されている(Downeyら, 2003)。プロアントシアニンも同様に幼果期における蓄積量は高いが, 成熟とともに減少する(De Freitas・Glories, 1999)。本実験の全ての温度処理区におけるフラボノール, プロアントシアニンの成熟に伴う消長は, これらの報告とほぼ同様で, ベレーゾン以降フラボノールは増加傾向にあり, プロアントシアニンは減少した。これらの物質生成の制

御については、まずベレーゾン以降の PAL 活性の上昇によりアントシアニン生合成が活性化されることに始まり、フラボノールは FLS 活性の上昇にともない増加する (Downey ら, 2003). プロアントシアニンについては、UFGT 活性が増加しアントシアニン生成に前駆体が利用されるため生成が抑制されること、もしくは自身の代謝による減少 (De Freitas・Glories, 1999) が関係していると考えられる。フラボノールおよびプロアントシアニンの蓄積量と温度との関係を見ると、着色が優れていた昼温 25°C 条件より昼温 30°C 条件の果実で著しく高く、夜温については変温区より恒温区の果実で高かった。これらの結果からフラボノール、プロアントシアニン蓄積と温度との関係はアントシアニン蓄積との関係と異なり、高温条件で蓄積が促進されると考えられた。

このように温度要因はアントシアニン生合成に影響するが、その生合成には PAL および UFGT 活性が関与している。着色に適する昼温では、恒温条件において PAL 活性が著しく高く、フラボノール、プロアントシアニンおよびアントシアニン蓄積の増加と一致した。一方、変温区では、恒温区と比べて PAL 活性が低かったものの UFGT 活性が高く、中間代謝産物よりもアントシアニンの生合成が優先的に行なわれたと考えられた。また、着色に不適とされる昼温 30°C 条件では、恒温区に対して変温区ではベレーゾン 30 日目における UFGT 活性が 2 倍程高く増加したことにより、アントシアニン蓄積が促進されたと考えられた。フラボノール、プロアントシアニン蓄積の温度に対する反応はアントシアニンと相反する傾向にあった。これは UFGT 活性の低下によりアントシアニンの前駆体が中間代謝産物生成に利用されたと推察される。しかし、変温区と比較した恒温区におけるフラボノール蓄積の増加は、UFGT 活性の低下によるアントシアニン生成の抑制が関与していると考えられるが、昼温 25°C 条件との比較における昼温 30°C 条件では UFGT に加え PAL 活性も著しく低下しており、これらの酵素活性の変化のみでは説明できなかった。これについては、PAL および UFGT 以外の酵素、特にフラボノール合成の分岐点にあたる DFR や FLS の関与が考えられる。また、フラボノールは高温で日照時間の長い地方のワインに多い傾向がある (Goldberg ら, 1998) ので、実験年の違いによる光条件の差異も関与しているかもしれない。

温度がブドウ果実の着色を制御する機構に関して、‘巨峰’果実では、昼間の温度が着色に不利な条件であっても、夜間温度が低温であれば、果粒へ優先的に光合成産物が分配され、フェニルアラニン蓄積が高まることが示されている (Mori ら, 2004)。このような樹体へ作用したアントシアニン生合成の基質供給の不足が、高夜温による着色不良の原因の一つとして挙げられる。それに加え、本実験の結果では、特に変温条件下の果実において果皮中の UFGT 活性が高くなったことから、夜温の低下は果

粒への光合成産物の転流・分配に影響を与えるだけでなく、アントシアニン生合成経路自体に直接的に作用しているものと考えられた。これまでにブドウ果実においてアントシアニン生合成に対する温度の影響は PAL 活性の制御によることが示されている。UFGT と温度との関係を調査した報告は見られないが、ブドウのアントシアニン生合成の鍵酵素とされている UFGT も PAL と同様に温度要因の影響を受け、アントシアニン生合成の制御に関与していることが明らかとなった。

以上のことから、ブドウ果実の着色には、昼温が 25°C 程度の冷涼な条件であれば夜間の気温低下は必要でないが、わが国の西南暖地のように成熟期が 30°C を超える条件では、PAL および UFGT 活性の低下によりアントシアニン生合成が抑制されるため、果実の着色促進には夜間の低温が必要であると考えられる。本研究の結果を考慮すると、実際の栽培においても夜間温度を下げることによって、UFGT 活性を高め、アントシアニン生合成を促進させる可能性がある。しかしながら、圃場で夜間温度を下げることは困難で、不適な温度環境で抑制された UFGT の働きを他の要因で補うことも重要である。ABA はブドウ果実において成熟に関与する重要な植物ホルモンであり (塩崎, 1996)、アントシアニン生合成酵素遺伝子の発現を誘導し、アントシアニン蓄積を高めることが報告されている (Ban ら, 2003)。また、乾燥ストレスはブドウ果実の着色を促進し (Ojeda ら, 2002)、他の植物では糖転移酵素の発現を誘導するとの報告 (Gopalakrishna ら, 2001) があり、ブドウ果実においても UFGT に何らかの影響を与える可能性が考えられる。今後、これらのような温度制御以外の手法を用いることにより、UFGT などのアントシアニン生合成酵素の活性を高め、不適温度条件下における着色不良を回避することが期待される。

摘 要

温度要因、特に夜間の高温がブドウ果実のアントシアニン生合成に及ぼす影響を明らかにするため、異なる温度条件で生育したブドウ‘黒王’果実を用い、フラボノイド含量、関連酵素活性を調査した。実験は 2 年間にわたって行ない、温度条件は昼夜 25°C 恒温区と昼 25°C / 夜 15°C の変温区 (2000 年)、昼夜 30°C 恒温区と昼 30°C / 夜 15°C の変温区 (2001 年) とした。果皮のアントシアニン含量は、昼温 25°C 条件の場合では恒温区で高かったが、昼温 30°C 条件の場合では恒温区すなわち夜間高温条件で著しく低かった。中間代謝産物であるフラボノール、プロアントシアニンは両年とも恒温区で高く推移した。PAL 活性は夜間温度の影響はほとんど受けなかったが、UFGT 活性は夜間温度が低い変温区の果実で恒温区より高く、変温区の果実では中間代謝産物よりもアントシアニン蓄積が促進された。

謝 辞 本研究を行なうにあたり、実験樹をはじめ便宜

供与していただいた茨城県農業総合センター園芸研究所、寺門 巖氏に深く感謝します。

引用文献

- Ban, T., M. Ishimaru, S. Kobayashi, S. Shiozaki, N. Goto-Yamamoto and S. Horiuchi. 2003. Absciscic acid and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid affect the expression of anthocyanin biosynthetic pathway genes in 'Kyoho' grape berries. *J. Hort. Sci. Biotech.* 78: 586-589.
- Boss, P. K., C. Davies and S. P. Robinson. 1996. Analysis of the expression of anthocyanin pathway genes in developing *Vitis vinifera* L. cv Shiraz grape berries and the implications for pathway regulation. *Plant Physiol.* 111: 1059-1066.
- Bradford, M. H. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- De Freitas, V. A. P. and Y. Glories. 1999. Concentration and compositional changes of procyanidins in grape seeds and skin of white *Vitis vinifera* varieties. *J. Sci. Food Agric.* 79: 1601-1606.
- Downey, M.O., J. S. Harvey and S. P. Robinson. 2003. Synthesis of flavonols and expression of flavonol synthase genes in the developing grape berries of Shiraz and Chardonnay (*Vitis vinifera* L.). *Aust. J. Grape. Wine Res.* 9: 110-121.
- Goldberg, D. M., E. Tsang, A. Karumanchiri and G. J. Soleas. 1998. Quercetin and p-coumaric acid concentrations in commercial wines. *Amer. J. Enol. Vitic.* 49: 142-151.
- Gopalakrishna, R., G. Kumar, B. T. KrishnaPrasad, M. K. Mathew and M. U. Kumar. 2001. A stress-responsive gene from groundnut, Gdi-15, is homologous to flavonol 3-O-glucosyltransferase involved in anthocyanin biosynthesis. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 284: 574-579.
- Harbone, J. B. 1994. The Flavonoids: Advances in Research Since 1986. p. 499-535. CRC Press, Boca Raton, Fla.
- Hebrero, E., C. Garcia-Rodriguez, C. Santos-Buelga and J. C. Rivas-Gonzalo. 1989. Analysis of anthocyanins by high performance liquid chromatography-diode array spectroscopy in a hybrid grape variety (*Vitis vinifera* × *Vitis berlandieri* 41B). *Amer. J. Enol. Vitic.* 40: 283-291.
- 片岡郁雄. 1986. ブドウ果実の着色に関する研究-とくにアブシジン酸による着色の制御について-. 香川大学農学部紀要. 45: 1-48.
- Kliwer, W.M. 1970. Effect of day temperature and light intensity on coloration of *Vitis vinifera* L. grapes. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 95: 693-697.
- Kobayashi, A., T. Fukushima, N. Nii and K. Harada. 1967. Studies on the thermal conditions of grapes. VI. Effects of day and night temperatures on yield and quality of Delaware grapes. *Jour. Jap. Soc. Hort. Sci.* 36: 373-379.
- Lister, C. E., J. E. Lancaster and K. H. Sutton. 1994. Developmental changes in the concentration and composition of flavonoids in skin of a red and a green apple cultivar. *J. Sci. Food Agric.* 64: 155-161.
- Lister, C. E. and J. E. Lancaster. 1996. Developmental changes in enzymes of flavonoid biosynthesis in the skins of red and green apple cultivars. *J. Sci. Food Agric.* 71: 313-320.
- Mori, K., S. Sugaya and H. Gemma. 2004. Regulatory mechanism of anthocyanin biosynthesis in 'Kyoho' grape berries grown under different temperature conditions. *Environ. Control in Biol.* 42: 21-30.
- Ojeda, H., C. Andary, E. Kraeva, A. Carbonneau and A. Deloire. 2002. Influence of pre- and postveraison water deficit on synthesis and concentration of skin phenolic compounds during berry growth of *Vitis vinifera* cv. Shiraz. *Amer. J. Enol. Vitic.* 53: 261-267.
- Ozeki, Y., A. Komamine, H. Nogushi and U. Sankawa. 1987. Changes in activities of enzymes involved in flavonoid metabolism during the initiation and suppression of anthocyanin synthesis in carrot suspension cultures regulated by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Physiol. Plant.* 69: 123-128.
- Roubelakis-Angelakis, A. K. and W. M. Kliwer. 1986. Effect of exogenous factors on phenylalanine ammonia-lyase activity and accumulation of anthocyanins and total phenolics in grape berries. *Amer. J. Enol. Vitic.* 37: 275-280.
- Saure, M. C. 1990. External control of anthocyanin formation in Apple. *Scientia Hort.* 42: 181-218.
- 塩崎修志. 1996. 果粒の成熟と植物ホルモン. p. 227-233. 堀内昭作編著. 日本ブドウ学. 養賢堂. 東京.
- Shiraishi, S., Y. Watanabe, H. Okubo and S. Uemoto. 1986. Anthocyanin pigments of black-purple grapes related to variety 'Kyoho' (*Vitis vinifera* L. × *V. labrusca* L.). *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 55: 123-129.
- 苫名 孝・宇都宮直樹・片岡郁雄. 1979. 樹上果実の成熟に及ぼす温度環境の影響(第2報)ブドウ'巨峰'果実の着色に及ぼす樹体および果実の環境温度の影響. 園学雑. 48: 261-266.
- Westwood, M. N. 1978. 11. Crop Maturity Fruit Color p. 237-243. Temperate-zone Pomology. W. H. Freeman and Company. USA.