

Il colore dei fiori: fattori che lo determinano e tecniche per modificarlo

Gianluca Burchi*, Alessandro Ballarin e Debora Trinchello

CRA - Istituto Sperimentale per la Floricoltura, Via dei Fiori 8, 51012 Pescia (PT)

Ricevuto: 16 novembre 2005; accettato: 16 gennaio 2006

Flower colour: factors that control its expression and techniques that can modify it

Abstract. Flower colour is an important feature for the aesthetic appeal of any ornamental crop. Information about the pigments present in a particular plant is necessary for the development of new colour varieties, even if different factors can influence the colour expression of the same pigments. Flower color is primarily due to four types of natural pigments: flavonoids, carotenoids, betalains and chlorophylls. Among these classes, flavonoids are the most common and responsible for an enormous range of flower colors including strong yellow, creamy yellow, ivory, pink, scarlet, blue and violet. The carotenoids produce the yellow, orange and red colours, the betalains produce the yellow, orange, purple and red colours only in the floral tissues of a few species (*Caryophyllales*) and the chlorophylls are responsible for a very few cases of green flowers. Anthocyanins are the most prevalent type of flavonoids and are generally considered responsible for most pink through blue flower colours. As anthocyanins alone are virtually colorless within the pH range of 4 to 6, other flavonoids and related compounds (but also metals such as iron and aluminum) can associate with anthocyanins and form colored anthocyanin-copigment complexes that are stable at pH values where anthocyanins alone are virtually colorless. The colors and color enhancement caused by the formation of anthocyanin-copigment complexes are greatly influenced by pH, concentration of anthocyanins and molar ratio of copigment to anthocyanin. External factors that can influence flower color, reviewed in this paper, are temperature, light, fertilization, addition of sugar or metals in the conservation water. Even if a significant amount of information is available on the genetics of flower colour, the new colour combinations that can be obtained by classical breeding are limited, the cross and selection programs are often too long and, moreover, some colours are absent in the genome of many important flowers (for example, the blue colour in rose, carnation, lily, gerbera). The transgene technology can be, and has been, extensively used to create new flower colours in many ornamental species. In this review, the factors that determine flower colour, the techniques that can be applied for modification, improvement or conservation of colour quality, the genetic control of the character, the biosynthetic pathway of

the main pigments and the results obtained through the transgene technology to modify flower colour are reported.

Key words: ornamentals, quality, postharvest, pigments, anthocyanins.

Introduzione

Il colore dei fiori rappresenta un aspetto qualitativo fondamentale per gli operatori ed un elemento di valutazione di primaria importanza per il consumatore al momento dell'acquisto: risulta quindi fondamentale comprendere quali siano i fattori che determinano la sua espressione per individuare le tecniche impiegabili per migliorarla o, perlomeno, per conservarne la qualità il più a lungo possibile.

Il colore dei fiori è determinato fondamentalmente dal tipo, dalla quantità e dalla stabilità dei pigmenti presenti nei tessuti, dal pH delle cellule vacuolari e dalla traslocazione dei pigmenti stessi dal sito di produzione. I pigmenti maggiormente responsabili per il colore dei fiori sono i flavonoidi, i carotenoidi, le betalanine e, in una certa misura, anche la clorofilla. Diversi fattori esterni poi possono influenzare l'espressione del colore, come la luce, la temperatura, gli zuccheri, i metalli, ecc. (Davies e Schwinn, 1997; Griesbach, 2005).

Il valore commerciale delle ornamentali tuttavia non è determinato solo dalla qualità ma anche dalla varietà dei colori dei fiori disponibili, con una continua ricerca di novità che costituisce la base del successo di ogni nuova cultivar (fig. 1). Per alcune specie di fiori solo un ristretto spettro di colori è disponibile, mentre in altre specie alcuni colori sono assenti, come ad esempio il blu in specie importanti come la rosa, il garofano, il lillium, la gerbera. Il miglioramento genetico tradizionale viene da lungo tempo utilizzato dagli ibridatori per creare nuovi colori dei fiori, fin dai tempi in cui la genetica mendeliana non era ancora conosciuta. L'introduzione di nuovi colori attraverso le moderne tecniche di ingegneria genetica potrebbe avere una larga influenza nel mondo della floricoltura, ed infatti questo settore di ricerca ha subito attratto

*gianluca.burchi@entecra.it



Fig. 1 - La varietà di colori dei fiori costituisce la base del successo commerciale di ogni specie ornamentale. Nella foto, il campo catalogo di ibridi di *Lilium* asiatico presso l'Istituto Sperimentale per la Floricoltura di Pescia (foto B. Nesi).

Fig. 1 - The variety of colour combinations is the base for the commercial success of any ornamental species. In the picture, the catalogue field of asiatic lilies at the Experimental Institute for Floriculture (photo B. Nesi).

l'attenzione sia degli istituti di ricerca pubblici, sia di molte compagnie biotecnologiche private.

In questa *review* saranno pertanto esposte le attuali conoscenze sui fenomeni chimici e biochimici che sono alla base del colore dei fiori, sulle tecniche adottabili e per migliorarne e conservarne la qualità, sulla genetica della biosintesi dei pigmenti e sulle possibilità di modificarne l'espressione.

I pigmenti

Dei quattro tipi di pigmenti citati in precedenza, i flavonoidi e le betalanine si trovano all'interno dei vacuoli cellulari, non sono chimicamente correlati e sono mutualmente esclusivi, non essendo mai stati trovati insieme. La clorofilla e i carotenoidi sono invece chimicamente correlati e localizzati all'interno dei plastidi che si trovano nel citoplasma delle cellule (Griesbach, 2005). Sebbene la clorofilla possa influenzare il colore dei fiori e, in diversi casi, anche determinarne il colore verde (ad esempio nell'*Helleborus*), tuttavia la sua importanza, relativamente a questa problematica, è molto limitata (Davies e Schwinn, 1997), per cui non verrà trattata in questa *review*.

I flavonoidi generalmente interessano le colorazioni dei fiori rosa, rosso, arancio, scarlatto, porpora, blu, blu scuro e, in qualche caso, anche giallo. Inoltre essi danno intensità alla maggior parte dei colori bianco o crema (tab. 1) (Davies e Schwinn, 1997).

I carotenoidi, da soli, determinano le colorazioni gialle, arancio e rosse. In molte importanti specie ornamentali, i carotenoidi contribuiscono ad ampliare la gamma di colori dei flavonoidi producendo, in combinazione con questi, i colori giallo, arancio, scarlatto e marrone scuro (Davies e Schwinn, 1997): per esempio, il colore rosso della *Sophronitis* e della *Phalaenopsis* è il risultato del mescolamento tra carotenoidi color arancio e flavonoidi color magenta (tab. 1) (Griesbach, 2005).

Tab. 1 - Basi chimiche del colore dei fiori nelle angiosperme (da "I composti fenolici di interesse biologico, http://members.xoom.virgilio.it/alberto_chim/Fenoli.pdf)
Tab. 1 - Chemical bases of flower colour in the Angiospermae.

COLORE	PIGMENTO RESPONSABILE
Bianco, avorio, crema	Flavoni e/o flavonoli
Giallo	Carotenoidi Flavonoidi gialli Calconi e auronj
Arancione	Carotenoidi Pelargonidina ed auronj
Scarlatto	Pelargonidina Cianidina e carotenoidi
Marrone	Cianidina su fondo di carotenoidi
Magenta	Cianidina
Rosa	Peonidina
Malva, violetto	Delfinidina
Blu	Cianidina e copigmenti Delfinidina e copigmenti
Porpora intenso	Delfinidina ad elevate concentrazioni
Verde	Clorofille

Le betalanine determinano i colori giallo, arancio, rosso e porpora nei tessuti fiorali solo di poche specie di piante, essendo limitate ad alcune famiglie appartenenti principalmente dell'ordine delle *Caryophyllales* (Davies e Schwinn, 1997).

Ogni tipo di pigmento è il risultato di una differente sequenza di reazioni biochimiche e la produzione di ciascun pigmento è indipendente dagli altri pigmenti. Nella maggior parte dei casi, un difetto nel pathway biosintetico dei flavonoidi non ha effetti su quello dei carotenoidi e della clorofilla: questo può essere chiaramente visto nei mutanti verdi di *Sarracenia L.* in cui i flavonoidi rossi, che sono normalmente presenti nelle foglie e nei fiori, sono assenti, mentre la clorofilla e i carotenoidi sono normalmente presenti per cui le foglie sono verdi e i fiori gialli (Griesbach, 2005).

Per quanto riguarda i fiori bianchi, si ritiene generalmente che siano privi almeno di una parte di questi pigmenti, ma la loro assenza nei petali potrebbe essere dovuta a fattori diversi come il malfunzionamento dei geni coinvolti nella trascrizione del colore, la loro mancata espressione e/o un errore nel meccanismo di traslocazione (Zaiton *et al.*, 2003).

Flavonoidi

I flavonoidi sono dei composti fenil-propanoidi generalmente solubili in acqua e conservati nel vacuolo. Tutti i flavonoidi, generalmente, posseggono uno scheletro base C₆-C₃-C₆, composto da un'unità C₆ (anello A) e da un'unità C₆-C₃ (anello B ed atomi di carbonio 2,3 e 4). Gli atomi di carbonio all'interno dello scheletro vengono originati da due distinti *pathways*. L'anello B, con gli atomi di carbonio 2,3 e 4, viene fornito da un derivato dell'acido cinnamico, mentre l'anello A è il risultato della condensazione testa-coda di 3 unità di acetato (fig. 2) (Salisbury e Ross, 1992).

L'enzima chiave nella biosintesi dei flavonoidi, la calcone sintasi (CHS), catalizza la condensazione in più stadi di tre unità di acetato, derivanti da malonil-CoA, con un opportuno derivato dell'acido cinnami-

co, normalmente il p-cumaril-CoA, con conseguente formazione di un calcone (4,2', 4', 6'-tetraidrossicalcone) dal quale si originano tutte le strutture dei flavonoidi. I precursori dei flavonoidi, quindi, derivano entrambi da carboidrati: il malonil-CoA, che si forma a partire da acetil-CoA e CO₂ con una reazione catalizzata da acetil-CoA carbossilasi, e il p-cumaril-CoA, che viene fornito dal metabolismo del fenilpropanoide (Salisbury e Ross, 1992).

La biosintesi dei flavonoidi, come parte del più vasto processo biosintetico dei fenil-propanoidi, è uno degli aspetti del metabolismo secondario delle piante maggiormente studiato e caratterizzato. Anni di ricerche di genetica e di biochimica sui passaggi enzimatici di questo processo sono stati recentemente integrati dalle ricerche dei biologi molecolari (Davies e Schwinn, 1997). I geni che codificano la maggior parte degli enzimi coinvolti nella biosintesi delle antocianine sono stati individuati e clonati, ed anche la conoscenza dei fattori che regolano questo processo è molto avanzata, per cui si rimanda alle esaurienti *review* pubblicate sull'argomento (van Tunen e Mol, 1991; Heller e Forkmann, 1993).

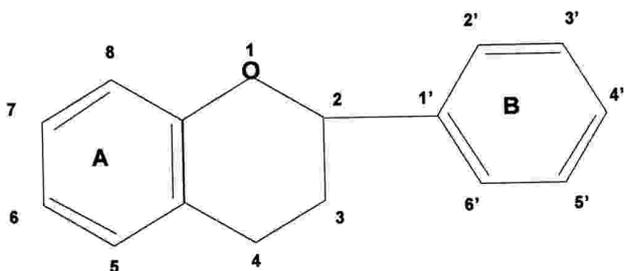
Tra i flavonoidi più comuni, solo i calconi e le antocianine hanno colori significativi, e queste ultime sono di gran lunga i pigmenti più diffusi ed importanti (Davies e Schwinn, 1997). Nei tessuti dei petali le antocianine sono situate specificatamente nei vacuoli delle cellule epidermiche, mentre nelle brattee, come in *Poinsettia* ed in *Hydrangea*, queste sono localizzate nei vacuoli delle cellule interne (Asen, 1976). La struttura chimica delle antocianine consiste nel tipico scheletro C₁₅ dei flavonoidi (fig. 2) in cui i tre anelli (uno cromonico, uno aromatico ed uno eterociclo) sono glicosilati con uno o più zuccheri (glucosio, galattosio o ramnosio) ed acilati con uno o più acidi cinnamici (acido cumarico, ferrulico, malonico o caffeico) attaccati in posizioni specifiche (Salisbury e Ross, 1992).

Le antocianine private dello zucchero e dei radicali acilici sono chiamate antocianidine (Griesbach, 2005). Le principali antocianidine sono sei, tre delle quali sono comunemente rintracciabili: la pelargonidina, che produce i colori arancio, rosa o rosso; la cianidina, che produce i colori rosso o malva; la delphinidina, che produce i colori porpora, blu o blu scuro (Davies e Schwinn, 1997). Le altre antocianidine (peonidina, petunidina e malvidina) sono invece riscontrabili solo su alcune piante (tab. 1) (Griesbach, 2005).

Quando sono poste *in vitro*, in condizioni simili a quelle comunemente riscontrate nei vacuoli delle cellule fiorali, le antocianine da sole non esistono in una

Fig. 2 - Struttura base dei flavonoidi (da Salisbury e Ross, 1992).

Fig. 2 - Base structure of the flavonoids.



forma colorata stabile (Asen, 1976). Un sufficiente livello di stabilità viene raggiunto attraverso la copigmentazione, cioè la formazione di complessi molecolari con sostanze denominate copigmenti (Brouillard e Dangles, 1993).

I copigmenti ricadono tipicamente in una delle seguenti due classi: i flavonoli (i principali dei quali sono il kempeferolo, la miricetina e la quercitina) ed i flavoni (apigenina, tricetina e luteolina) (Griesbach, 2005). Questi composti sono direttamente responsabili del colore dei fiori solo in pochissimi casi, mentre attraverso la copigmentazione, i flavoni e i flavonoli possono più facilmente esercitare la loro influenza sulla percezione del colore (Brouillard e Dangles, 1993).

Il colore dei petali dipende anche dalla quantità delle antocianine presenti: per esempio, in *Viola* ed in *Tulipa*, un livello molto elevato di antocianine produce un colore dei fiori molto vicino al nero (Davies e Schwinn, 1997).

Carotenoidi

I carotenoidi sono un gruppo ubiquitario di pigmenti delle piante che differiscono notevolmente dai flavonoidi nella struttura e nella compartimentazione. Sono pigmenti idrofobici, liposolubili, con una struttura basata normalmente su una catena a quaranta atomi di carbonio derivante dal generale processo biosintetico degli isoprenoidi. Se la loro maggior funzione è proteggere i tessuti fotosintetici dalla foto-ossidazione, tuttavia i carotenoidi possono anche determinare pigmentazioni colorate in organi come i frutti e i fiori (Davies e Schwinn, 1997). In questi ultimi, i carotenoidi sono sintetizzati e conservati nei cromoplasti, plastidi specializzati differenziatisi da cloroplasti o plastidi non fotosintetici.

Due comuni gruppi di carotenoidi associati al colore dei fiori sono i caroteni e i loro derivati ossigenati, le xantofille, associati rispettivamente ai colori arancione e giallo. Oltre seicento carotenoidi naturali sono stati isolati e identificati ed alcune specie ornamentali sono molto ricche di carotenoidi, sia in quantità che in diversità: per esempio, in narciso (*Narcissus spp.*) il livello di beta-carotene può raggiungere il 16,5% del peso secco nella corona fiorale, mentre in circa quaranta specie e varietà di *Rosa* gialla ben 75 differenti carotenoidi sono stati identificati (Davies e Schwinn, 1997).

Betalanine

Le betalanine sono pigmenti vacuolari azotati, contengono come cromoforo l'acido betalamico e producono i colori giallo, arancio, rosso e viola (Clement *et al.*, 1994).

Sebbene poche informazioni siano al momento disponibili sulla biosintesi delle betalanine, rispetto ai flavonoidi ed ai carotenoidi, e nonostante che il ruolo delle betalanine nella pigmentazione dei fiori sia limitato, tuttavia molte ricerche sono in corso in questo campo e molti progressi sono attesi nei prossimi anni. Infatti, lo studio del percorso biosintetico delle betalanine è un obiettivo attraente per i biotecnologi per diversi motivi: il processo produce colori attraenti, il numero di step enzimatici è basso ed il precursore necessario, la tirosina, è presente in tutte le piante (Davies e Schwinn, 1997). Per ulteriori informazioni su questi pigmenti si rimanda a precedenti *review* (Clement *et al.*, 1994; Strack e Wray, 1994).

pH

Molti fattori sono importanti nel determinare il colore finale nel tessuto e, tra questi, ricordiamo il livello di ossigenazione ed il pH del vacuolo.

Si assume generalmente che i fiori rossi contengano, tra le antocianidine, prevalentemente cianidina e che i fiori blu contengano delphinidina. Tuttavia ci sono molte eccezioni: ad esempio Griesbach riporta nella sua *review* (2005) che il colore rosso della *Petunia exserta* Stehman dipende dalla presenza della delphinidina mentre quello delle cultivar a fiori rossi di *Petunia x hybrida* Vilm. dalla cianidina, e come fiori che contengono cianidina possano essere sia rossi, come negli ibridi di *Rosa* L., sia blu, come in *Meconopsis grandis* Prain. Tutte le antocianidine poi, eccetto la pelargonidina, hanno la capacità di produrre fiori blu (Asen, 1976). Tutta questa variabilità nell'effetto cromatico delle antocianidine è dovuta al pH riscontrabile nel vacuolo, che esercita un notevole effetto sulla struttura secondaria delle antocianine e, pertanto, sul colore del fiore che ne risulta. Differenze nel pH del vacuolo possono pertanto determinare il fatto che fiori contenenti le stesse antocianine abbiano diversi colori (Stewart *et al.*, 1975; Yoshida, 1995). Un abbassamento del pH infatti causa uno spostamento verso la forma cationica rossa delle antocianine mentre un incremento del pH determina uno spostamento verso le forme blu chinonoidali (Brouillard e Dangles, 1993).

Il pH di estratti vacuolari dalle cellule dei petali è di solito leggermente acido, tuttavia un range di pH da 2,5 a 7,5 è stato riscontrato da Stewart *et al.* (1975) in una ricerca sui tessuti dei petali di 20 specie. Inoltre il pH può variare anche tra cultivar all'interno di una specie, e perfino in diversi stadi di sviluppo di un sin-

golo fiore: ad esempio, Asen *et al.* (1977) hanno trovato che il pH degli estratti della corolla di *Ipomea tricolor* cv Heavenly blue varia da 6,5 a 7,5 durante l'apertura del fiore, causando una variazione di colore dal rosso delle gemme al blu chiaro dei fiori aperti. Yoshida (1995) è riuscito a confermare e sviluppare queste osservazioni utilizzando un microelettrodo capace di misurare il pH di cellule di petali vive.

Il pH può influenzare notevolmente anche il colore di forme complesse stabili tra antocianidine dotate di un sistema orto-diidrossilico (cianidine, delphinidine e petunidine) con alcuni metalli (molibdeno, ferro, stagno, alluminio, titanio, cromo, uranio e piombo) (Griesbach, 2005).

Dal punto di vista pratico, il colore dei petali durante la senescenza, nel caso in cui questo sia dovuto prevalentemente alle antocianine, potrebbe essere modificato variando il pH dei vacuoli. Ad esempio, il trattamento di fiori recisi con zuccheri ritarda la proteolisi e, quindi, l'incremento del pH: come conseguenza, si può evitare la comparsa della colorazione blu nei petali durante la senescenza (Halevy e Mayak, 1979).

Temperatura

Come già detto, le antocianine sono i pigmenti che determinano prevalentemente i colori dal rosso al viola e al blu (van Tunen e Mol, 1991). La temperatura è uno dei principali fattori esterni che influenzano l'accumulo di antocianine nei tessuti delle piante: le basse temperature in genere aumentano la loro concentrazione mentre le elevate temperature la diminuiscono.

Diversi lavori hanno considerato gli effetti della temperatura sulla sintesi degli antociani e sullo sviluppo del colore nei frutti di mele durante le fasi di conservazione postraccolta. In alcuni sistemi di piante, le basse temperature hanno determinato un incremento del livello di trascrizione di geni i cui prodotti sono o enzimi chiave del percorso generale biosintetico dei fenil-propanoidi, come la fenilalanina ammonia liasi (PAL), o geni i cui prodotti catalizzano reazioni coinvolte nella biosintesi di flavonoidi ed antocianine, come la CHS, la calcone isomerasi (CHI) e la diidro flavonol riduttasi (DFR) (Shvartz *et al.*, 1997).

Certamente, uno dei fattori responsabili per la più bassa concentrazione delle antocianine nelle piante in presenza di temperature elevate è una ridotta biosintesi (Shvartz *et al.*, 1997). Tuttavia, le temperature possono influenzare non solo la sintesi, ma anche la stabi-

lità delle antocianine. Perciò, la diminuzione della concentrazione di tali pigmenti ad elevate temperature deve essere ricondotta sia ad un decremento nella sintesi, che ad un aumento nella degradazione (Shaked-Sachray *et al.*, 2002; Oren-Shamir *et al.*, 2003).

Dato che il successo economico delle ornamentali dipende in gran parte dalla qualità del colore e che, in genere, i colori sbiaditi diminuiscono il valore del prodotto, diverse ricerche sono state condotte per studiare il ruolo della temperatura sul colore dei fiori. A prescindere dalle ben note conoscenze sui danni diretti causati dalla conservazione a basse temperature su specie sensibili al freddo, in cui lo stress determina una negativa variazione del colore dal rosso al blu-porpora (come nelle brattee delle poinsettie conservate al di sotto dei 10°C), si riportano due interessanti lavori di Shaked-Sachray *et al.* (2002) e di Oren-Shamir *et al.* (2003) che hanno studiato l'effetto combinato di elevate temperature e dell'incremento di concentrazioni metalliche sull'accumulo delle antocianine nei fiori di *Aster* e *Anigozanthos*. In *Aster*, cv Sungal e Suntana, è stato osservato che un'elevata temperatura (29°C / 21°C giorno/notte) causava la decolorazione (dal porpora-blu scuro al porpora chiaro) di una varietà (Sungal) ma non influenzava la pigmentazione dell'altra (Suntana) rispetto ad un regime termico di 17°C / 9°C. Nella prima cultivar, la concentrazione antocianica (in questo caso solo cianidina) nei fiori cresciuti a temperature più alte era circa la metà di quelli cresciuti a temperature più basse. Tuttavia l'incremento della temperatura causava in entrambe le cultivar una diminuzione dell'attività degli enzimi PAL e CHI che sintetizzano gli antociani. Quindi la differenza tra le due varietà deve essere ricondotta nella diversa stabilità dei loro pigmenti alle elevate temperature. Le elevate temperature hanno causato una drammatica diminuzione dei pigmenti antocianici anche nei fiori di *Anigozanthos* cv Mini Ranger.

Simili risultati sono stati ottenuti anche da Black *et al.* (1991) su azalea (*Rhododendron* sp. cv Gloria). In questa specie, una maggiore intensità di colore è stata registrata mantenendo le piante ad un regime termico di 18°C / 16°C (giorno/notte) rispetto ad un regime termico di 29°C/27°C.

Luce

La biosintesi delle antocianine richiede luce. L'incremento dell'intensità di colore delle mele rosse o di quelle bicolori mediante l'uso di luce artificiale nelle

fasi postraccolta ha costituito da molto tempo un modello utilizzato da diversi ricercatori per approfondire le conoscenze su questo fenomeno (Saks *et al.*, 1990).

I fiori che si aprono sotto basse intensità luminose spesso hanno colori sbiaditi: ciò è stato verificato da diversi autori su rosa (Biran e Halevy, 1974), petunia (Weiss e Halevy, 1991), lisianthus (Halevy e Kofranek, 1984), garofano (Koyama e Uda, 1994) e bocca di leone (Sang *et al.*, 1992). La bassa intensità di luce causa una scarsa pigmentazione attraverso due meccanismi:

- reazione mediata dai fotorecettori localizzati nei petali, come i fotorecettori UV, i criptocromi ed i fitocromi;
- reazione mediata dalla produzione di zuccheri da parte delle foglie o degli steli.

Kawabata *et al.* (2002) hanno dimostrato che in *lilium* (cv Acapulco) e violaciocca (cv Pigmy Rose) la produzione di antocianine è una reazione mediata da risposte fotomorfogeniche localizzate nel fiore: infatti, ombreggiando i fiori con diverse pellicole, hanno riscontrato una riduzione della biosintesi delle antocianine. In *lilium* tuttavia, quando la pianta intera veniva ombreggiata, la concentrazione delle antocianine diveniva più bassa rispetto alle piante con i soli fiori ombreggiati: ciò a causa del fatto che il trattamento riduceva la concentrazione degli zuccheri totali dal 3,0% all'1,6% causando di conseguenza una scarsa biosintesi di antocianine. Al contrario, in violaciocca l'ombreggiamento delle piante intere non riduceva la concentrazione delle antocianine rispetto alle piante con i soli fiori ombreggiati, probabilmente perché la riduzione riscontrata nella concentrazione totale di zuccheri dal 4,7% al 3,7% non era sufficiente per determinare lo stress da carenza di zuccheri.

Sang *et al.* (1992) hanno osservato che le cultivar *Do Bong* e *Chun Bong* di fiori recisi di *Antirrhinum majus*, se trattate con diversi livelli di saccarosio e tenute o all'oscurità, o con bassi livelli di luce (500-1.000 lx), o con alti livelli di luce (5.000-10.000 lx), mostravano un innalzamento del contenuto di antocianine all'aumentare dell'intensità di luce. Inoltre, studiando gli effetti di luce artificiale a diversa lunghezza d'onda fornita da lampade a luce blu, rossa, bianca calda, bianca fredda, fluorescente e incandescente, sulla colorazione di *Antirrhinum sp.*, gli stessi autori hanno trovato che il contenuto delle antocianine è risultato più elevato con l'utilizzo di luce fluorescente e luce blu ed inferiore utilizzando lampade rosse ed incandescenti. L'efficienza migliore per una buona colorazione dei fiori è risultata quella fornita da lampade fluorescenti con lunghezza d'onda pari a 470 e/o 600 nm.

L'effetto positivo di elevati livelli di luce sul colo-

re dei fiori è stato dimostrato anche da Black *et al.* (1991) su azalea (cv Gloria), in cui una irradiazione di $1.110 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-2}$ ha determinato una maggiore intensità di colore rispetto ad irradiazioni più basse.

Zuccheri

Gli zuccheri svolgono un importante ruolo nel mantenimento della qualità dei fiori recisi in quanto la quantità di zuccheri contenuta negli steli recisi è limitata. Il saccarosio rappresenta la più importante forma di carbonio assimilata fotosinteticamente che viene trasportata nelle piante e costituisce la principale fonte di carbonio per la crescita dei petali (Woodson e Wang, 1987).

E' noto che continui trattamenti postraccolta con saccarosio nell'acqua di conservazione migliorano l'apertura dei fiori e prolungano la durata in vaso di molte specie, ma in alcuni casi questi trattamenti determinano anche un aumento della concentrazione di antocianine nei petali e, quindi, la comparsa di colorazioni a tinte più forti, come ad esempio in garofano (Koyama e Uda, 1994), in rosa (Parups e Molnar, 1972), in pisello odoroso (*Lathyrus odoratus* L.) (Ichimura e Hiraya, 1998) ed in lisianthus (Ichimura e Korenaga, 1998).

Le antocianine sono sintetizzate attraverso diversi passaggi enzimatici quali la CHS, la CHI e la DFR. Relativamente a questi enzimi, Tsukaya (1991) ha riportato che, in petunia, l'espressione del gene della CHS è indotta dal saccarosio, mentre Kusuhara *et al.* (1996) hanno riportato che, in lisianthus, il saccarosio induce un incremento dell'espressione dei geni per la CHI, DFR e CHS. Pertanto, lo stimolo dell'espressione delle antocianine nei fiori recisi da parte del saccarosio appare determinata dall'induzione dell'espressione di geni coinvolti nella loro biosintesi.

Si ritiene che gli zuccheri non agiscano solo come segnale specifico per l'attivazione dell'espressione genica della biosintesi delle antocianine, quanto piuttosto come fonte del metabolismo dei carboidrati, specificatamente la fosforilazione degli esosi, dalla quale l'induzione della sintesi antocianica è dipendente (Vitrac *et al.*, 2000). Inoltre è stato dimostrato che la trasduzione del segnale correlato alla fosforilazione degli zuccheri deve interagire con il segnale delle gibberelline per indurre l'espressione genica e l'accumulo delle antocianine nelle corolle (Neta *et al.*, 2000).

Ichimura e Hiraya (1998) hanno riscontrato un aumento della concentrazione delle antocianine nei fiori di *Lathyrus odoratus* L. in seguito a trattamenti con solo saccarosio (100 g/l) o con tiosolfato d'argen-

to (STS) (0,2 mM) e saccarosio (100 g/l). In 4 cultivar di *lisianthus*, invece, Ichimura e Korenaga (1998) hanno riscontrato un incremento delle antocianine nei petali in seguito a continui trattamenti con 20 g/l di saccarosio in combinazione con 200 mg/l di idrossichinolina-solfato.

Un miglioramento dell'intensità di colore è stato riscontrato anche nei tepali di *lilium asiatico* in seguito a trattamenti per circa 6 ore con saccarosio (10%) e STS (1 mM) (Sindhu e Pathania, 2003). Sempre in *Lilium*, però nel tipo orientale (cv Stargazer), l'aggiunta del 2% di zuccheri nella soluzione in vaso non ha influenzato né la longevità né le dimensioni dei fiori, ma ha determinato un significativo aumento del contenuto antocianico e, pertanto, una più elevata intensità del colore dei tepali (Han, 2003). La defogliazione dei *lilium* orientali, pratica comunemente effettuata prima della commercializzazione, non ha influenzato l'apertura, la longevità e la dimensione dei fiori aperti, ma ha determinato una colorazione più chiara dei petali quando gli steli venivano messi in soluzione senza zucchero. L'aggiunta di zucchero nella soluzione in vaso ha controbilanciato gli effetti negativi della defogliazione sul colore dei petali.

Un basso contenuto in zuccheri, associato con una scarsa colorazione dei fiori, è stato riscontrato da Kofranek (1985), mentre Boo *et al.* (1997) hanno dimostrato come condizioni ambientali in grado di determinare un incremento dell'accumulo degli zuccheri (basse temperature ed elevate intensità di luce) determinassero indirettamente anche un incremento della sintesi delle antocianine ed una maggior colorazione dei petali.

Gli effetti positivi del saccarosio sulla colorazione dei fiori è stata dimostrata anche da Sang *et al.* (1992) su *Anthirrinum*, specie in cui il contenuto di antocianine risultava più alto sotto diversi regimi luminosi (oscurità, luminosità bassa o elevata) in seguito all'aggiunta di saccarosio nella soluzione conservante nelle percentuali del 10-20% (all'oscurità), 4% (bassa intensità luminosa) e 2% (elevata intensità luminosa).

Il ruolo della luce e del saccarosio sulla biosintesi di antocianine e sulla colorazione dei fiori di *lilium* e violacciocca sono state ampiamente studiate anche da Kawabata *et al.* (2002), come già esposto nel precedente paragrafo dedicato alla luce.

I metalli

Come già detto, l'associazione di antocianine con altri flavonoidi e composti simili (copigmentazione) offre una logica spiegazione delle numerose variazio-

ni nelle colorazioni blu e rosa in diversi *range* di pH. Anche alcuni metalli possono chelarsi con le antocianine che contengono un gruppo orto-diidrossilico per formare complessi metallici intensamente colorati e stabili in un *range* di pH in cui le antocianine da sole sarebbero prive di colore (Asen, 1976). Delle sei più comuni antocianidine, solo la cianidina, la delfinidina e la petunidina, con i loro glicosidi, formano chelati metallici. Nessun chelato sufficientemente colorato può essere formato con ioni metallici bivalenti. Nel range di pH da 4 a 6, la cianidina 3,5-diglucoside forma complessi stabili di colore blu intenso con ferro e alluminio, mentre non ne forma con cobalto, nichel, calcio, magnesio e bario (Asen, 1976). Chelati di colore blu intenso, stabili a pH tra 4 e 7, si formano anche con stagno, titanio, cromo, uranio e piombo. Tuttavia, questi metalli sono presenti in piccole tracce nei fiori e non in tutte le piante, per cui è poco probabile che i metalli, eccetto il ferro e l'alluminio, possano essere coinvolti nella determinazione e nel miglioramento del colore dei fiori, tanto più in quelli che contengono antocianidine che non formano chelati metallici (pelargonidina, peonidina e malvidina) (Asen, 1976).

Diversi studi hanno esaminato l'effetto di metalli diversi sulla stabilità delle antocianine e sul colore in soluzione. Mazza e Miniati (1993) hanno riportato che ioni di stagno, rame ed alluminio sono capaci di formare complessi stabili con le antocianine. Nei fiori, il principale effetto dei metalli su tali pigmenti è un cambiamento del loro colore (Kondo *et al.*, 1992).

Shaked-Sachray *et al.* (2002) e Oren-Shamir *et al.* (2003) hanno studiato l'effetto del magnesio sulla stabilità delle antocianine sottoposte ad elevate temperature in diverse specie. Il trattamento con magnesio sulle piante incrementava la concentrazione degli antociani negli organi nei quali essi si accumulavano, diminuendo la percentuale della degradazione antocianica. Questo vale sia per i fiori di *Aster sp.* e *Anigozanthos sp.* che per le giovani foglie fotosintizzanti delle piante di cocoplum (*Chrysobalanus icaco*). Poiché il trattamento con Mg non influenzava le attività degli enzimi PAL e CHI, l'incremento dei livelli delle antocianine probabilmente non era dovuto alla aumentata sintesi. Pertanto è possibile che il trattamento con Mg porti alla formazione di un complesso antocianina-metallo stabile, inibendo quindi la sua degradazione ad alte temperature.

Un prodotto comunemente utilizzato nel postraccolta di diverse specie da fiore reciso è il tiosolfato d'argento (STS). Lee e Suh (1996), nel *lilium* ibrido orientale cv Stargazer, hanno riscontrato un colore rosso più intenso dei fiori recisi sia con un pretratta-

mento con STS 4mM, sia con un trattamento in una soluzione conservante contenente AgNO_3 0,2mM + saccarosio 3%. Analogamente, Sindhu e Pathania (2003), su *Lilium* ibrido asiatico cv Alaska e Vivaldi, hanno riscontrato un miglioramento della qualità dei fiori, incluso un incremento dell'intensità del colore, dopo un trattamento con STS 1mM + saccarosio 10% per 6 ore.

Effetto dello stato nutrizionale

Per migliorare la colorazione di frutta o fiori, buoni risultati si possono ottenere regolando la somministrazione di N, P e K con le fertilizzazioni. Già nel 1986 Borkowski e Szwoonek eseguirono delle prove sperimentali su piante di pomodoro, cv Remiz, cresciute su substrato di torba di sfagno a differenti livelli di potassio (da 200 a 1.000 mg l^{-1}). Il colore rosso dei pomodori era risultato meno intenso con l'utilizzo di bassi livelli di potassio, mentre i frutti cresciuti con una concentrazione di 1.000 mg l^{-1} mostravano una colorazione rossa più intensa.

Su piante da fiore, in letteratura si riportano una serie di prove condotte su gladiolo che hanno evidenziato l'effetto positivo di concimazioni a base di azoto e potassio sul colore delle spighe fiorali di diverse cultivar (Accati *et al.*, 1994; Devecchi e Barni, 1997).

Nowak e Stroka (2001) riscontrarono un notevole effetto della nutrizione fosfatica sulla crescita e sulla qualità della *Impatiens hawkeri* cv Pago Pago. Le foglie e i fiori di piante soggette a carenza di fosforo avevano mostrato un colore più scuro, aumentando il loro valore ornamentale. Anche in *Pelargonium* lo stress da carenza di fosforo aveva determinato un colore più scuro degli anelli porpora presenti sulle foglie di questa specie (Baas *et al.*, 1995). Una colorazione più rossiccia o porpora delle foglie di piante sottoposte a carenza di fosforo è stata dimostrata da Shuman (1992) come dovuta ad un aumento della produzione di antociani.

Beel e Piens (1990) riscontrarono invece un benefico effetto sulla qualità e sull'intensità del colore dei fiori utilizzando concimi a rilascio controllato (Osmocote o Nutricote) rispetto alla concimazione tradizionale con fertilizzanti solubili in acqua.

Quando le modeste escursioni termiche giornaliere o le temperature troppo elevate determinano una scarsa colorazione rossa dei frutti, è una pratica comune somministrare solfato potassico per via fogliare su

melo, melanzana, melone o pomodoro al fine di ottenere una miglior colorazione rossa dei frutti stessi (dati non pubblicati). Sulla base di queste esperienze tecniche, Burchi *et al.* (2005) hanno condotto alcune prove al fine di valutare l'efficacia di diversi trattamenti fogliari con solfato potassico (K_2O , 2 g/l) per migliorare la colorazione dei fiori di *Lilium* asiatico, riducendo le perdite di brillantezza e di intensità di colore a carico dei tepali che si evidenziano nelle coltivazioni invernali a causa della ridotta radiazione solare. Sia le prime prove effettuate sulle cv Prato ed Elite, sia ulteriori prove effettuate sulle cv Allegretto, Fangio e Samur (Burchi *et al.*, in corso di stampa) hanno mostrato l'efficacia dei trattamenti effettuati (fig. 3).

Regolatori di crescita

L'effetto della benzil-adenina (BA), dell'acido indolacetico (IAA), dell'acido abscissico (ABA), dell'acido gibberellico (GA), dell'acido cloro-etilfosfonico (ethephon) e dell'uniconazolo in diverse dosi (0,1; 1,0 e 10,0 ppm) sulla colorazione dei fiori recisi di *Anthirrinum* (cv Do Bong e Chun Bong) è stato studiato da Sang *et al.* (1992). GA e IAA hanno determinato un abbassamento del contenuto di antocianine, specialmente alle concentrazioni elevate. Viceversa, BA, ABA, ethephon ed uniconazolo hanno determinato un lieve incremento del contenuto di antociani alle più basse concentrazioni. Sempre su *Anthirrinum* (cv Ulan e Irena), Rak e Nowak (1989) non hanno invece evidenziato alcun effetto sul colore dei fiori in seguito a trattamenti con 100-500 mg l^{-1} di GA.

Forma delle cellule epidermiche

La percezione del colore dei fiori può dipendere anche dalla natura fisica delle cellule epidermiche. Per esempio, in molte specie le cellule epidermiche dei petali hanno forma conica. Si ritiene che ciò aumenti l'effetto dei pigmenti cellulari aumentando la proporzione di luce che entra nelle cellule rispetto alla quantità di luce riflessa. Un esempio di ciò è stato riscontrato in *Anthirrinum*, in cui cellule epidermiche coniche normali e cellule epidermiche piatte a causa di una mutazione genetica (*mixta*, dovuta all'inserzione del trasposone *Tam4*) si differenziano per un apparente effetto di ridotta intensità di pigmentazione nelle cellule piatte (Noda *et al.*, 1994).

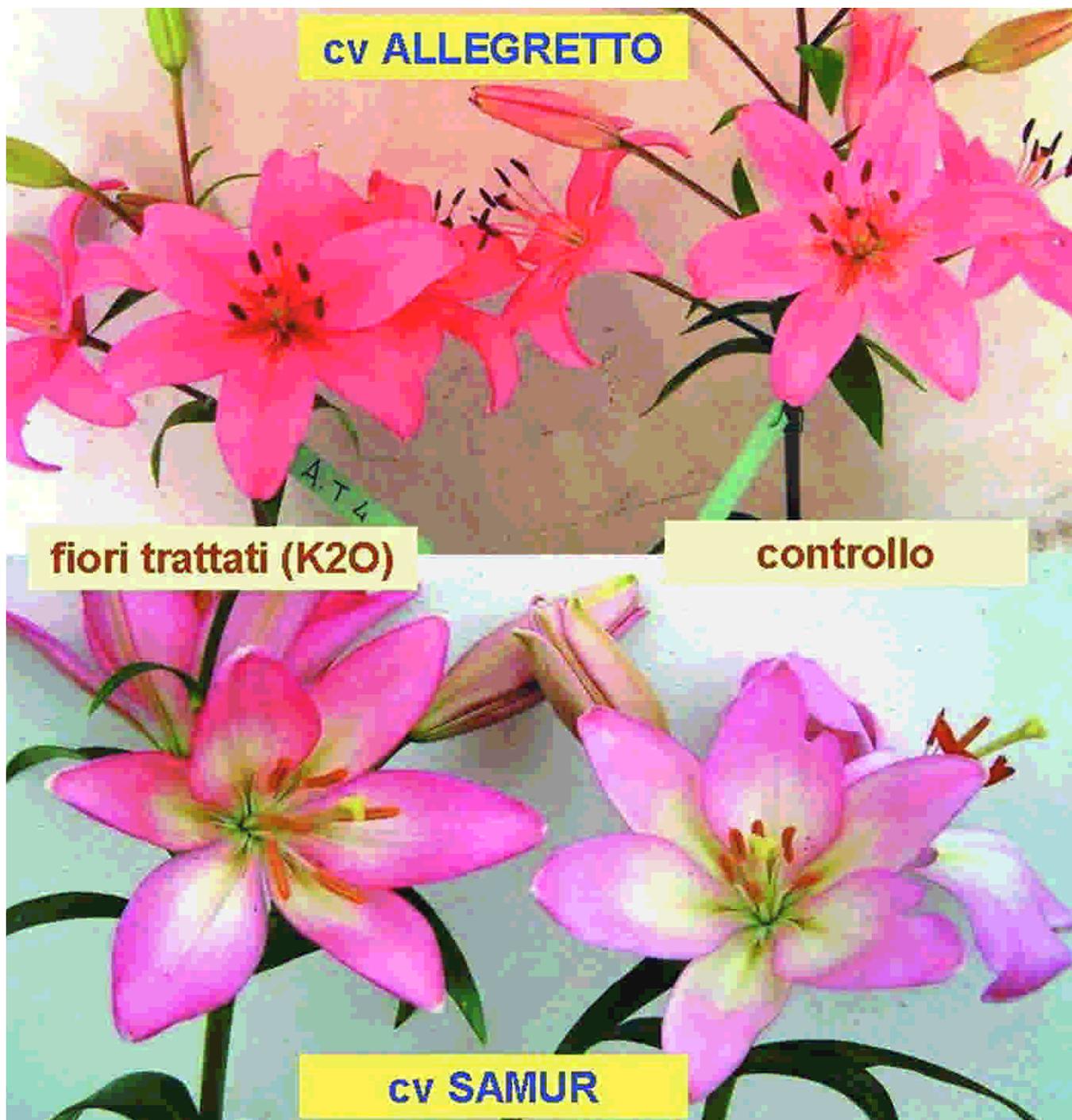


Fig. 3 - Effetto del trattamento fogliare con K_2O sul colore dei fiori recisi di *Lilium* cv Allegretto (sopra) e Samur (sotto). A sinistra, i fiori delle piante trattate; a destra, i fiori delle piante controllo.

Fig. 3 - Effect of the leaf treatment with K_2O on the colour of lily cut flowers, cv Allegretto (above) and cv Samur (below). On the left, flowers of the treated plants; on the right, flowers of the control plants.

Genetica mendeliana

Già ai primi del novecento due dei riscopritori delle teorie mendeliane, Correns e Tschermack, studiarono l'ereditabilità del colore dei fiori in *Matthiola* identificando quattro geni responsabili del carattere, seguiti poi da Saunders, che identificò altri tre geni in

grado di determinare una diminuzione dell'intensità del colore stesso (Griesbach, 2005). Sono da ricordare anche i quasi contemporanei studi condotti da Bateson e Punnett su pisello odoroso, che portarono alla identificazione di sei geni responsabili della colorazione dei fiori (Griesbach, 2005). Sempre agli inizi del novecento, alcuni studi condotti su mutanti a fiori bianchi

di *Cattleya* permisero ad Hurst la formulazione di un modello a tre geni (R, C e D), confermato quasi cinquant'anni dopo da Mehlquist, per il quale l'assenza degli alleli R o C determinava un fiore completamente bianco, mentre l'assenza dell'allele D determinava un fiore albescente (o falso bianco), con una tonalità chiarissima. Altri 9 geni furono proposti molto più recentemente per spiegare le diverse tonalità di colori specifici. (Griesbach, 2005).

L'interesse per questo tipo di studi determinò la proposizione di modelli di ereditabilità del carattere 'colore dei fiori' in molte altre specie: un modello generale per l'ereditabilità di questo carattere prevede cinque geni (*W*, *Iv*, *B*, *P* e *Dil*) in grado di spiegare quasi tutte le possibili combinazioni di colore dei fiori nella maggior parte delle piante. Per esempio, i genotipi *W* hanno fiori colorati mentre i genotipi *ww* hanno fiori bianchi; i genotipi *B* o *P* hanno fiori porpora, mentre i genotipi *bb* o *pp* hanno fiori blu o rossi rispettivamente; i genotipi *Dil* presentano colori scuri, i genotipi *dil dil* chiari; i genotipi *Iv* presentano fiori bianchi, i genotipi *iv iv* avorio. Questo modello segue strettamente tutto ciò che è conosciuto attualmente riguardo alla biochimica del colore dei fiori (Griesbach, 2005).

Attualmente la ricerca sta cercando di determinare le specifiche funzioni di geni precedentemente identificati mediante la genetica mendeliana. Per esempio, Griesbach riporta nella sua review (2005) i propri studi su un gene regolatore difettoso in grado di determinare il fenotipo albescente; poi, altri studi di biochimica condotti su *Cattleya*, che hanno dimostrato come piante con genotipo *RR cc DD* accumulino flavonoli mentre piante con genotipo *rr CC DD* accumulino prodotti intermedi dei calconi; infine, altri studi ancora sulle basi biochimiche delle mutazioni per il colore blu dei fiori in *Phalaenopsis violacea* Witte ed in *Doritis pulcherrima* Lindl, che hanno riscontrato nella prima specie una mutazione che modifica la biosintesi delle antocianine e nella seconda specie una mutazione che modifica il pH del vacuolo delle cellule dei petali. Sempre Griesbach (1998) ha studiato gli effetti del gene *Ph6* sul colore di *Petunia hybrida* Vilm., evidenziando per questo gene un ruolo come regolatore dell'espressione del pH e della concentrazione delle antocianine. Il gene *Ph6* è uno dei sei geni identificati in precedenza in petunia come capaci di influenzare il colore dei fiori modificando il pH, mentre altri nove geni erano già stati identificati come regolatori del *pathway* biosintetico delle antocianine.

Schwinn *et al.* (2001) hanno identificato e studiato una famiglia di geni coinvolta nella regolazione della

pigmentazione antocianica in *Antirrhinum majus*, molto probabilmente attraverso la regolazione dell'espressione dei geni per la biosintesi delle antocianine. Gaus *et al.* (2003), in uno studio condotto sulla genetica e sulla biochimica del colore dei fiori in violacciocca (*Stokesia laevis*), hanno evidenziato il ruolo della petunidina, della cianidina e della luteolina nell'espressione di differenti tonalità di colore in diverse cultivar. Gli stessi autori, mediante la segregazione dei caratteri in progenie F_1 ed F_2 , hanno studiato l'ereditabilità del colore dei fiori riscontrando il carattere blu o lavanda dominante su tutti gli altri colori, mentre il carattere di albescenza o di ridotta pigmentazione è risultato controllato da un singolo gene recessivo. Infine, il colore giallo è risultato ereditabile ma la sua espressione ristretta solo a certi particolari genomi.

I mutanti privi di carotenoidi sono risultati molto importanti per le attività di *breeding*. Per esempio, il mutante *rosea* di *Hemerocallis fulva* L. è stato largamente utilizzato per creare le prime cultivar a fiore rosso e rosa: il mutante privo di carotenoidi presenta fiori rosa, in contrasto con i fiori di color arancio del tipo selvatico. Mutanti privi di carotenoidi sono stati utilizzati anche per creare ibridi a fiori rosa di gerbera, *Disa* L., *Dendranthema* Kitam. e *Tulipa* L. (Griesbach, 2005).

Genetica molecolare

Programmi di miglioramento genetico mediante incrocio e selezione vengono da lungo tempo portati avanti con lo scopo di produrre nuove varietà con originali combinazioni di colori. Tuttavia, l'applicazione di questa tecnica tradizionale impone dei forti limiti, come ad esempio la casualità, e quindi l'imprevedibilità, dell'ottenimento di nuovi colori, la limitatezza dei colori conseguibili (dipendente dalle combinazioni di colori dei fiori presenti nelle linee parentali), i periodi di attesa dei risultati, più o meno lunghi in relazione alla durata del ciclo sessuale delle colture oggetto della ricerca. L'approccio biotecnologico, per la manipolazione diretta del colore dei fiori a livello molecolare, appare quindi molto attraente e promettente.

La conoscenza dettagliata delle vie biosintetiche dei flavonoidi è stata la condizione primaria per mettere a punto tecniche molecolari atte ad ampliare il *range* di colori dei fiori, modificando il pattern antocianico. Conoscendo gli enzimi coinvolti, il percorso biosintetico dei flavonoidi può essere seguito in ogni suo passaggio, partendo dal precursore, p-cumaril

CoA, fino alla produzione di antociani. Tutti gli enzimi implicati nel processo, eccetto la antocianidina sintasi (ANS), sono stati determinati e caratterizzati ed i relativi geni sono stati isolati (Martens *et al.*, 2003). Il colore dei fiori è stato quindi modificato con successo in piante transgeniche dei generi *Petunia*, *Gerbera*, *Eustoma*, *Nicotiana*, *Rosa*, *Dendrathera*, *Dianthus* (Davies e Schwinn, 1997).

Il primo fiore transgenico è stato ottenuto da Meyer *et al.* (1987) con l'inserimento del gene codificante per l'enzima DFR in *Petunia*, che ha reso possibile la sintesi della pelargonidina e l'ottenimento di un nuovo colore del fiore.

Questo lavoro ha dato inizio ad una serie di nuovi studi ed esperimenti che, ancora oggi, impegnano molti ricercatori. L'inserimento di geni implicati nella biosintesi dei flavonoidi, mediato da *Agrobacterium tumefaciens*, ha condotto in molti casi ad un'alterazione del colore dei fiori senza determinare contemporaneamente variazioni dei caratteri preesistenti (Elomaa *et al.*, 1993; Griesbach, 1995).

Prove di confronto fra linee colorate e linee non colorate di *Zantedeschia sp.* hanno evidenziato chiaramente le attività enzimatiche della CHS, della DFR e della flavanone 3-idrossilasi (FHT), indicando di conseguenza un blocco genetico, per le linee non colorate, nello *step* successivo che vede coinvolto l'enzima ANS, attivo nella formazione di cianidina. Una maggiore attività dell'enzima flavonoide 3'-idrossilasi (F3'H) potrebbe guidare verso un maggiore accumulo dei precursori della cianidina (Martens *et al.*, 2003).

Seitz *et al.* (2003), in un lavoro condotto su *Zantedeschia aethiops* cv Nili e su ibridi di *Osteospermum* cv Zimba, hanno caratterizzato l'attività degli enzimi coinvolti nella via biosintetica di antociani responsabili della colorazione arancio, rossa e blu dei fiori, dimostrando che la mancanza di uno solo di tali enzimi determina la formazione di petali con colori differenti, fino al bianco nel caso estremo in cui si tratti di un blocco del set completo di enzimi. In cv Nili, la riduzione del diidroflavonolo (diidroquercetina) catalizzata da DFR porta alla formazione di leucoantocianidine, substrato dell'enzima ANS per l'ottenimento di antocianidine. La presenza di infiorescenze bianche ha suggerito l'ipotesi che la mancanza di antocianine fosse da imputare ad un blocco nella biosintesi a livello dell'enzima ANS, che utilizza le leucoantocianidine come substrato per l'ottenimento delle antocianine. Prove di confronto fra tessuti fiorali della cv Nili bombardati con vettori contenenti il gene per la ANS e con vettori nudi, hanno evidenziato, nel primo caso, la comparsa di macchie rosse in corri-

spondenza del tessuto colpito (Seitz *et al.*, 2003).

L'impiego di sequenze antisense è risultato essere un metodo efficiente per inibire l'espressione di alcuni geni nelle piante. Nella varietà a fiori rossi Terra Regina di *Gerbera* (Elomaa *et al.*, 1993) è stata introdotta una sequenza antisense di cDNA che codifica per l'enzima CHS (*gchs1*) e si è ottenuto un blocco nello *step* iniziale della via biosintetica dei flavonoidi. L'analisi Southern ha consentito successivamente di confermare l'integrazione della sequenza antisense nel genoma della *Gerbera*. È stato possibile anche valutare un probabile effetto gene-dosatore, in quanto la ridotta pigmentazione florale è stata osservata negli individui con un numero maggiore di copie geniche per genoma (Elomaa *et al.*, 1993).

Anche Deroles *et al.* (1998), inserendo nel genoma sequenze antisense per l'enzima CHS, hanno ottenuto piante transgeniche di *lisianthus*. Il vasto range di colori ottenuto è risultato dipendente dalla maggiore, minore o addirittura assente espressione dell'enzima. Sempre in *lisianthus*, il gene antisense per la flavanone sintasi (FNS) ha prodotto fiori di colore magenta a partire da fiori porpora (Nielsen *et al.*, 2002), mentre in garofano l'introduzione di sequenze antisense per l'enzima flavanone 3-idrossilasi (FHT) ha portato all'attenuazione del colore rosso-arancio dei fiori (Zuker *et al.*, 2002).

In orchidea, tramite l'utilizzo di tecniche di analisi RAPD, AFLP e SSR, Zaiton *et al.*, (2003) hanno identificato frammenti di DNA presenti solo in linee mutanti a fiori bianchi di *Dendrobium* cv Sonia. Il medesimo gruppo ha anche messo a punto una tecnica di trasformazione mediata dall'*Agrobacterium* su *Dendrobium sp.* e *Oncidium lanceanum*. Il tentativo di ottenere *Oncidium lanceanum* con fiori bianchi ha coinvolto anche l'isolamento di due geni, phytoene sintasi (*psy*) e calcione sintasi (*chs*). Sequenze antisense dei geni *psy* e *chs* sono state inserite nel genoma di *Oncidium* e le analisi per confermare l'avvenuta integrazione di tali geni nel genoma delle piante trasformate sono in corso (Zaiton *et al.*, 2003).

In garofano, l'inserimento dei geni per l'enzima flavonoide 3',5'-idrossilasi (F3'5'H), isolato da *Petunia*, e per il citocromo b5 ha consentito di ottenere fiori di colori blu e viola veramente unici (Fukui *et al.*, 2003). Questa attività di ricerca ha portato al rilascio, da parte di Florigene Ltd, delle prime varietà geneticamente modificate relativamente all'introduzione di nuovi colori, lanciate con successo sul mercato floricolo (*Dianthus* cv MoondustTM, cv MoonshadowTM, cv MoonvistaTM, cv MoonliteTM) (Griesbach, 2005).

I geni e le sequenze antisense utilizzati per trasformare le specie ornamentali sopra citate sono riassunte nella tabella 2.

Grazie alle tecniche di ingegneria genetica, è stato possibile inserire nel genoma delle piante anche il gene per la proteina verde fluorescente (GFP), estratto dalla medusa *Aequorea victoria* (Mercuri *et al.*, 2002), la cui espressione potrebbe consentire lo sviluppo di una nuova classe di colore dei fiori. La caratteristica della proteina GFP di generare nei petali una fluorescenza nel campo del visibile potrebbe anche fornire un nuovo metodo di monitoraggio fenotipico o fisiologico e la possibilità di discriminare piante transgeniche.

Per ragioni di spazio, si sono riportati in questo paragrafo solo alcuni dei lavori svolti in questo ambito di ricerca, cercando di selezionare quelli che, in diversi momenti e su specie diverse, hanno in qualche modo segnato un passo decisivo ed originale nel progresso della conoscenza. Per una più dettagliata analisi dei risultati raggiunti in questo settore, si rimanda alla recentissima *review* di Griesbach (2005).

Conclusioni

Il colore dei fiori rappresenta uno dei caratteri fondamentali per la valutazione dei prodotti ornamentali. La qualità del colore del fiore (tonalità, brillantezza), la sua conservazione nelle fasi postraccolta e la varietà dei colori disponibili rappresentano infatti i requisiti essenziali per il successo economico di una specie da fiore reciso o da vaso fiorito.

I processi biochimici che sono alla base della biosintesi dei pigmenti, i fattori esterni che possono modificare il colore dei fiori, le analisi genetiche sul controllo del carattere ed il trasferimento di geni coinvolti nell'espressione del colore dei tessuti fiorali sono stati ampiamente trattati in questa *review*.

L'analisi della notevole letteratura reperita sull'argomento consente di trarre le seguenti conclusioni.

Ad oggi, una notevole conoscenza è disponibile sul processo biosintetico dei flavonoidi, sicuramente i pigmenti più comuni, quelli direttamente responsabili della maggior parte dei colori, quelli commercialmente più importanti e, dal punto di vista biotecnologico, più facilmente manipolabili (Davies e Schwinn, 1997). Il processo biosintetico dei carotenoidi è stato delucidato recentemente, ma la maggior parte della bibliografia riscontrata riguarda prevalentemente la pigmentazione dei frutti. Modeste informazioni, infine, sono disponibili sulla biochimica e sulla genetica delle betalanine, anche se notevoli progressi sono attesi nei prossimi anni per i motivi esposti nel testo (Griesbach, 2005).

Molti studi sono stati condotti sui fattori esterni in grado di modificare la colorazione dei fiori e, come risultato, diverse tecniche ed applicazioni pratiche sono state proposte agli operatori floricoli per migliorare e conservare la qualità del colore. Metodologie generali adottabili prima della raccolta riguardano il controllo della temperatura nell'ambiente di coltivazione (temperature elevate determinano un decremento nella sintesi ed un aumento nella degradazione delle antocianine) ed il controllo dell'intensità di luce (una ridotta illuminazione causa una scarsa pigmentazione attraverso una reazione mediata dai fotorecettori localizzati nei petali ed anche attraverso una ridotta produzione di zuccheri da parte delle foglie). Qualche esperienza è stata pure riportata in relazione agli effetti di stress da carenza di P, di maggiori apporti di N e K nella concimazione e di concimazioni fogliari a base di K qualche settimana prima della raccolta sul miglioramento della colorazione dei fiori: tuttavia, questi tipi di esperienze andrebbero maggiormente approfondite e studiate su diverse specie. Riguardo alle fasi postraccolta, a prescindere dai danni diretti causati sul colore dalla conservazione a temperature

Tab. 2 - Geni e sequenze antisense (*) per l'espressione di enzimi coinvolti della biosintesi di flavonoidi, utilizzati per trasformare specie ornamentali relativamente al colore dei fiori, citati nella *review*.

Tab. 2 - *Genes and antisense sequences (*) for the expression of enzymes involved in the biosynthesis of flavonoids, utilised to transform ornamental species in relation to flower colour, reported in the review.*

Geni coinvolti	Specie trasformate	Colori o tipi di pigmenti interessati	Rapporti
ANS	<i>Zantedeschia aethiopica</i>	Rosso	Seitz <i>et al.</i> , 2003
DFR	<i>Petunia</i>	Pelargonidina	Meyer <i>et al.</i> , 1987
F3'5'H	garofano	Blu, viola	Fukui <i>et al.</i> , 2003
CHS *	<i>Gerbera</i>	Attenuazione della pigmentazione fiorale	Elomaa <i>et al.</i> , 1993
CHS *	lisianthus	Attenuazione della pigmentazione fiorale	Deroles <i>et al.</i> , 1998
CHS * e PSY *	<i>Oncidium lanceanum</i>	Bianco (Analisi in corso)	Zaiton <i>et al.</i> , 2003
FHT *	garofano	Attenuazione della tonalità rosso-arancio	Zuker <i>et al.</i> , 2002
FNS *	lisianthus	Attenuazione del colore da porpora a magenta	Nielsen <i>et al.</i> , 2002

troppo basse, i trattamenti proposti riguardano fondamentalmente la somministrazione ai fiori recisi di zuccheri (in grado di determinare un aumento della concentrazione di antocianine nei petali ed anche di ritardare la proteolisi e, quindi, l'incremento del pH che influenza l'espressione delle antocianine stesse) o di metalli (come Ag, Mg, Fe e Al, in grado di formare complessi antocianina-metallo più stabili alle alte temperature). Per concludere, si fa solo un brevissimo cenno anche alle possibilità di modificare artificialmente il colore dei fiori mediante agenti coloranti, come ammonio porporato, eosina gialla, bromocresolo blu, bromocresolo verde, fenolo rosso (Kumar *et al.* 2003), ed ai diversi metodi di disidratazione dei fiori proposti per il mantenimento della qualità colore nei fiori essiccati (Chen *et al.*, 2000; Singh *et al.*, 2003).

Relativamente alle analisi genetiche ed agli studi sull'ereditabilità dei caratteri, è noto che sulle specie da fiore tali tipi di studi incontrano generalmente delle forti difficoltà in quanto quasi tutte le piante ornamentali hanno una base genetica interspecifica con un livello molto elevato di eterozigosi, non consentono la costituzione di linee omozigoti a causa del carico genetico che impedisce ogni forma di *inbreeding* stretto ed infine presentano carenze del sistema riproduttivo, inefficace spesso a fornire progenie sufficientemente numerose per l'analisi delle segregazioni (Schiva *et al.*, 2003). Tuttavia, relativamente al colore dei fiori, una discreta serie di lavori sono stati riscontrati sull'argomento fin dai primi anni del secolo scorso, tanto che molti dei primi studi di genetica sono stati condotti proprio su questo carattere, specificamente su fiori di orchidea (*Cattleya* Lindl.), pisello odoroso (*Lathyrus odoratus* L.) e *Matthiola incana* R.Br. Addirittura, già nel 1830 il famoso agronomo ligure Giorgio Gallesio, incrociando un garofano bianco con uno rosso, aveva ipotizzato la segregazione dei caratteri ed introdotto il concetto di dominanza (Martini, 1961). Probabilmente la vistosità del carattere ha da sempre interessato gli studiosi e gli appassionati di fiori. Ad oggi, molti geni responsabili del colore dei fiori sono stati caratterizzati e la loro ereditabilità definita sperimentalmente, tuttavia l'applicazione pratica di queste conoscenze trova forti ostacoli da un lato nell'imprevedibilità e nella limitatezza dei nuovi colori ottenibili, dall'altro nella lunghezza dei programmi di miglioramento genetico tradizionali.

Le numerose ricerche sugli aspetti biochimici e genetici della biosintesi dei flavonoidi hanno consentito di acquisire le basi indispensabili per lo sviluppo di strategie e tecniche bio-molecolari in grado di intervenire nella modificazione del colore dei fiori, quali

l'inserimento di geni non presenti nel *pool* genetico della specie in esame ed in grado di aprire la strada ad una nuova via metabolica, l'inserimento di geni idonei a superare blocchi genetici, o l'inserimento di DNA o RNA esogeno in grado di interferire con l'espressione del gene endogeno a livello della trascrizione o della sintesi del prodotto proteico (Martens *et al.*, 2003).

L'introduzione nelle piante ornamentali di transgeni in grado di produrre nuovi colori dei fiori altrimenti non conseguibili in quella specie rappresenta quindi un obiettivo molto attraente che già ha dato molti risultati. Dal 1987, quando la petunia è stata segnalata come il primo fiore trasformato (Meyer *et al.*, 1987), numerose specie ornamentali sono state trasformate con successo relativamente al colore dei fiori, comprese quelle commercialmente più importanti. Tuttavia, mentre molte piante transgeniche ad uso alimentare ed industriale sono commercializzate da diversi anni in quasi tutto il mondo, tra le ornamentali solo il già citato garofano a fiori blu, prodotto dalla Florigene Ltd, è presente sui mercati (Mercuri *et al.*, 2005).

Com'è noto, all'introduzione delle piante transgeniche nelle coltivazioni vengono opposti ostacoli di diversa natura (economica, etica, morale, politica, ideologica e perfino religiosa), spesso con poche basi scientifiche ed oggetto di infinite discussioni tra schieramenti poco propensi a trovare un ragionevole punto di intesa. Senza voler scendere nei dettagli di queste argomentazioni, si vuole solo ricordare che le specie ornamentali si trovano in una posizione favorevole per ciò che riguarda l'applicazione delle tecnologie di trasferimento genico poichè, a parte la mancanza di rischi di tossicità alimentare, molte specie non producono polline o danno del polline sterile ed inoltre sono coltivate in ambienti chiusi e su superfici limitate: tutto ciò riduce sicuramente i rischi legati all'emissione nell'ambiente di piante ornamentali geneticamente modificate.

Riassunto

Il colore dei fiori è un'importante caratteristica che aggiunge valore estetico alle piante da fiore in quanto elemento chiave nella scelta da parte del consumatore. L'espressione del colore è determinata dalla combinazione di numerosi fattori: tipo, quantità e stabilità dei pigmenti, pH delle cellule, copigmentazione, traslocazione dei pigmenti stessi dal sito di produzione. Diversi fattori esterni possono poi influenzarne l'espressione, come la luce, la temperatura, gli zuccheri,

le concimazioni, i metalli etc. I pigmenti maggiormente responsabili del colore dei fiori sono i flavonoidi ed i carotenoidi. Intervenire su tale carattere mediante interventi tecnico-agronomici, oppure modificando la composizione dei pigmenti nelle piante attraverso il *breeding* tradizionale o, più recentemente, agendo sulla via biosintetica attraverso l'ingegneria genetica, ha da sempre costituito un obiettivo di grande rilevanza. Le vaste conoscenze tecniche, genetiche e biochimiche raggiunte, esposte in questa *review*, costituiscono una solida base per ulteriori ricerche, incrementando le possibilità di successo.

Parole chiave: ornamentali, qualità, postraccolta, pigmenti, anticianine.

Bibliografia

- ACCATI E., BARNI E., DEVECCHI M., GIORZA G., 1994. *Influenza delle concimazioni sul colore di spighe fiorali di gladiolo*. Italus Hortus 1: 16-22.
- ASEN S., 1976. *Known Factors Responsible For Infinite Flower Color Variations*. Acta Hort. 63: 217-223.
- ASEN S., STEWART R.N., NORRIS K.H., 1977. *Anthocyanin and pH involved in the color of 'Heavenly Blue' morning glory*. Phytochemistry 16, 1118-1119.
- BASS R., BRANDS A., STRAVER N., 1995. *Growth regulation of bedding plants and poinsettia using low phosphorus fertilization and ebb-and-flow irrigation*. Acta Hort. 378: 129-137.
- BEEL E., PIENS G., 1990. *Uptake and leaching aspects with different methods of fertilization for the culture of Azalea indica in the open*. Verbodsnieuws voor de Belgische Sierteelt. 34(15): 781-785.
- BIRAN I., HALEVY A.H., 1974. *Effects of varying light intensities and temperature treatments applied to whole plants, or locally to leaves or flower buds, on growth and pigmentation of 'baccara' rose flowers*. Physiol. Plant 31: 175-179.
- BLACK L.A., NELL T.A., BARRETT J.E., 1991. *Forcing irradiance, temperature and fertilization affect quality of 'Gloria' azalea*. HortScience 26(11): 1397-1400.
- BOO H., TOMITAKA Y., ICHIMURA M., KIMURA M., 1997. *Effect of environmental factors on anthocyanin synthesis and sugar content in Cichorium intybus L. var. foliosum*. Environ. Control Biol. 35: 91-98.
- BORKOWSKI J., SZWONEK E., 1986. *Effect of potassium and magnesium on the quality of tomato fruits*. Acta Hort. 191: 133-139.
- BROUILLARD R., DANGLES O., 1993. *Flavonoids and flower colour*. Harborne, J.B. (ed.), The Flavonoids: Advances in Research Since 1986. Chapman & Hall, London, pp. 565-587.
- BURCHI G., BALLARIN A., PRISA D., NESI B., PIERANDREI F., GRASSOTTI A., 2006. *Miglioramento e conservazione della qualità postraccolta in Lilium*. Italus Hortus 6 (in corso di stampa).
- BURCHI G., PIERANDREI F., D'ANDREA S., PINCU M., MENESATTI P., GRASSOTTI A., 2005. *Risposta di due cultivar di Lilium asiatico a trattamenti fogliari per il miglioramento della colorazione dei fiori*. Floritecnica 1/2, 87-92.
- CHEN W., GAST K.L.B., SMITHEY S., 2000. *The effects of different freeze-drying processes on the moisture content, color, and physical strength of roses and carnations*. Sci. Hort. 84: 321-332.
- CLEMENT J.S., MABRY T.J., WYLER H., DREIDING A.S., 1994. *Chemical review and evolutionary significance of the betalains*. In: Behnke, H.-D. and Mabry, T.J. (eds), Caryophyllales; Evolution and Systematics. Springer-Verlag, Berlin: 247-261.
- DAVIES K.M., SCHWINN K.E., 1997. *Flower colour*. In: Biotechnology of Ornamental Plants, eds. R.L. Geneve, J.E. Preece and S.A. Merkle, CAB International: 259-294.
- DEROLES S.C., BRADLEY J.M., SCWHINN K.E., MARKMANN K.R., BLOOR S., MANSON D.G., DAVIES K.M., 1998. *An antisense chalcone synthase cDNA leads to novel color patterns in lisianthus (Eustoma grandiflorum) flowers*. Molecular Breeding 4: 59-66.
- DEVECCHI M., BARNI E., 1997. *Effect of fertilizers on the colour of gladiolus spikes*. Colture Protette 26(2): 79-82.
- ELOMAA P., HONKANEN J., PUSKA R., SEPPANEN P., HELARIUTTA Y., MEHTO M., KOTILAINEN M., NEVALAINEN L., TEERI T.H., 1993. *Agrobacterium-mediated transfer of antisense chalcone synthase cDNA to gerbera inhibits flower pigmentation*. Bio/technology 11(4): 508-511.
- FUKUI Y., TANAKA N., KUSUMI T., IWASHITA T., NOMOTO K., 2003. *A rationale for the shift in color towards blue in transgenic carnation flowers expressing the flavonoid 3',5'-hydroxylase gene*. Phytochemistry 63: 15-23.
- GAUS J., WERNER D., GETTYS L., GRIESBACH R., BLOM T., CRILEY R., 2003. *Genetics and biochemistry of flower color in stokes aster*. Acta Hort. 624: 449-453.
- GRIESBACH R.J., 1995. *Transgene inactivation in Petunia hybrida is influenced by the properties of the foreign gene*. Mol Gen Genet 248: 649-656.
- GRIESBACH R.J., 1998. *The effect of a ph gene on the color of petunia flowers*. Hortscience 33(3): 519.
- GRIESBACH R.J., 2005. *Biochemistry and Genetics of Flower Color*. Plant Breeding Reviews, 25: 89-114.
- HALEVY A.H., KOFRANEK A.M., 1984. *Evaluation of lisianthus as a new flower crop*. HortScience 19: 845-847.
- HALEVY A.H., MAYAK S., 1979. *Senescence and postharvest physiology of cut flowers*. I. Hort. Rev. 1: 204-236.
- HAN S.S., 2003. *Role of sugar in the vase solution on postharvest flower and leaf quality of Oriental lily 'Stargazer'*. HortScience 38: 3, 412-416.
- HELLER W., FORKMANN G., 1993. *Biosynthesis of flavonoids*. In: Harborne, J.B. (ed.), The Flavonoids: Advances in Research Since 1986. Chapman & Hall, London: 499-536.
- ICHIMURA K., HIRAYA T., 1998. *Effect of silver thiosulfate complex (STS) in combination with sucrose on the vase life of cut sweet pea flowers*. J. Jpn. Soc. Hort. Sci. 68 [In press].
- ICHIMURA K., KORENAGA M., 1998. *Improvement of vase life and petal color expression in several cultivars of cut Eustoma flowers y sucrose with 8-hydroxyquinoline sulphate*. Bull. Natl Res. Inst. Veg., Ornament. Plant & Tea 13: 31-39.
- KAWABATA S., LI Y.H., ADACHI M., MARUYAMA H., OZAWA E., SAKIYAMA R., 2002. *Role of photoreceptor and sugar-mediated reactions in light dependent anthocyanin production in lily and stock flowers*. J. Jpn. Soc. Hort. Sci., 71(2): 220-225.
- KOFRANEK A.M., 1985. *Postharvest physiology of cut flowers*. In: S.P. Singh (ed.), Short season flowering plants. B.R. Publishing, Dehli, India. P.: 239-252.
- KONDO T., YOSHIDA K., NAKAGAWA A., KAWAI T., TAMURA H., GOTO T., 1992. *Structural basis of blue-kawai development in flower petals from Commelina communis*. Nature 358: 515-518.
- KOYAMA Y., UDA A., 1994. *Effect of temperature, light intensity and sucrose concentration on bud forcing and carnation flower quality*. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 63: 203-209.
- KUMAR V., BHATTACHARJEE S.K., KUMAR R., MISRA R.L., SINGH K.P., 2003. *Postharvest life and quality of tuberose spikes as affected by colouring agents and storage*. Journal of Ornamental Horticulture - New Series 6(2): 119-125.

- KUSUHARA Y., KAWABATA S., SAKIYAMA R., 1996. *Effects of light intensity and sucrose concentration on the petal color and the expression of anthocyanin biosynthetic genes in detached flowers of Eustoma grandiflorum*. J. Jpn. Soc. Hort. Sci., 65 (sup. 2): 550-551.
- LEE A.K., SUH J.K., 1996. *Effect of harvest stage, pre- and post-harvest treatment on longevity of cut liliu flowers*. Acta Hort. 414: 287-293.
- LEWIS D.H., ARATHOON H.S., HUANG S.C., SWINNY E.E., FUNNELL K.A., 2003. *Anthocyanin and Carotenoid Pigments in Spathe Tissue from Selected Zantedeschia Hybrids*. Acta Hort. 624: 147-154.
- MARTENS S., KNOTT J., SEITZ C.A., JANVARI L., YU S.N., FORKMANN G., 2003. *Impact of biochemical pre-studies on specific metabolic engineering strategies of flavonoid biosynthesis in plant tissues*. Biochemical Engineering Journal 14: 227-235.
- MARTINI S., 1961. *Giorgio Gallesio, pomologist and precursor of Gregor Mendel*. In: The American Pomological Society. G.M. Kessler Ed., Dept. of Hort. Mich. State College. East Lansing: 53-54.
- MAZZA G., MINIATI E., 1993. *Color stabilization and intensification*. In: Mazza G. and Miniati E. (ed) Anthocyanins in Fruits, Vegetables, and Grains. CRC Press, Boca Raton: 1-10.
- MERCURI A., DE BENEDETTI L., BRUNA S., SCHIVA T., 2005. *Utilizzo dei geni rol in floricoltura: risultati conseguiti e prospettive future*. Italus Hortus 4: 3-16.
- MERCURI A., SACCHETTI A., DE BENEDETTI L., SCHIVA T., ALBERTI S., 2002. *Green fluorescent flower*. Plant Science 162: 647-654.
- MEYER P., HEIDMANN I., FORKMANN G., SAEDLER H., 1987. *A new petunia flower colour generated by transformation of a mutant with a maize gene*. Nature 330: 677-678
- NETA S.I., SHOSEYOV O., WEISS D., 2000. *Sugars enhance the expression of gibberellin-induced genes in developing petunia flowers*. Physiol Plant. 109: 196-202.
- NIELSEN K., DEROLES S., MARKMANN K.R., BRADLEY M.J., PODIVINSKY E., MANSON D., 2002. *Antisense flavanol synthase alters pigmentation and flower color in lisianthus*. Mol Breed 9: 217-229.
- NODA K.I., GLOVER B.J., LINSTED P., MARTIN C., 1994. *Flower colour intensity depends on specialized cell shape controlled by a Myb-related transcription factor*. Nature 369: 661-664.
- NOWAK J., STROKA S., MALOUPA E., GERASOPOULOS D., 2001. *The effect of phosphorus nutrition on growth, flowering and chlorophyll fluorescence of New Guinea impatiens 'Pago Pago'*. Acta Hort. 548: 561-565.
- OREN-SHAMIR M., NISSIM-LEVI A., OVADIA R., KAGAN S., SHAKED-SACHRAY L., 2003. *Increased Anthocyanin Accumulation in Flowers and Foliage at Elevated Temperatures is Affected by Magnesium Treatment*. Acta Hort. 624: 171-176.
- PARUPS E.V., MOLNAR J.M., 1972. *Histochemical study of xylem blockage in cut roses*. J. Am. Soc. Hort. Sci. 97: 532-534.
- RAK J., NOWAK J., 1989. *The effect of gibberellic acid on growth and flowering of snapdragon cutting*. Acta Hort. 251: 67-69.
- SAKS Y., SONEGO L., BEN-ARIE R., 1990. *Artificial light enhances red pigmentation, but not ripening, of harvested 'Anna' apples*. Hort. Sci., 25: 547-549.
- SALISBURY F.B., ROSS C.W., 1992. *Flavonoids*. In: Plant Physiology, Wadsworth Publishing Co. (USA): 359-362
- SANG C.K., YUN H.S., KIM H.Y., 1992. *Effects of light, sucrose and growth regulators on the colouration of cut snapdragon flower*. Journal of the Korean Society for Horticultural Science 33(1): 79-86.
- SCHIVA T., MERCURI A., BURCHI G., 2003. *La floricoltura italiana. Le specie e le varietà: la varietà delle forme*. Italus Hortus 4: 30-40.
- SCHWINN K., DAVIES K., ALM V., MACKAY S., MARTIN C., 2001. *Regulation Of Anthocyanin Biosynthesis In Antirrhinum*. Acta Hort. 560: 201-206.
- SEITZ C., OSWALD N., BORSTLING D., FORKMANN G., 2003. *Being acyanic: an unavoidable fate for many white flowers?* Acta Hort 612: 83-88.
- SHAKED-SACHRAY L., WEISS D., REUVENI M., NISSIM-LEVI A., OREN-SHAMIR M., 2002. *Increased anthocyanin accumulation in aster flowers at elevated temperatures due to magnesium treatment*. Physiologia Plantarum 114: 559-565.
- SHUMAN L.M., 1992. *Mineral nutrition*. In: Plant-environment interactions. (Ed. R.E. Wilkinson), Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, Hong Kong: 149-182.
- SHVARTZ M., BOROCHOV A., WEISS D., 1997. *Low temperature enhances petunia flower pigmentation and induces chalcone synthase gene expression*. Physiol Plant 99: 67-72.
- SINDHU S.S., PATHANIA N.S., 2003. *Effect of Pulsing, Holding and Low Temperature Storage on Keeping Quality of Asiatic Lily Hybrids*. Acta Hort. 624: 389-394.
- SINGH A., DHADUK B.K., SHAH R.R., 2003. *Effect of dehydration on postharvest life and quality of zinnia flowers*. Journal of Ornamental Horticulture - New Series. 6(2): 141-142.
- STEWART R.N., NORRIS K.H., ASEN S., 1975. *Microspectrophotometric measurement of pH and pH effects on the color of petal epidermal cells*. Phytochemistry 14: 937-942.
- STRACK D., WRAY V., 1994. *Recent advances in betalain analysis*. In: Behnke, H.-D. and Mabry, T.J. (eds), Caryophyllales; Evolution and Systematics. Springer-Verlag, Berlin: 263-277.
- TSUKAYA H., 1991. *Sugar-dependent expression of the CHS-A gene for chalcone synthase from petunia in transgenic Arabidopsis*. Plant Physiol. 97: 1414-1421.
- VAN TUNEN A.J., MOL J.N.M., 1991. *Control of flavonoid synthesis and manipulation of flower colour*. In: Grierson, D. (ed), Developmental Regulation of Plant Gene Expression: 94-130.
- VITRAC X., LARRONDE F., KRISA S., DECENDIT A., DEFFIEUX G., MERILLON J.M., 2000. *Sugar sensing and Ca-calmodulin requirement in Vitis vinifera cells producing anthocyanins*. Phytochemistry 53: 659-665.
- WEISS D., HALEY A.H., 1991. *The role of light reactions in the regulation of anthocyanin synthesis in Petunia corollas*. Physiol. Plant. 81: 127-133.
- WOODSON W.R., WANG H., 1987. *Invertases of carnation petals: Partial purification, characterization and changes in activity during petal growth*. Physiol. Plant. 71: 224-228.
- YOSHIDA K., 1995. *Cause of blue petal colour*. Nature 373: 291.
- ZAITON A., AFFRIDA A.H., MOHD NAZIR B., 2003. *Changing Flower Colours in Orchids*. Malaysian Institute for Nuclear Technology and Research, Ornamental Group, Agrotechnology e Biosciences Division. <http://www.mint.gov.my/Rnotespdf/Research%20Note%2003.pdf>
- ZUKER A., TZIFIRA T., BEN-MEIR H., OVADIS M., SHKLARMAN E., ITZHAKI H., 2002. *Modification of flower color and fragrance by antisense suppression of the flavanone 3-hydroxylase gene*. Mol Breed 9: 33-41.

