



UNIVERSITÀ DI PISA

FACOLTA' DI AGRARIA

Corso di laurea specialistica in Biotecnologie agro-industriali

curriculum Vegetale

ELABORATO FINALE

La pigmentazione nel fiore di *Lilium*

Candidato
Domenico Prisa

Relatori
Dott. ssa Laura Pistelli
Dr. Gianluca Burchi

Anno Accademico 2005/2006

INDICE

1 - INTRODUZIONE: <u>IL LILIUM</u>	5
1.1 - Caratteristiche botaniche	5
1.2 - Coltivazione	6
1.3 - Avversità	7
1.4 - Miglioramento genetico	9
1.5 - Aspetti economici	10
2 - <u>IL COLORE DEI FIORI</u>	12
2.1 - I pigmenti	13
2.1.1 - I flavonoidi	14
2.1.2 - I carotenoidi	16
2.1.3 - Le betalanine	17
2.2 - FATTORI CHE INFLUENZANO LA PIGMENTAZIONE	18
2.2.1 - Il pH	18
2.2.2 - La temperatura	19
2.2.3 - La luce	20
2.2.4 - Gli zuccheri	21
2.2.4.1 - Saccarosio	21
2.2.4.2 - Glucosio e fruttosio	23
2.2.5 - Elementi nutritivi	24

2.2.6 - Stimolatori della formazione di antociani	26
2.2.6.1 - Bion	26
2.2.6.2 - La kinetina	27
3 - <u>LA GENETICA DEL COLORE DEI FIORI</u>	27
3.1 - La forma delle cellule epidermiche	27
3.2 - Miglioramento genetico mediante biotecnologie	28
<u>PARTE SPERIMENTALE</u>	31
1 - SCOPO DELLA RICERCA	31
2 - MATERIALI E METODI	32
2.1 - Materiale vegetale	32
2.2 - Epoche e densità d'impianto, trattamenti colturali	32
2.3 - Trattamenti effettuati sugli steli ai fini della valutazione della longevità	33
2.4 - Trattamenti per il miglioramento del colore dei tepali	34
2.5 - Rilievi sulla longevità delle infiorescenze, sulle dimensioni dei bocci e sugli aborti fiorali	35
2.6 - Rilievi sul colore	35
2.7 - Spettrocolorimetro	36
2.8 - Elaborazione dei dati	37
3 - RISULTATI	38
3.1 - Analisi effettuate sugli steli	38
3.2 - Dimensione dei bocci fiorali	42
3.3 - Miglioramento del colore dei tepali con somministrazione di prodotti	45

3.4 – Analisi dei dati ottenuti dallo spettrocolorimetro	49
4 - DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	51
BIBLIOGRAFIA	53

Ringraziamenti

In uno dei momenti più importanti della mia vita, vorrei rivolgere un pensiero a tutti coloro che durante il corso di studi mi sono stati vicini.

Vorrei ringraziare la dott.ssa Laura Pistelli, per la disponibilità e l'aiuto fornitomi nella stesura dell'elaborato finale.

Il dr. Gianluca Burchi che mi ha aiutato, capito e consigliato durante tutto lo svolgimento degli esperimenti e nella stesura della tesi.

Il dr. Antonio Grassotti per avermi dato l'opportunità di poter svolgere questo lavoro di tesi presso il (C.R.A.-Istituto Sperimentale per la Floricoltura di Pescia)

Un ringraziamento particolare al sig. Fernando Pierandrei per i suoi consigli e la sua amicizia e al sig. Stefano D'Andrea per la sua disponibilità e l'aiuto nell'elaborazione dei dati della prova.

Un grazie di cuore alla mia famiglia, che mi ha dato la possibilità di poter arrivare a questo traguardo. Spero che in questo momento possiate essere orgogliosi e in parte ripagati per tutti sacrifici che avete fatto in questi anni per me.

INTRODUZIONE

Capitolo 1 - Il Lilium

1.1 - Caratteristiche botaniche

Anticamente il nome latino ha tratto origine dal termine greco *Leiron* utilizzato da Teofrasto per indicare il “Madonna Lily”.

Il genere comprende circa ottanta specie di piante bulbose appartenenti alla famiglia delle *Liliaceae* che sono originarie dell'emisfero settentrionale. Il *Lilium* ha un areale di diffusione vastissimo, che comprende zone temperate dell'Europa e dell'Asia, al di sopra dell'equatore, e l'America Settentrionale. In senso longitudinale, tale area si estende, attraverso l'Europa e l'Asia, sino al Kamchatka, e dall'isola di Vancouver a oriente, attraverso la Nuova America, fino alla Nuova Scozia. Il *L. neilgherrense* è la specie rinvenuta più a sud, a 3000 metri nell'India meridionale; il *L. martagon*, reperito in Siberia, quello con areale più a nord (M. De Ranieri *et al.*, 1984).

Le varietà commerciali più importanti possono essere distinte in tre tipologie principali: ibridi Asiatici ('Pollyanna', 'Elite', 'Vivaldi'), ibridi Orientali ('Casablanca', 'Star Gazer') e ibridi Longiflorum ('Snow Queen', 'White Fox'). Negli ultimi anni è stata inserita la tipologia degli 'LA', caratterizzata da ibridi interspecifici derivanti da incroci tra 'Asiatici' e 'Longiflorum'. In Italia la produzione commerciale è caratterizzata per il 70% dagli “Ibridi Asiatici”, per il 20% dagli “Ibridi Orientali” e per il 10% dagli “Ibridi Longiflorum”.

Gli organi di riproduzione vegetativa del *Lilium*, i bulbi, in genere sono costituiti da scaglie carnose sovrapposte ad embrici, non tunicate. Su stelo eretto le foglie, lanceolate o lineari, sono inserite in ordine sparso, talvolta verticillate; all'ascella portano talvolta bulbilli. I fiori sono grandi, appariscenti, spesso profumati, eretti, orizzontali o penduli, solitari o inseriti in un racemo o falso ombrello, con pochi o molti fiori; il perianzio è deciduo; i tepali sono segmenti liberi, variabili in forma e portamento, non troppo larghi alla base, tutti provvisti di nettario; gli stami sono sei, i filamenti sottili, affusolati gradualmente dalla base all'apice, le antere dorsofisse, l'ovario a tre

celle, lo stilo generalmente lungo, il frutto costituito da capsule con molti semi. Il numero cromosomico somatico è generalmente $2n = 24$ (diploide).

Se si tiene presente la larga distribuzione delle specie comprese nel genere e negli habitats diversi da cui originano, è evidente che la gamma di esigenze colturali è piuttosto varia secondo i gruppi di specie. Quasi tutte sono rustiche ma alcune, specialmente quelle originarie dei Paesi caldi e quelle che hanno un inizio di sviluppo piuttosto precoce, necessitano di strutture di protezione negli ambienti di coltivazione.

1.2 - Coltivazione

I *Lilium* prediligono condizioni ambientali analoghe a quelle di origine, cioè suoli vulcanici molto porosi, climi ad inverno piuttosto asciutto e periodo estivo mitigato da frequenti piogge. Le piante richiedono ombreggiamento sulla parte basale e per tale motivo hanno uno sviluppo migliore se coltivate tra basse siepi di sempreverdi o in terreni boscosi piuttosto aperti. Le specie Americane, che sono in genere prive del secondo palco di radici alla base dello stelo, hanno talvolta bulbi rizomatosi o stoloniferi. Sembrano prediligere terreni costituiti da un composto che contenga in abbondanza residui di foglie o torba.

Il ciclo produttivo del *Lilium* può essere diviso in due fasi: la propagazione, finalizzata all'ottenimento di materiale sano (bulbetti) in quantità elevata da destinare alla produzione, e l'ingrossamento, durante il quale i bulbilli vengono portati alle dimensioni e al peso ideale per la produzione di fiori commercialmente validi. Le varietà oggi in commercio necessitano di ambienti di coltivazione con temperature oscillanti tra i 12-15°C di notte e i 21-25°C di giorno. Temperature più basse provocano il rallentamento della crescita, ma allo stesso tempo il miglioramento della qualità, con produzione di steli più lunghi e robusti con un elevato numero di fiori.

Il *Lilium* è una pianta molto esigente in termini di luce, pur non essendo una longigiurna obbligatoria. L'insufficienza di luce nel periodo invernale può portare all'aborto o all'abscissione dei fiori (prevalentemente quelli apicali). Nelle varietà più sensibili ciò rende necessario ricorrere all'illuminazione artificiale con l'utilizzo di lampade a vapore di sodio da 400 W ciascuna che, fissate a due metri dal suolo, coprono 8-9 m² di coltura. Anche l'eccesso di luminosità è negativo, tendendo a favorire la produzione di steli corti. In questo caso le piante devono essere ombreggiate mediante reti, in grado di trattenere l'intensità luminosa fino al 70% (Grassotti e Magnani, 1988).

La distanza di impianto è funzione della stagione, del calibro dei bulbi e delle varietà; varia da 35 a 60 bulbi per mq per il calibro 14-16, 35-55 bulbi per mq per quello 16-18, 25-50 bulbi per mq per

quello 18-20, 25-35 bulbi per mq per quello 20-22, a 25-30 bulbi per mq per il calibro >22. La densità minore si adotta nei mesi poveri di luce e quella maggiore nelle colture primaverili.

Per l'impianto bisogna scegliere un terreno ben drenato, con pH di 5,5-7,5, ammendato se argilloso con sostanza organica umidificata o torba bionda, lavorato ad una profondità di 40 cm per favorire lo sgrondo, con un basso livello di salinità. Come concimazione di base bisogna interrare 1 m³ ogni 100 mq di letame molto maturo e concimi chimici con titoli dosati a seconda dei risultati dell'analisi chimica. Si ritiene che il miglior rapporto N:P:K sia pari a 1,0:0,5:1,5. Alcuni autori consigliano una concimazione mediante fertirrigazione ogni due settimane con 2,5 gr/l di nitrato di sodio o di calcio e 1,5 gr/l di cloruro di potassio (Grassotti *et al.*, 1981).

Circa 3 settimane dopo la germogliazione e 3 settimane prima della fioritura si deve somministrare nitrato di calcio alla dose di 1 Kg per 100 mq, come fertirrigazione sottochioma. L'acqua che viene impiegata deve essere di buona qualità, con un contenuto di sali minore di 500 mg/l. Di solito si pianta su terreno ben umido e si irriga abbondantemente per farlo aderire al bulbo; successivamente si mantiene il substrato ad una umidità costante, ma senza ristagni in quanto la carenza d'acqua può causare ritardi nella crescita ed aborto dei fiori.. Prima dell'impianto si può stendere a terra una rete come quelle dei crisantemi, per sostenere gli steli in fioritura.

Gli steli vengono recisi quando i primi boccioli sono ben colorati e si iniziano a divaricare i petali. Dopo la raccolta, viene sfogliata la parte basale dello stelo, che in seguito viene messo in acqua contenente Chrysal-Garofano VB, per almeno 4 h, e poi conservato nelle celle frigorifere, in acqua e in posizione eretta. Per controllare l'altezza delle piante in modo da ottenere una pianta armonica, si può ricorrere all'uso di prodotti nanizzanti applicati per immersione del bulbo in preimpianto e per irrigazione del vaso alla germogliazione. Bisogna fare comunque attenzione all'eccesso di nanizzante, che può provocare l'ingiallimento delle foglie basali, ed agli sbalzi di umidità, per evitare danni al fogliame. L'utilizzazione di film plastici per la pacciamatura assicura, oltre a un controllo delle infestanti, anche dei riflessi positivi sul materiale prodotto (Grassotti e Magnani 1988).

1.3 - Avversità

La coltivazione del *Lilium* è spesso messa in pericolo dall'attacco di nematodi, batteri e funghi che sono portatori di malattie. Il loro controllo dipende principalmente dalla qualità del materiale utilizzato e dall'uso dei giusti prodotti chimici.

Generalmente i *Lilium* sono attaccati da diversi fitofagi sia nella parte epigea (steli e fiori) sia in quella ipogea (radici e bulbi). I fitofagi più pericolosi della parte epigea sono soprattutto afidi e

tripidi (*Myzus persicae*, *M. solani*, *M. circumflexus*, *M. lili*, *Frankliniella occidentalis*, *Thrips tabaci*) che provocano con l'apparato boccale la deformazione degli organi vegetativi e favoriscono la trasmissione dei virus. Gli attacchi si evidenziano con l'arricciamento delle foglie e dei germogli, e sui boccioli causano delle macchie traslucide, i fiori sono piccoli, deformi e decolorati e in alcuni casi si ha anche l'aborto dei boccioli. I fitofagi della parte ipogea (*Agrotis segetum*, *A. ipsilon*) provocano lesioni dei bulbi e sono pericolosi soprattutto allo stadio larvale, quando fuoriescono dal terreno per nutrirsi delle foglie più basse e del fusto a livello del colletto. Possono scavare anche delle gallerie all'interno del bulbo provocando gravi problemi alla coltura.

La dannosità dei nematodi è dovuta sia alla loro azione diretta che alle possibili infezioni di funghi, batteri e virus, di cui possono essere vettori. Tra le specie più pericolose si ricordano: *Meloidogyne incognita*, *Aphelenchoides fragariae*, *Ditylenchus dipsaci*, *Pratylenchus penetrans*. I nematodi attaccano principalmente le radici, da cui traggono i succhi cellulari ed in cui depositano le uova, portando alla necrosi dei tessuti, che divengono flaccidi e inconsistenti, ed all'ingiallimento ed appassimento della pianta (Di Genova, 2000).

Numerose e gravi sono le patologie fungine del *Lilium*. Le principali specie che attaccano la parte ipogea sono *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora*, *Pythium* e *Colletotricum*, che causano generalmente marciumi radicali sui bulbi con formazione di macchie, conseguente alterazione dello stelo ed ingiallimento delle foglie. Tra i funghi che attaccano la parte epigea si ricordano *Rhizoctonia solani*, che, nel caso di lievi attacchi, provoca delle macchie bruno chiare sulle foglie basali mentre, nel caso di gravi attacchi, causa delle macchie anche sulle foglie apicali fino a compromettere la fioritura. La *Botrytis elliptica* si manifesta con piccole macchie circolari sulle foglie che vanno ingrandendosi fino ad occupare tutta la superficie fogliare e, in seguito, anche sul resto della pianta. Le temperature medie e tassi alti di umidità favoriscono lo sviluppo di questo patogeno (Di Genova, 2000)..

Le malattie di origine virale che possono colpire il *Lilium* sono numerose: il CMV (Cucumber Mosaic Virus), l'AMV (Arabic Mosaic Virus), il TMV (Tabacco Mosaic Virus), il TRSV (Tabacco Ring-Spot Virus), l'LVX (Lily Virus X), il TBV (o "Virus della rottura del colore del tulipano") e LSV (o "Virus senza sintomi del Giglio"). Tra questi, LSV (Lily Symptomless Virus) è il più comune dei virus del *Lilium*, colpisce quasi tutti gli ibridi coltivati ed è, inoltre, l'unico specifico. La sua presenza limita lo sviluppo vegetativo della pianta, diminuisce il numero e la grandezza dei fiori, rendendo la pianta più suscettibile ad attacchi patogeni di *Botrytis* e *Fusarium*. La trasmissione avviene comunemente attraverso gli afidi. Per ottenere piante esenti da virus vengono utilizzate delle tecniche quali la termoterapia, la chemioterapia e la coltura in vitro di apici meristemati.

1.4 - Miglioramento genetico

In seguito all'introduzione sul mercato di nuovi ibridi provenienti dagli Stati Uniti, si è avuta intorno alla metà del '900 un aumento della produzione di *Lilium* in Italia. L'utilizzo di nuove tecnologie come la PCR e l'identificazione di nuovi marcatori molecolari ha permesso la caratterizzazione genomica di nuove varietà e un continuo miglioramento delle caratteristiche fisiologiche e morfologiche, permettendo anche l'abbattimento di barriere come l'autoincompatibilità e la maschiosterilità che in passato non permettevano gli incroci. Sicuramente possiamo dire che negli Stati Uniti e nei Paesi del centro Europa queste tecnologie negli ultimi anni hanno fatto passi da gigante, a differenza dell'Italia che si trova sempre ad importare materiale dall'estero con conseguenze economiche problematiche per i nostri floricoltori

Generalmente i punti primari che vengono ricercati nei programmi di miglioramento genetico su questa bulbosa sono:

- Individuazione di ibridi in grado di rispondere positivamente alla forzatura, così da assicurarne la coltivazione per fiore reciso durante tutto l'arco dell'anno;
- Reperimento di nuove forme e colori dei fiori, per rispondere alle continue richieste di novità da parte del mercato, obiettivo raggiungibile sia attraverso incroci intra- ed inter-specifici, sia mediante tecniche di ingegneria genetica;
- Risanamento da virus, mediante la coltivazione '*in vitro*' di apici meristematici, e controllo di fitopatie (soprattutto *Fusarium oxysporum* f.sp. lili), individuando forme resistenti (anche mediante il ricorso all'ingegneria genetica);
- Ampliamento della versatilità di impiego dei bulbi per la coltivazione sia per fiore reciso che per vaso;
- Incremento dell'indice di moltiplicazione, mediante la propagazione massale *in vitro*;
- Riduzione del periodo necessario all'ottenimento di bulbi di tipo commerciale sia attraverso trattamenti termici al materiale di propagazione, che utilizzando seme F₁;
- Individuazione di varietà che presentino una maggiore durata in vaso degli steli fiorali nelle fasi di post-raccolta, che conservino al meglio le caratteristiche qualitative dei fiori e delle foglie anche dopo frigoconservazione, che presentino colori brillanti anche se coltivate in periodo autunno-invernale.

Un programma di breeding fu avviato anche in Italia presso l'Istituto Sperimentale per la Floricoltura di Pescia, a partire dall'anno 1984. Diversi ibridi di *Lilium* sono stati sottoposti a

trattamento mediante irraggiamento con Raggi X, per ottenere mutanti solidi in possesso di buoni caratteri commerciali. I vari cicli di selezione delle progenie, derivanti dai diversi programmi di incroci, hanno permesso di individuare, moltiplicare, ingrossare e valutare alcune decine di cloni sulla base di diversi obiettivi tra i quali: idoneità alla coltivazione in pien'aria nel periodo estivo, resistenza a *Botrytis elliptica*, fiori con nuove forme e nuovi colori, maggiore lunghezza dello stelo florale, fiori senza polline, materiale idoneo alla coltivazione in vaso, varie tipologie di punteggiatura e lunghezza del ciclo di coltivazione (Grassotti e Nesi, 2002).

Un ulteriore obiettivo nei programmi di miglioramento genetico è stato l'ottenimento di ibridi interspecifici, attraverso il superamento di barriere di incompatibilità pre- e post-zigotica, che siano in possesso di caratteri agronomicamente e commercialmente validi e che presentino caratteri di resistenza a stress abiotici (freddo, siccità, salinità) e biotici (funghi, batteri, virus), rinvenibili nelle diverse specie.

Per quanto riguarda l'utilizzo di tecnologie innovative riguardanti il trasferimento di geni, le piante ornamentali si trovano in una posizione favorevole visto che non sono produzioni commestibili ed inoltre sono coltivate in superfici relativamente limitate ed in ambienti chiusi (serre). Metodi di trasformazione genetica comunemente utilizzati sono quelli del trasferimento mediante *Agrobacterium (tumefaciens e rhizogenes)*, della biobalistica e della elettrotrasfezione (Griesbach, 1994), che permette di inserire DNA direttamente in meristemi di semi, bulbi.

La tecnologia del DNA ricombinante ha aperto nuove strade nel miglioramento genetico, grazie all'introduzione di fattori di resistenza ad alcune fitopatie ed alla possibilità di intervenire sul colore, sulla forma del fiore e sulla taglia della pianta.

1.5 - Aspetti economici

La floricoltura italiana è tradizionalmente penalizzata, quale comparto produttivo, dalla limitata disponibilità di materiale vegetale di provenienza nazionale, in particolare per quanto riguarda i bulbi da fiore. Ogni anno vengono importati, prevalentemente dall'Olanda, oltre seicento milioni di bulbi, con una spesa di circa cento milioni di euro e con una incidenza negativa sul bilancio import-export del settore florovivaistico (AIPH/Union Fleurs, 1998, 2005) (Tab. 1).

Tab. 1 – Importazione di bulbi da fiore in Italia nel 1997 e nel 2004 (AIPH/Union Fleurs, 1998, 2005).

Provenienza	Tonnellate (1997)	Tonnellate (2004)
OLANDA	15.846	14.679
EUROPA	16.193	14.880
MONDO	16.212	14.902

TAB. 2 - Principali bulbose da fiore reciso importate dall'Olanda in Italia (AIPH/Union Fleurs, 1998, 2005)

SPECIE	N. BULBI IMPORTATI
Tulipani	76,7 milioni
Iris	82,5 milioni
Gladioli	320,5 milioni
Lilium	559,0 milioni

Tra i bulbi maggiormente coltivati per il fiore reciso figurano *Lilium*, Tulipani, Gladioli, Fesie e Iris (Grassotti e Nesi, 2002). I *Lilium* risultano senza dubbio la specie più importante dal punto di vista economico, con bulbi che possono costare da 0,13 a 1,80 Euro e steli fioriti che sul mercato possono essere venduti da 0,25 a 2,60 Euro (Grassotti *et al.*, 2002).

Attualmente vengono coltivate in Italia diverse varietà di *Lilium* dei tre principali gruppi commerciali. Il 70% appartiene al gruppo degli “Ibridi asiatici”, il 20% al gruppo degli “Ibridi orientali”, il 10% a quelli degli “Ibridi longiflorum”.

La coltivazione del *Lilium* è particolarmente rilevante per la Campania, che nel 1987 deteneva il 10% della superficie nazionale coltivata a *Lilium*, passata nel 1994 al 32% (dati I.S.T.A.T., 1994). e nel 2001 a circa il 50%, con una produzione di 104 milioni di steli (ISMEA, 2004), di cui 18 milioni in pien'aria ed 86 milioni in serra. Le altre regioni italiane maggiormente interessate alla coltivazione del *Lilium* sono il Lazio (24 milioni di steli), la Toscana (22 milioni), la Puglia (13 milioni) e la Sicilia (10 milioni) (ISMEA, 2004).

Capitolo 2 - Il colore dei fiori

Il fenomeno della colorazione nei fiori è regolato principalmente 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 che maggiormente interessano il colore dei fiori sono: i flavonoidi, i carotenoidi, le betalanine e, in misura minore, la clorofilla. Anche i fattori ambientali come la luce, la temperatura, gli zuccheri e i metalli possono influenzare il colore (Davies e Schwinn, 1997; Griesbach, 2005).

A livello commerciale si ha l'esigenza non solo di ricercare fiori di qualità ma anche di aumentare le varietà di colori disponibili. Per alcune specie, infatti, è disponibile solo un ristretto spettro di colori dei fiori, mentre in altre specie alcuni colori sono assenti (come ad esempio il blu in rosa, garofano, *Lilium* e gerbera). Grazie all'ingegneria genetica utilizzata dai ricercatori da lungo tempo, si potrebbe ottenere l'introduzione di nuovi colori dedicando una maggiore attenzione verso queste nuove tecnologie. Questo è oggi dimostrato dalla maggiore attenzione che istituti di ricerca pubblici e molte compagnie biotecnologiche private hanno nei confronti di questo settore.

Fig 1 . Vie che portano alla formazione delle antocianine.

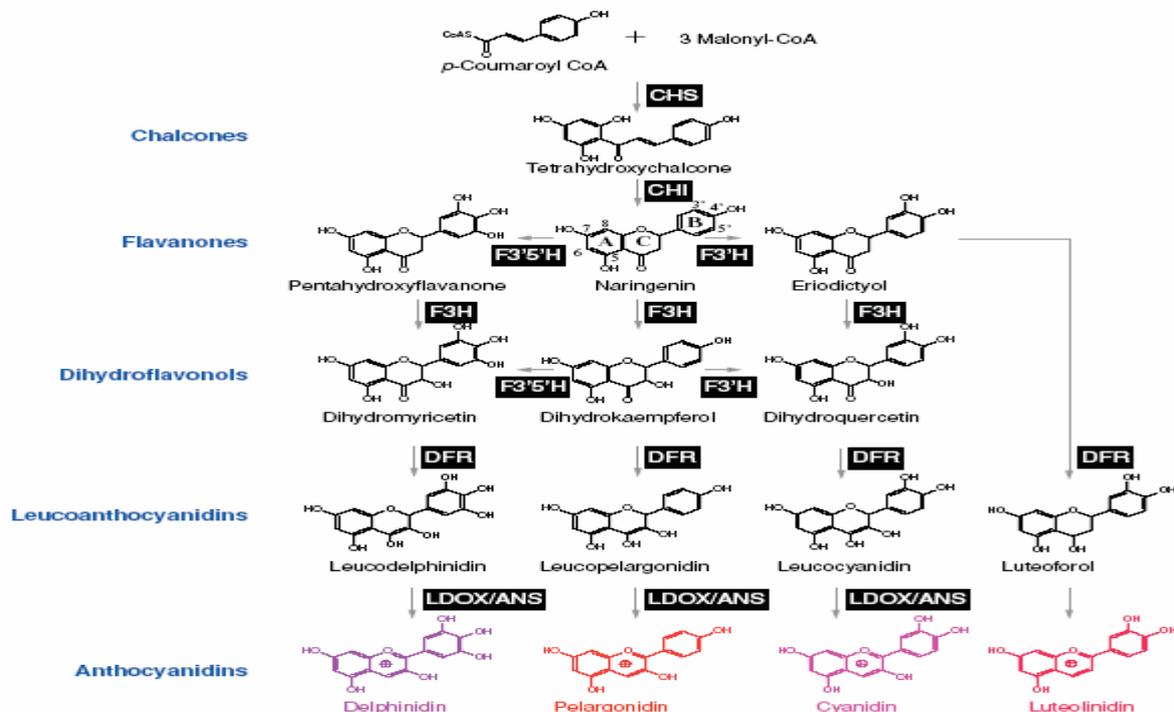


Figure 4
Schematic representation of the biosynthetic pathway of the most abundant anthocyanin pigments. The names of the compounds are indicated. The enzyme names, in black boxes, are CHS, chalcone synthase; CHI, chalcone isomerase; F3H, flavanone 3-hydroxylase; F3'H, flavanone 3'-hydroxylase; F3'5'H, flavanone 3',5'-hydroxylase; DFR, dihydroflavonol 4-reductase; LDOX/ANS, leucoanthocyanidin dioxygenase/anthocyanidin synthase. The A-, B-, and C-rings with the carbon numbers are indicated in the structure corresponding to the flavanone naringenin.

2.1 - I pigmenti

I colori dei frutti e dei fiori sono di particolare importanza nell'ecologia delle piante perché provvedono, grazie alla loro vasta gamma, di attrarre gli insetti impollinatori che permettono la diffusione delle specie anche in zone molto lontane dal luogo di origine. Come detto, sono quattro i principali pigmenti deputati a questa funzione: i flavonoidi e le betalanine, che si trovano all'interno dei vacuoli cellulari, non sono chimicamente correlati e sono mutualmente esclusivi, non essendo mai stati trovati insieme; la clorofilla ed i carotenoidi, che sono invece chimicamente correlati e localizzati all'interno dei plastidi e si trovano nel citoplasma delle cellule (Griesbach, 2005).

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 (Davies e Schwinn, 1997).

I carotenoidi, determinano le colorazioni gialle, arancio e rosse e contribuiscono ad ampliare la gamma dei colori dei flavonoidi producendo, in combinazione con questi, i colori giallo, arancio, scarlatto e marrone scuro (Davies e Schwinn, 1997).

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).

La produzione di ogni pigmento avviene indipendentemente dagli altri: infatti, in molti casi un difetto nel pathway biosintetico dei flavonoidi non ha effetti su quello dei carotenoidi e della clorofilla (Griesbach, 2005). Per 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 o un errore nel meccanismo di traslocazione (Zaiton *et al.* , 2003)

Fig 2 - Fiori di Lilium



Fig 3 - Basi chimiche del colore dei fiori nelle angiosperme (da "I composti fenolici di interesse biologico, http://members.xoom.virgilio.it/alberto_chim/Fenoli.pdf)

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

2.1.1 - I 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 e gli atomi di carbonio all'interno dello scheletro vengono originati da due distinti *pathways* (l'unità C6 deriva dall'acido cinnamico, mentre l'unità C6-C3 deriva dalla condensazione testa-coda di 3 unità di acetato (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 cinnamico, normalmente il p-cumaril-CoA, con conseguente formazione di un calcone (4,2',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 fenilpropanoidico (Salisbury e Ross, 1992).

La biosintesi dei flavonoidi, come parte del più vasto processo biosintetico dei fenil-propanoidi, è uno degli aspetti 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 (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 specificamente 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 in cui i tre anelli (uno cromonico, uno aromatico ed uno eterociclo) sono glicosilati con uno o più zuccheri (glucosio, galattosio e ramnosio) ed acilati con uno o più acidi cinnamici (acido cumarico, ferrulico, malonico o caffeico) attaccati in posizioni specifiche (Salisbury e Ross, 1992).

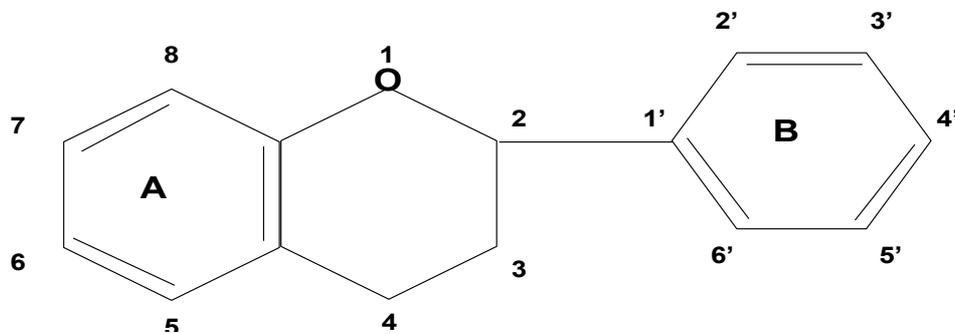
Le antocianine private dello zucchero e dei radicali acilici sono chiamate antocianidine (Griesbach, 2005). Le principali antocianidine sono sei, tre delle quali sono comunemente rintracciabili: la pelargonidina, che produce i colori arancio, rosa e rosso; la cianidina, che produce i colori rosso o malva; 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 (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 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 rapidamente 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).

Fig 4. Struttura base dei flavonoidi (da Salisbury e Ross, 1992)

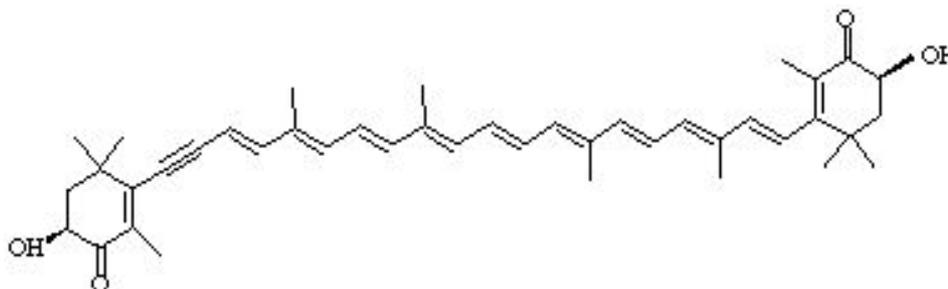


2.1.2 - I carotenoidi

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, 1977). 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)

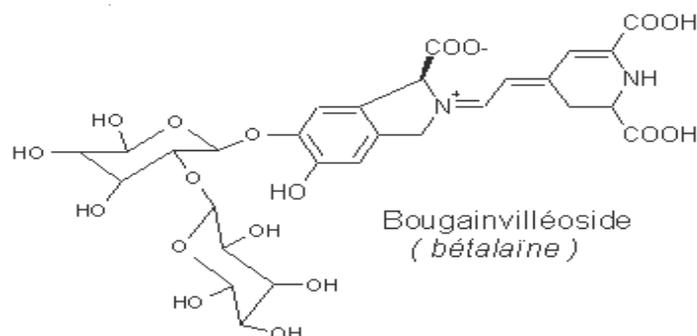
Fig 5. Struttura base dei carotenoidi (www.food-info.net/images/didehydroastaxanthin.jpg)



2.1.3 - Le betalanine

Le betalanine sono pigmenti vacuolari azotati, contengono come cromoforo l'acido betalamico, composto importante nella formazione di tutte le betalanine, con un derivato della diidrossifenilalanina (DOPA). Questa reazione porta alla formazione delle betacianine rosse e violette, che si possono trovare nelle barbabietole rosse o nel fiore di *Portulaca*. La condensazione dell'acido betalamico con un aminoacido o aminoacido derivato (es. 3- metoxytiramina) porta alla formazione delle betaxantine gialle e arancioni. Betacianine e betaxantine possono essere classificate in diverse sottoclassi, basate sulle caratteristiche chimiche dell'acido betalamico coniugato. L'utilizzo di luce, fitochimici e ormoni ha un drammatico effetto nell'accumulo di betalanine.(Grotewold, 2006) La conversione di tirosina a DOPA è portata da una tirosinasi tipo fenolossidasi, un gruppo di enzimi bifunzionali che permettono l'idrossilazione dei fenoli a o-difenoli. In aggiunta, partecipando alla formazione dell'acido betalamico, l'enzima tirosinasi ossida anche DOPA a dopaquinone, contribuendo alla biosintesi del cyclo-DOPA, che coniugato all'acido betalamico forma il cromoforo di tutte le betacianine e betanidine. 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 tiroxina, è presente in tutte le piante (Davies e Schwinn, 1997).

Fig 6. Struttura base delle betalanine (www.futura-sciences.com/.../images/betalaine.gif)



2.2 - Fattori che influenzano la pigmentazione

2.2.1 - Il 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 della cultivar a fiori rossi di *Petunia x hybrida* Vilm. dalla cianidina, e che fiori che contengono cianidina possono 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 singolo 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 di 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).

2.2.2 - La 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 calcione 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 stabilità 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.

2.2.3 - La 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: 1) una reazione mediata dai fotorecettori localizzati nei petali, come i fotorecettori UV, i criptocromi ed i fitocromi; 2) una 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 tenuti o all'oscurità, o con bassi livelli di luce (500-1000 lx), o con alti livelli di luce (5000-10000 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.

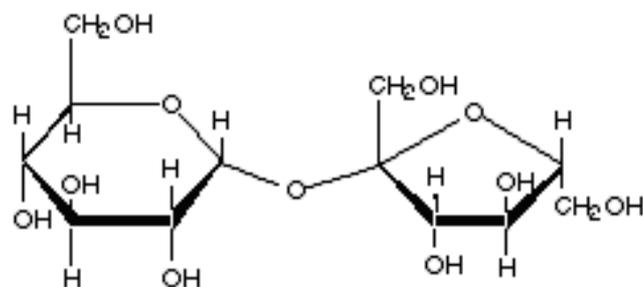
L'effetto positivo di elevati livelli di luce sul colore dei fiori è stato dimostrato anche da Black *et al.* (1991) su azalea (cv Gloria), in cui una irradiazione di $1110 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-2}$ ha determinato una maggiore intensità di colore rispetto ad irradiazioni più basse.

2.2.4 - Gli zuccheri

2.2.4.1 – Saccarosio

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).

Fig 7. Struttura base del saccarosio



Saccharose
(glucose (α 1-->2) fructose)

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'argento (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 defogliatura 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 defogliatura 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 violaccioca sono state ampiamente studiate anche da Kawabata *et al.* (2002), come già esposto nel precedente paragrafo dedicato alla luce.

2.2.4.2 - Glucosio e fruttosio

Il glucosio è un monosaccaride a sei atomi di carbonio noto anche come destrosio, è uno zucchero aldeidico estremamente importante in natura, appartenente alla famiglia degli aldosesi. È accertato che il glucosio è presente in tutti gli organismi viventi del mondo in forma libera o combinata.

Il fruttosio è un chetoesoso detto anche levulosio perché levogiro. È uno zucchero naturale che si trova in molti frutti e nel miele, nonché nel saccarosio nel quale è legato con legame glucosidico al glucosio.

Oltre ad avere l'importante funzione di fonte di carbonio e di energia negli ultimi anni sono apparsi numerosi studi sul ruolo degli esosi come molecole segnale. Gli esperimenti effettuati su lievito e su organismi unicellulari hanno messo in luce l'enorme quantità di sensori dello zucchero, che modulano nella pianta la crescita, lo sviluppo e lo stress. (Filip Rolland, et al., 2006) sia l'interazione che esiste fra gli zuccheri e gli ormoni delle piante.

L'azione degli zuccheri come molecole segnale si esprime attraverso l'attivazione e inattivazione dell'espressione di geni. L'intero profilo di trascrizione del genoma rivela che le vie biosintetiche dei flavonoidi e delle antocianine sono fortemente sovraregolate dalla concentrazione degli zuccheri. In colture in vitro di *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) è stato osservato che aumentando la concentrazione degli zuccheri le foglioline diventavano di colore rosso. Tutto questo indica la forte correlazione che esiste fra le vie biosintetiche degli antociani e la concentrazione degli zuccheri. (Solfanelli *et al.*, 2006)

Inoltre è stato visto che in colture in vitro di *Lisianthus* contenenti chitosano, diverse concentrazioni di zuccheri (fruttosio, glucosio), inducevano l'accumulo delle antocianine nei petali. (Uddin *et al.*, 2004)

2.2.5 - Elementi nutritivi

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 Szwonek 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 1000 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 1000 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 (K₂O, 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

Come già detto, l'associazione di antocianine con altri flavonoidi e composti simili (copigmentazione) offre una logica spiegazione delle numerose variazioni 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 delphinidina 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 fotosintetizzanti 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 pretrattamento con STS 4mM, sia con un trattamento in una soluzione conservante contenente AgNO₃ 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.

2.2.6 - Stimolatori della formazione di antociani

2.2.6.1 - Bion

L'Acibenzolar-s-methyl (formulato commerciale Bion, Syngenta), di formula bruta $C_8H_6N_2OS_2$, è un attivatore delle difese delle piante dagli stress biotici, indicato per la difesa delle batteriosi del nocciolo, del pomodoro e del fuoco batterico del pero. Come è noto, le piante si difendono dalle infezioni parassitarie anche grazie a un meccanismo noto come SAR (systemic activated resistance) o resistenza sistemica acquisita. In seguito ad una infezione della pianta, infatti, viene attivato un processo interno mediato dalla formazione di acido salicilico, con il quale si ottiene la sintesi di proteine attive sugli organi di penetrazione del patogeno o sull'agente patogeno medesimo (Muccinelli, 2004).

L'Acibenzolar-s-methyl non manifesta un'azione diretta sul patogeno, ma attiva i meccanismi naturali di difesa della pianta aumentandone la resistenza nei confronti di diverse malattie. In pratica, nelle piante sensibili induce la SAR sostituendosi all'acido salicilico e producendo nelle medesime le stesse modificazioni biochimiche osservate con l'attivazione biologica naturale, ma con modalità nettamente più efficienti che garantiscono una protezione superiore e più affidabile. E' dotato di proprietà sistemiche e viene assorbito velocemente dalle piante con traslocazione in senso acropeto e basipeto all'interno delle stesse (Iriti *et al.*, 2004). Per il suo particolare meccanismo d'azione il prodotto deve essere distribuito 2-3 giorni prima dell'instaurarsi dell'infezione. E' stato anche visto che in trattamenti con il Bion su uva (cv Merlot), oltre ad aumentare la resistenza della pianta, si aveva un considerevole aumento della sintesi delle antocianine, in particolare della malvidine-3-glucoside, malvidine 3-(6-O-acetyl) glucoside e malvidine 3-(6-O-p-coumaroyl) glucoside, che sono aumentate più del doppio. Questi dati sono stati ottenuti grazie all'utilizzo di un fluorimetro (RF-10Ax1 fluorimetric detector) con eccitazione a 330 nm ed emissione a 374 nm e con SPD-Avp UV detector che assorbe a 520 nm (Iriti *et al.*, 2004).

Figg.8-9. Struttura base del Bion (fig 8) e della kinetina (fig 9)

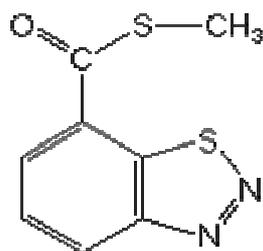
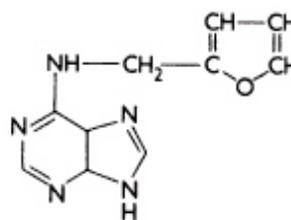


fig.8



Kinetina

fig. 9

2.2.6.2 – La kinetina

La kinetina (N^6 – furfuriladenina) è una citochinina che è stata isolata nel 1955 da DNA seminale. Il termine di “citochinine” è utilizzato in botanica per indicare genericamente molecole che influiscono sulla crescita dei vegetali, promuovendone la divisione cellulare e la differenziazione. La kinetina, in particolare, è da tempo utilizzata per ritardare l’invecchiamento delle piante, sebbene non ne allunghi la vita. Se la kinetina è applicata sulle foglie, queste non ingialliscono ma rimangono verdi, e ciò accade anche se le foglie sono state tagliate. E’ noto che in molte piante, con la progressione dell’invecchiamento, diminuiscono non solo i livelli delle citochinine ma anche la capacità di sintetizzarle. L’allungamento dei tempi di invecchiamento delle piante ad opera della kinetina è stato studiato e dimostrato, ma ciò che regola questo meccanismo d’azione non è stato ancora chiarito (Pinelli e Veraldi, 2004). Alcuni studi indicano che le citochinine proteggono gli acidi grassi poliinsaturi delle membrane cellulari dal danno ossidativo. Per quanto riguarda gli effetti biologici della kinetina sulle piante, la loro funzione si esplica sulla dominanza apicale, contrastandola, sulla senescenza ritardandola, e nel favorire l’allungamento della parte aerea rispetto a quella radicale influenzata, invece, dalle auxine nel caso di coltura in vitro (Accati E., 1986) .

Capitolo 3 – La genetica del colore dei fiori

3.1 - La 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 *Anthirrhinum*, 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).

3.2 – Miglioramento genetico mediante biotecnologie

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*, *Dendrothema*, *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 aethiopica* 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 corrispondenza 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 fiorale è stata osservata negli individui con un numero maggiore di copie geniche per genoma (Elomaa *et al.*, 1993).

Anche Deroules *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

calcone 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).

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.

PARTE SPERIMENTALE

1 - Scopo della ricerca

Il *Lilium* costituisce una delle colture più importanti sia nel mercato floricolo italiano che in quello internazionale. La sua elevata popolarità è dovuta principalmente alle sue caratteristiche ornamentali quali il colore dei fiori e delle foglie, l'altezza degli steli, la forma delle infiorescenze e l'architettura della pianta, che rendono il *Lilium* una delle colture più apprezzate e conosciute in tutto il mondo.

Spesso accade che la qualità della pianta sia influenzata dalla stagione di coltivazione, derivando una peggiore qualità per le coltivazioni autunnali e invernali rispetto a quelle estive, riconoscibile dal precoce appassimento e abscissione dei tepali, dall'ingiallimento fogliare causato in molti casi dalle condizioni di oscurità e di basse temperature, dall'aborto o incompleta apertura dei fiori apicali, e dalla diminuzione di brillantezza e attenuazione dell'intensità del colore dei tepali, dovuta ad una minore radiazione solare. Questo fenomeno è più evidente nei fiori di *Lilium* con tonalità rosse, rosa e arancio ed è prevalentemente dovuto ad una ridotta sintesi di antociani.

La biosintesi di antociani è indotta come già detto da diversi fattori, quali ad esempio l'elevata escursione termica giornaliera o la stessa radiazione solare. Per riuscire ad aumentare la biosintesi di antociani nei prodotti vegetali si possono usare diverse strategie, generalmente impiegate per migliorare l'aspetto di prodotti orto-frutticoli; buoni risultati sono stati ottenuti su melanzana, melone, pomodoro e mele con la somministrazione di solfato potassico per via fogliare, quando le basse escursioni termiche determinano una scarsa colorazione dei frutti. Le concimazioni a base di azoto e potassio hanno portato un effetto positivo su diverse cultivars di piante da fiore, tra cui il gladiolo (Accati et al., 1994; DeVecchi e Barni, 1997).

Tra i vari trattamenti possibili per il miglioramento dell'apertura dei fiori e il prolungamento della durata in vaso di molte specie è noto l'utilizzo degli zuccheri (in particolare del saccarosio) nell'acqua di conservazione; in alcuni casi un ulteriore effetto positivo osservato è stato l'aumento della concentrazione delle antocianine nei petali, e quindi la comparsa di colorazioni a tinte più forti. Recentemente sono apparsi dei risultati interessanti sull'aumento della concentrazione delle antocianine in uva (cv Merlot) trattata con un nuovo prodotto acibenzolar-s-methyl (Bion) (Iriti et al., 2004). Altri studi effettuati su kintina invece hanno permesso di evidenziare un rallentamento dell'invecchiamento della pianta, favorendo un allungamento della parte aerea rispetto a quella radicale (Accati, 1986)

Alla luce di tutte queste conoscenze, presso il C.R.A.-Istituto Sperimentale per la Floricoltura di Pescia (CRA-ISF) e l'azienda Campetti sono state condotte prove sperimentali sul *Lilium* cresciuto in stagione sfavorevole (autunno/invernale) al fine di migliorare la colorazione dei fiori, valutarne la longevità degli steli e analizzare la percentuale di aborti su piante trattate e non trattate.

Una nuova metodologia è stata adottata per la misurazione dei parametri relativi al colore, che ha previsto l'impiego di spettrocolorimetro impiegato in altri processi industriali.

L'utilizzo di questa tecnica consente di ridurre i tempi di misurazione del colore con risposte immediate e molto accurate.

2 - Materiali e metodi

2.1 - Materiale vegetale

Sono state utilizzate 4 cultivars di *Lilium* i cui bulbi, provenienti dall'Olanda, sono stati forniti dall'azienda Campetti, di Campetti Brunello, localizzata in Pescia:

L1: cv Fangio, con fiori di colore Fucsia, diametro dei bulbi 20/22 cm

L2: cv Tresor, con fiori di colore Arancio, diametro bulbi 16/18 cm

L3: cv Menorca, con fiori di colore Salmone, diametro bulbi 18/20 cm

L4: cv Cavalese, con fiori di colore Bianco/rosa, diametro bulbi 18/20 cm

Le prove sono state effettuate in due località: presso l'Azienda Sperimentale del CRA-ISF di Pescia (fig.10) e presso una Azienda tradizionale della zona (la stessa azienda Campetti, fig.11)



fig.10



fig.11

2.2 – Epoche e densità d'impianto, trattamenti culturali

L'impianto delle colture è stato effettuato alle seguenti date:

Azienda Campetti: 3 ottobre 2006 per le cv. Fangio - Cavalese

2 ottobre 2006 per la cv Menorca.

4 ottobre 2006 per la cv Tresor

Azienda CRA-ISF: 5 ottobre 2006 per le cv Fangio - Menorca - Tresor

11 ottobre 2006 per la cv Cavalese

Presso il CRA-ISF, sono stati piantati 25 bulbi in ciascuna parcella sperimentale (5 parcelle per cultivar, vedi oltre), mentre presso l'azienda Campetti, all'interno di ogni settore dell'azienda coltivato con una singola cultivar, sono state delimitate 5 parcelle, di circa 100 piante ciascuna, soggette a diversi trattamenti (vedi oltre).

La densità di piantagione dei bulbi presso l'azienda CRA-ISF è stata di circa 15 bulbi/mq, con bulbi posti a circa 3-5 cm l'uno dall'altro e ad una profondità di circa 10-15 cm. Presso l'azienda Campetti, invece, la densità è stata di circa 50 bulbi/mq, con bulbi posti ad 1-2 cm l'uno dall'altro.

Le prime piante al CRA-ISF sono emerse l'11 ottobre 2006 (cv. Fangio e Tresor), il 13 ottobre (cv. Menorca) e il 18 ottobre (cv. Cavalese), mentre all'azienda Campetti tutte le varietà sono emerse intorno al 10 ottobre 2006.

Nell'azienda CRA-ISF non sono state effettuate concimazioni perché il terreno era stato concimato nella coltivazione precedente di *Limonium* (che generalmente non asporta molti sali). La conducibilità nel terreno, ottenuta dall'estratto acquoso dello stesso, era risultata di 2200 mS/cm all'inizio della coltura, ed è scesa poi a 2000 mS/cm in seguito ad irrigazione. E' stato fatto un solo trattamento antiparassitario contro *Botrytis* e lepidotteri.

Nell'azienda Campetti, in cui il terreno presentava una conducibilità di 1600 mS/cm (standard), è stata effettuata una concimazione iniziale con guano di pesce 400g/m² e una successiva fertirrigazione completa con tutti gli elementi minerali (nitrato di potassio 1,5 Kg/l, nitrato di ammonio 0,5 Kg/l, solfato di magnesio 0,5 Kg/l, nitrato di calcio 1 Kg/l).

I trattamenti antiparassitari sono stati effettuati 1 volta ogni 15 giorni contro *Botrytis*, *Pithyum* e afidi.

2.3 - Trattamenti effettuati sugli steli ai fini della valutazione della longevità

La longevità degli steli si è intesa come numero di giorni intercorsi tra lo stadio in cui si registrava il primo fiore aperto e lo stadio in cui si registrava il 50% di fiori senescenti.

Presso l'azienda CRA-ISF sono stati effettuati i seguenti trattamenti:

- steli fiorali lasciati attaccati alla pianta;

- steli fiorali recisi all'apertura del primo fiore e posti direttamente in acqua nello stesso ambiente di coltivazione;

Per quanto riguarda l'azienda Campetti, invece, tutti gli steli oggetto di valutazione sono stati recisi all'apertura del primo fiore e portati presso le serre del CRA-ISF per l'effettuazione dei rilievi.

2.4 Trattamenti per il miglioramento del colore dei tepali

I trattamenti fogliari sono stati effettuati sulla parte vegetativa all'incirca 1 mese prima della data presunta di raccolta e sono stati ripetuti 3 volte presso il CRA-ISF (17.11, 1.12 e 19.12) e 2 volte presso l'azienda Campetti (1.12 e 19.12). Nella soluzione di tutti i trattamenti (ed anche nell'acqua pura del testimone) è stato aggiunto bagnante Agral 0.3 cc/l, al fine di rendere più omogenea la diffusione della soluzione sulla lamina fogliare.

Le tesi presso il CRA-ISF sono state:

- A Solfato potassico (51% K_2O): 2g/l
- B kinetina (Kin): 0,1 g/l sciolta in HCL 3% a ph 6
- C Zucchero: Saccarosio (Sacc) 1g/l
- D Bion : 50 mg/l
- E Zucchero: Glucosio (Glu) 1 g/l + Fruttosio (Fru) 1 g/l

Dei 25 steli di ciascuna parcella, i primi 8 steli sono stati utilizzati come controllo non trattato, mentre dal 9° stelo in poi è stato effettuato il trattamento fogliare schermando opportunamente con un telo di plastica gli steli di controllo (fig.12). Oltre al confronto visivo (fig.13), effettuato in ogni parcella tra il trattato ed il controllo, è stato effettuato anche un rilievo oggettivo delle caratteristiche colorimetriche sui fiori di 5 steli trattati e di 2 steli di controllo per ogni parcella (vedi oltre).



fig.12



fig.13

Le tesi presso l'azienda Campetti sono state:

- A Solfato potassico (51% K₂O): 2g/l
- B kinetina (Kin): 0,1 g/l sciolta in HCL 3% a ph 6
- E Zuccheri: Glucosio (Glu) 1 g/l + Fruttosio (Fru) 1 g/l
- ABE miscela dei tre trattamenti

Per ogni varietà sono stati valutati 5 steli per ognuno dei trattamenti e 5 steli di controllo (non trattati).

2.5 - Rilievi sulla longevità delle infiorescenze, sulle dimensioni dei bocci e sugli aborti fiorali

Presso il CRA-ISF, su ogni stelo fiorale di ogni trattamento e per ogni varietà è stato rilevato il giorno di apertura del 1° fiore.

Di seguito, 5-6 steli sono stati recisi e messi in vaso mentre 5-6 steli sono stati lasciati sulla pianta al fine di valutare la durata in vaso degli steli (data in cui si ha il 50% di fiori senescenti – data di apertura del 1° fiore) e la % di fiori abortiti (rapporto tra il n. di bocci non aperti o aperti incompletamente ed il n. di bocci totale). Per i testimoni, sono stati effettuati rilievi su 4 steli fiorali (2 recisi e 2 sulla pianta) per ogni parcella.

Presso l'azienda Campetti, su ogni stelo fiorale di ogni trattamento e per ogni varietà (5 steli per tesi) è stato rilevato il giorno di apertura del 1° fiore e la lunghezza dei primi 3 bocci fiorali. Ogni stelo è stato reciso e trasferito presso le serre del CRA-ISF dove è stata valutata la durata in vaso dello stelo e la % di fiori abortiti o incompletamente aperti.

2.6 – Rilievi sul colore

Presso il CRA-ISF, per ogni trattamento e per ogni varietà si sono effettuati i rilievi colorimetrici sui primi due fiori di ogni stelo che si aprivano, effettuando il rilievo in 2 punti centrali di ognuno dei 3 tepali esterni e dei 3 tepali interni, evitando venature e punteggiature. In pratica, per ogni trattamento e per ogni varietà si sono rilevati 120 dati (5 steli x 2 fiori/stelo x 6 tepali/fiore x 2 punti/tepalo).

Per ogni testimone, sono stati effettuati rilievi su 2 steli fiorali, per un totale di 48 rilievi (2 steli x 2 fiori/stelo x 6 tepali/fiore x 2 punti/tepalo).

Presso l'azienda Campetti, per ogni trattamento e per ogni varietà si sono effettuati i rilievi su 5 steli, per un totale di 180 rilievi (5 steli x 3 fiori/stelo x 6 tepali/fiore x 2 punti/tepalo), evitando sempre le venature e le punteggiature in ogni tepalo.

2.7 - Spettrocolorimetro

Le misurazioni dei parametri relative al colore sono state effettuate impiegando uno spettrocolorimetro, mod. SP64 della Xrite concepito per fornire misure di colore su una vasta gamma di materiali. Fornisce misure assolute e differenziali per diversi sistemi colorimetrici (CIE Yxy, CIE LAB, Hunter LAB, CIE LCH). L'area di misura è facilmente intercambiabile tra 4 mm o 8 mm attraverso uno switch manuale. Lo strumento riesce in maniera automatica a riconoscere l'apertura selezionata e automaticamente adatta i dati di calibrazione, rendendo in questo modo l'operazione rapida e sicura. Lo spettrocolorimetro Xrite SP64 (fig.14-15) nasce essenzialmente per misure di colore. Tali misure sono calcolate a partire dallo spettro acquisito in riflettanza nella banda del visibile (400-700 nm) con intervallo di 10 nm. Il suo software consente per ogni campione di ottenere i valori spettrali oltre a quelli colorimetrici.



fig.14



fig.15

L'apparecchio permette di calcolare i valori delle 3 coordinate standard CIE :

L* : rappresenta la luminosità, può assumere valori da 0 (luminosità minima) a 100 (luminosità massima);

a* : esprime il rosso quando è positiva e il verde quando è negativa , può assumere valori che vanno da più infinito a meno infinito;

b* : esprime il giallo quando è positiva e il blu quando è negativa, può assumere valori che vanno da più infinito a meno infinito.

Da questi valori si è calcolato il ΔE , inteso come $\Delta E^* = (\text{radq}(\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2}))$, in cui ΔL^* , Δa^* e Δb^* sono le differenze di letture tra il testimone ed il trattato.

Per $L^*=0$ e $L^*=100$, a^* e b^* possono assumere solo il valore zero. Infatti i punti di coordinate $(0,0,0)$ e $(100,0,0)$ sono rispettivamente il nero e il bianco.

La fig.16 mostra una possibile rappresentazione dello spazio CIELab

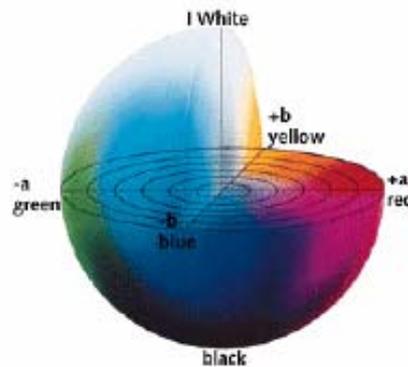


fig.16

In realtà lo spazio CIELab non è una sfera limitata come è stato rappresentato in figura, ma si estende all'infinito sia lungo l'asse **a** che lungo l'asse **b**.

Se immaginiamo di tagliare lo spazio CIELab perpendicolarmente all'asse **L** in corrispondenza del valore $L=50$ otteniamo una proiezione del modello Lab sul piano $L=50$ che rappresenta tutti i colori visibili alla stessa luminosità (50). Il centro del cerchio corrisponde a un grigio esattamente a metà strada tra il bianco ($L=100$) e il nero ($L=0$). La fig.17 mostra tale proiezione.

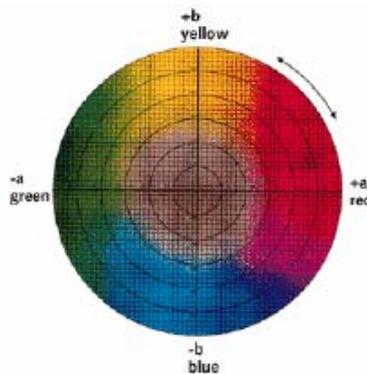


fig.17

2.8 – Elaborazione dei dati

I valori medi per ogni trattamento, relativamente ai caratteri “longevità degli steli” e “lunghezza dei bocci fiorali”, sono stati confrontati tra di loro mediante la Deviazione Standard. I valori delle coordinate colorimetriche L^* , a^* e b^* sono invece stati sottoposti ad analisi della varianza (ANOVA), i confronti multipli tra i trattamenti sono stati analizzati mediante il test SNK (Student-Newmann-Keuls).

3 - RISULTATI

3.1-Analisi effettuate sugli steli

LA coltivazione del *lilium* in periodo autunno/invernale è stata analizzata prendendo in considerazione diversi parametri e intervenendo su molteplici fattori al fine di migliorare l'aspetto qualitativo e quantitativo della produzione. Gli esperimenti sono stati eseguiti su due aziende separate: presso il Consiglio per la ricerca e la sperimentazione in agricoltura - Istituto sperimentale per la Floricoltura (CRA_ISF) di Pescia e l'azienda privata Campetti di Pescia, aziende che hanno caratteristiche podologiche diverse.

Il primo dato sperimentale analizzato è stato il periodo di fioritura (tabella 3), in cui è emerso che le stesse cultivars hanno avuto periodi di fioritura diversi nei due campi sperimentali.

Questo fatto risulta evidente soprattutto per la cultivar L2 (Tresor) che al CRA-ISF è fiorita per prima mentre all'azienda Campetti per ultima. Un secondo parametro analizzato è stato il numero dei bocci fiorali; tendenzialmente nell'azienda Campetti gli steli hanno presentato un numero di bocci fiorali leggermente maggiore rispetto a quelli prodotti al CRA-ISF (tab.4).

Tab.3. Date di inizio fioritura delle diverse cultivar

CULTIVAR	CRA-ISF	CAMPETTI
L1	27 dic.	10 genn.
L2	17 dic.	17 genn.
L3	2 genn.	16 genn.
L4	9 genn.	16 genn.

Tab.4. Numero di bocci fiorali nelle diverse cultivar

CULTIVAR	CRA-ISF	CAMPETTI
L1	7,54	7,60
L2	5,62	6,04
L3	5,77	6,52
L4	6,16	6,80

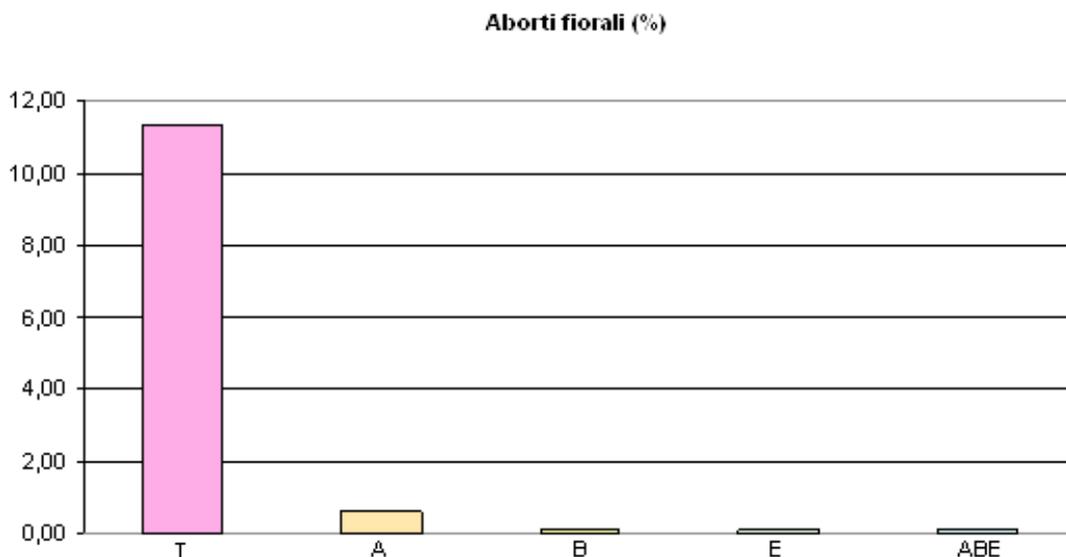
Sugli steli trattati, in entrambe le aziende, è stata riscontrata una riduzione significativa degli aborti fiorali rispetto agli steli non trattati.

In particolare, dal grafico in fig.18, si nota che sui non trattati la percentuale di aborti è risultata dell'11,34%, mentre negli steli trattati è stata quasi nulla (soltanto nella tesi A si è avuto uno 0,63% di fiori abortiti). Relativamente alle singole cultivar, le cv L2 ed L3 hanno presentato una elevata incidenza di aborti fiorali (rispettivamente 16,67% e 18,18%), mentre nelle cv L1 ed L4 la % è stata più bassa (rispettivamente 4,88% e 5,41%)

Dal grafico in fig.19, si evidenzia che anche in questo caso sugli steli trattati si è avuta una totale riduzione della percentuale di fiori abortiti rispetto agli steli non trattati nella media delle 4 cultivar. Inoltre, si è registrata una lieve diminuzione degli aborti negli steli lasciati attaccati alla pianta rispetto agli steli recisi. Questo dato confermerebbe quello che era già stato visto in prove precedenti (Burchi *et al.*, 2005).

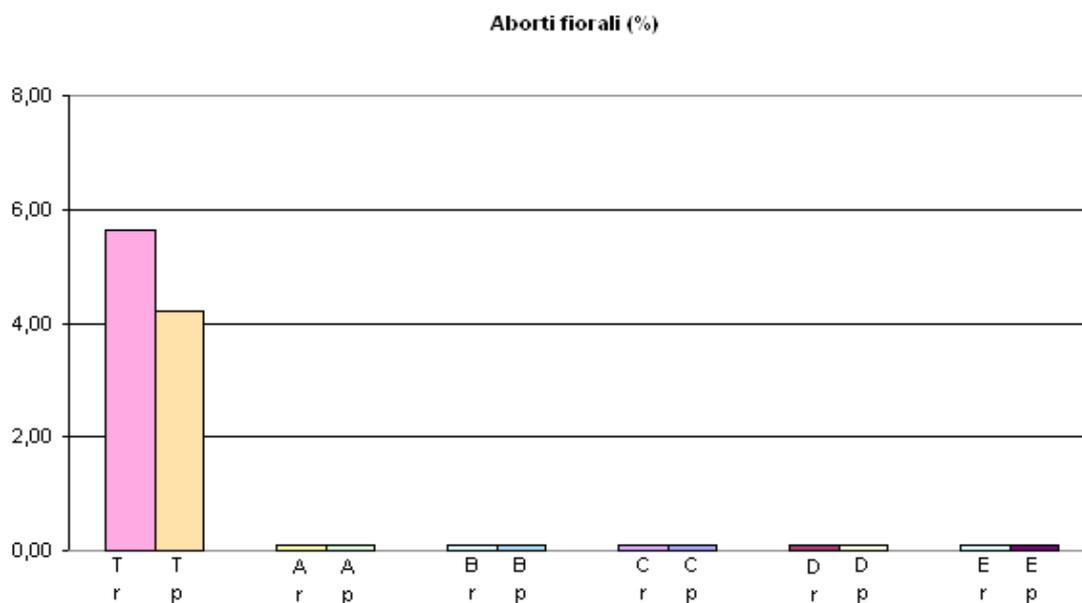
Relativamente alle singole cultivar, nella cv L4 è stata riscontrata la maggiore % di fiori abortiti (rispettivamente 11,19% nei fiori lasciati sulla pianta e 15,74% nei fiori recisi), mentre % più basse (tra il 2 ed il 3%) sono state riscontrate nelle altre 3 cultivars.

Fig.18. Percentuale di aborti fiorali nella media delle cultivar presso l'Azienda Campetti



Legenda: T = testimone; A = solfato potassico; B = kintina; E = glucosio+fruttosio; ABE= miscela dei tre trattamenti

Fig.19. Percentuale di aborti fiorali nella media delle cultivar presso il CRA-ISF



Legenda: T = testimone; A = solfato potassico; B = kintina; C = saccarosio; D = bion ; E = glucosio+fruttosio; r = fiori recisi; p = fiori lasciati sulla pianta.

Un ulteriore parametro considerato è stato la longevità dei fiori.

Dal grafico in (fig.20) si nota che, tendenzialmente, si è verificato un aumento della longevità negli steli trattati (A-B-E-ABE) rispetto al controllo, anche se nella media di tutte le cultivar questo aumento non è risultato statisticamente significativo.

Considerando le singole cultivar, in L2 (Tresor) tutti i trattamenti hanno determinato differenze significative (fig.21), mentre nella varietà L3 (Menorca) solo lo zucchero ha consentito un aumento significativo della longevità (fig.22).

Fig.20. Longevità media degli steli (gg) nella media delle cultivar presso l'Azienda Campetti.

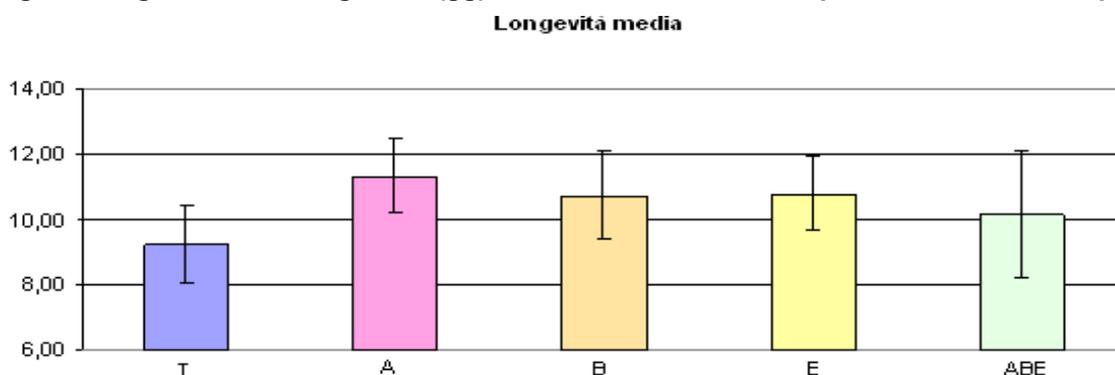


Fig.21. Longevità media degli steli (gg) nella cultivar L2 (Tresor) presso l'Azienda Campetti.

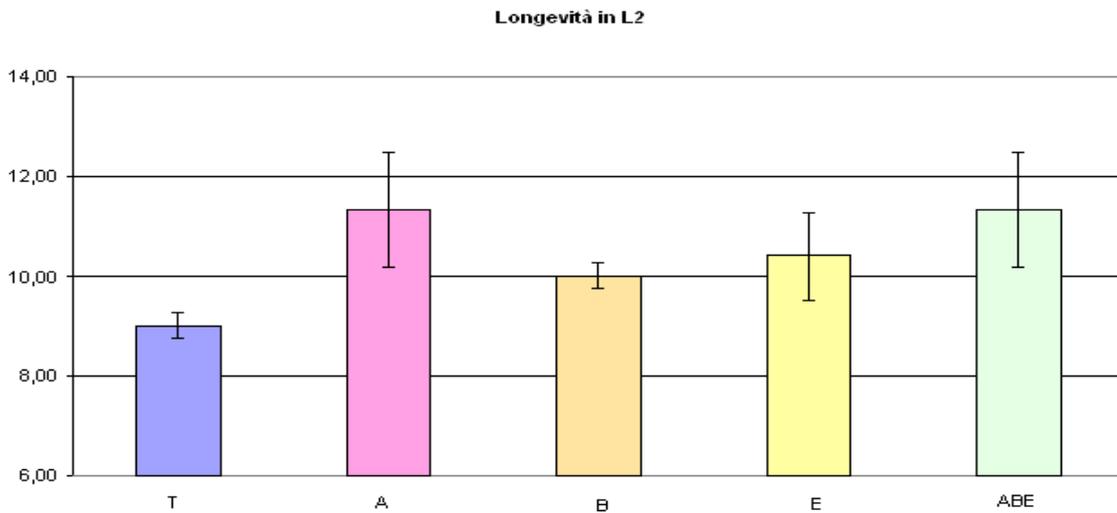
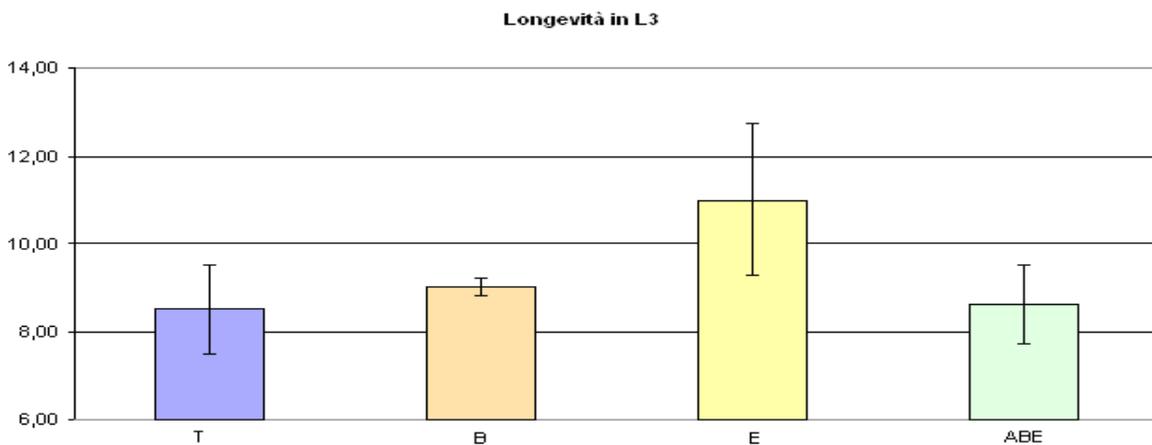


Fig.22. Longevità media degli steli (gg) nella cultivar L3 (Menorca) presso l'Azienda Campetti.



Tra i trattamenti non si è riscontrata alcuna differenza di longevità rispetto al testimone non trattato, nella media delle cultivar. Infatti, in (tab.5) è stato riportato, per ogni cultivar, il rapporto tra la longevità degli steli trattati e la longevità dei rispettivi testimoni, sia per gli steli recisi che per quelli lasciati sulla pianta da cui risulta evidente che tutti i rapporti sono intorno al valore di 1.

La durata in vaso degli steli non trattati recisi e di quelli lasciati su pianta è risultata non statisticamente differente (tab.6), come già riscontrato in prove precedenti (Burchi *et. al*, 2005).

Tab 5. Rapporto fra la longevità degli steli trattati (A, B, C, D, E) e quella dei rispettivi controlli (TA, TB, TC, TD, TE) nella media delle cultivar

TRATTAMENTI	STELI RECISI (R) O LASCIATI SU PIANTA (P)	RAPPORTO LONGEVITA' TRATTATO/CONTROLLO
A/TA	R	0,95
	P	1,04
B/TB	R	0,99
	P	1,07
C/TC	R	0,99
	P	1,07
D/TD	R	0,97
	P	0,96
E/TE	R	1,02
	P	0,99

Tab.6. Durata media degli steli non trattati recisi o lasciati su pianta

TRATTAMENTI	MEDIA	D.S.
Steli Recisi	13,00	2,61
Steli su Pianta	12,64	2,74

3.2 - Dimensioni dei bocci fiorali

- Azienda Campetti

Analizzando i risultati ottenuti (fig.23), si può notare come si sia verificato un aumento della lunghezza dei primi tre bocci fiorali degli steli trattati in tutte e 4 le cultivar rispetto ai testimoni non trattati. Questo aumento è evidente nel 1°, nel 2° e nel 3° boccio fiorale, anche se nella media di tutte le cultivar questo effetto non è risultato sempre statisticamente significativo.

Analizzando l'effetto dei trattamenti sulle singole cultivar, nella cv L1 sul 1° boccio fiorale la tesi A e il Mix hanno determinato un incremento significativo della lunghezza (fig.24)

In L2 la tesi A ha determinato un aumento significativo della lunghezza in tutti e 3 bocci fiorali, il Mix sul 1° e sul 3°, mentre tutti i trattamenti hanno determinato un aumento significativo della lunghezza del 3° boccio fiorale (fig.25).

In L3 la tesi A ha incrementato significativamente le dimensioni del 1° e 2° boccio florale, la tesi B soltanto del 1°, il Mix del 3°, mentre la tesi E di tutti e tre bocci fiorali.(fig.26)

In L4 le tesi A e B hanno incrementato significativamente le dimensioni del 1° boccio florale, mentre le tesi B, E e Mix del 3° boccio florale (fig.27).

Fig.23. Lunghezza dei primi 3 bocci fiorali nella media delle 4 cultivar

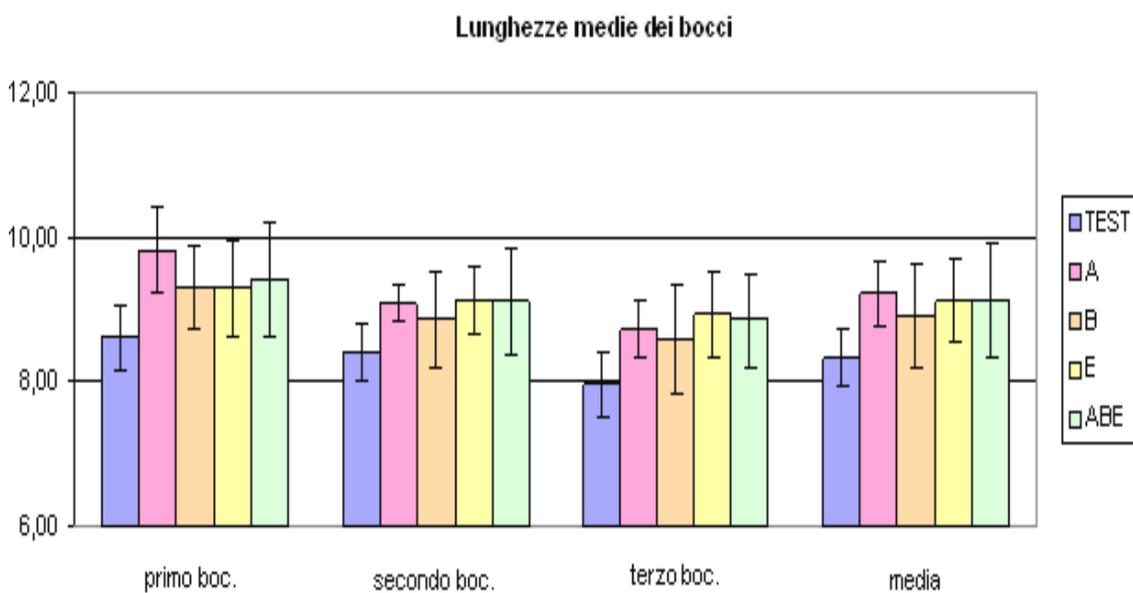


Fig.24. Lunghezza dei bocci fiorali in L1 (Fangio)

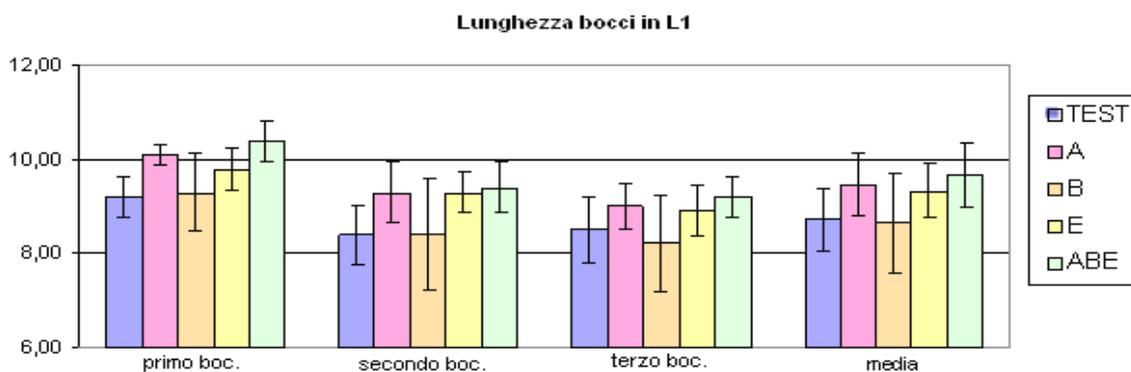


Fig.25. Lunghezza dei bocci fiorali in L2 (Tresor)

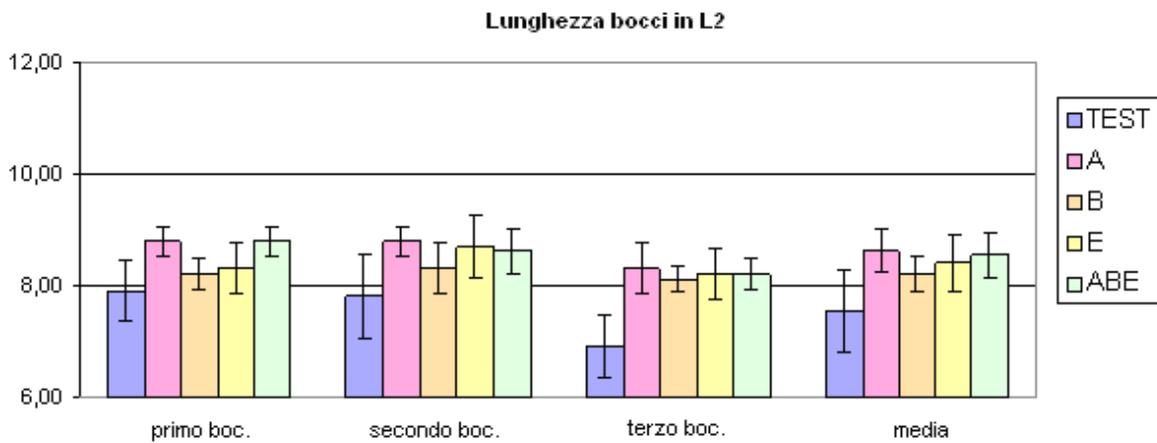


Fig.26. Lunghezza dei bocci fiorali in L3 (Menorca)

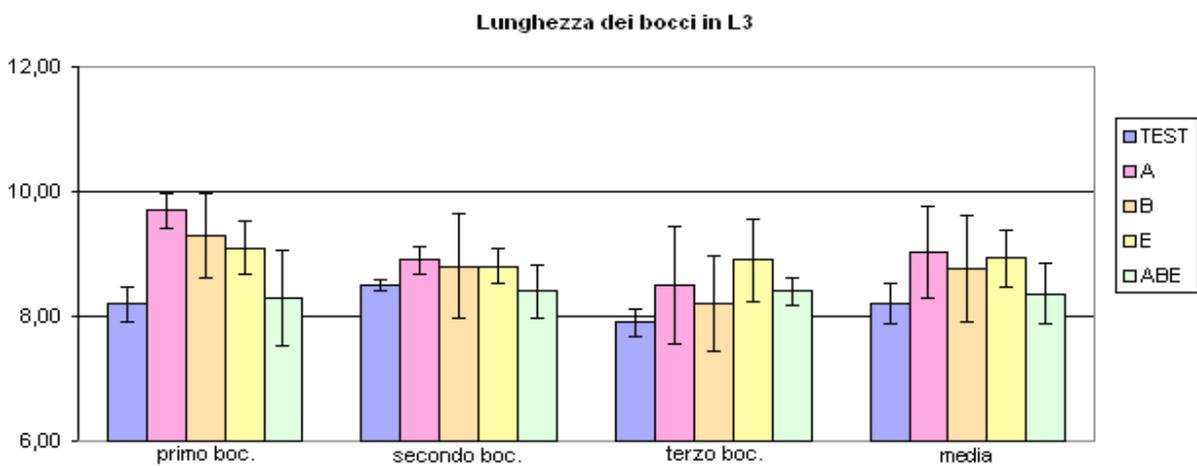
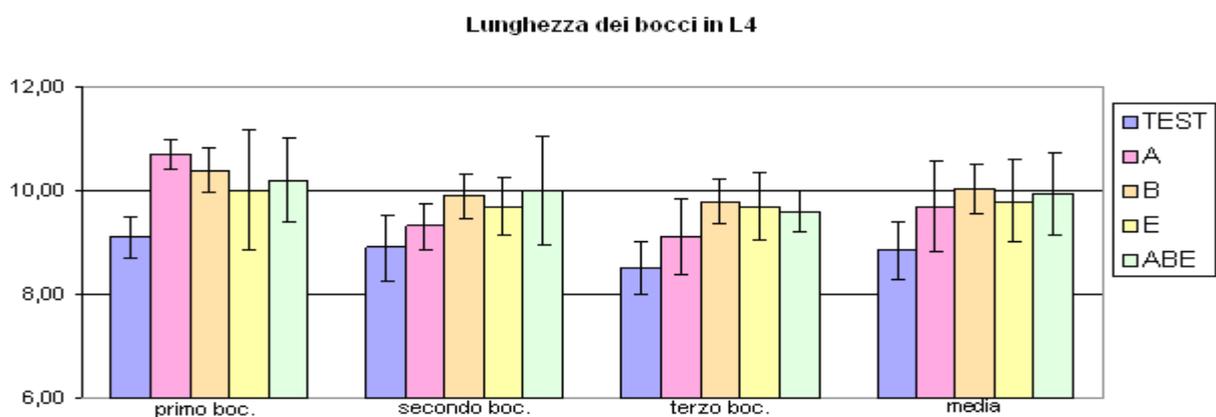


Fig.27. Lunghezza dei bocci in L4 (Cavalese)



3.3 - Miglioramento del colore dei tepali con somministrazione di prodotti

Al fine di migliorare la colorazione dei tepali in periodo di coltivazione piuttosto sfavorevole sono stati effettuati diversi trattamenti nelle due aziende. Sulla base dei dati noti in letteratura sono stati impiegate diverse sostanze, che su diverse piante hanno portato ad un miglioramento della colorazione. Una utilizzando dei prodotti che sono noti influenzare la colorazione (mettere bibliografia).

I trattamenti sono stati diversi per le due aziende e vengono quindi separati i risultati ottenuti.

- Azienda Campetti

I trattamenti effettuati (A-B-E-ABE) hanno permesso di evidenziare un miglioramento del colore dei tepali, visibile già ad occhio nudo, principalmente nelle cultivars L1 (fucsia) e L4 (bianco/rosa). Nella cultivar L2 (arancio) invece non c'è stato un miglioramento del colore visivamente apprezzabile, mentre nella varietà L3 (crema) l'unico trattamento che ha evidenziato dei miglioramenti percepibili, per quanto riguarda l'accentuazione della colorazione dei tepali, è stato quello fatto con la kinetina.

Cultivar Fangio (L1):



Fig. 28. cultivar Fangio (tesi A vs test)



Fig. 29. cultivar Fangio (tesi B vs test)



Fig. 30. cultivar Fangio (tesi E vs test)



Fig. 31. cultivar Fangio (tesi ABE vs test)



Fig. 32 particolare petali cultivar Fangio (tesi B vs test)

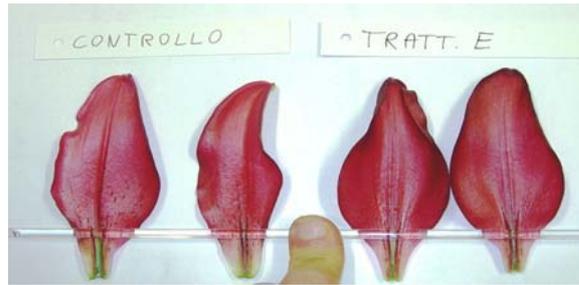


Fig 33 particolare petali cultivar Fangio (tesi E vs test)

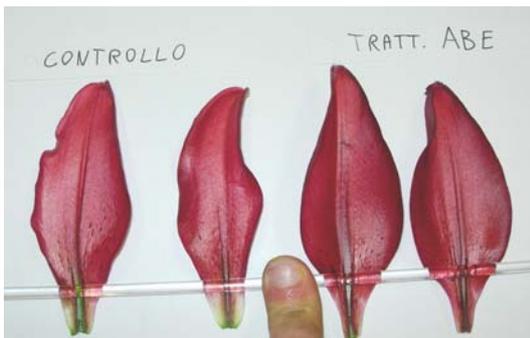


Fig 34. particolare petali cultivar Fangio (tesi ABE vs test)

Cultivar Cavalese (L4):



Fig 35. cultivar Cavalese (tesi A vs test)



Fig 36. cultivar Cavalese (tesi B vs test)



Fig 37. cultivar Cavalese (tesi E vs test)



Fig 38 cultivar Cavalese (tesi ABE vs test)



Fig 39. panoramica di tutti i trattamenti messi a confronto con il testimone



Fig 40. particolare petali cultivar Cavalese (tesi A vs test)

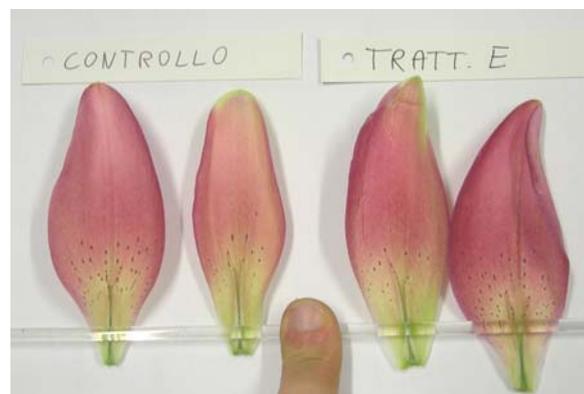


Fig 41. particolare petali cultivar Cavalese (tesi E vs test)

Cultivar Menorca (L4):



Fig.42 cultivar Menorca (tesi B vs test)

- CRA-ISF

Anche i risultati ottenuti al CRA-ISF hanno confermato che ad occhio nudo si possono apprezzare delle variazioni di colore. In particolare, una evidente accentuazione del colore si è avuta nelle cultivars L4 (Cavalese) e L3 (Menorca) con i trattamenti a base di kinetina o ed anche con il Bion (non utilizzato dal Campetti).

Cultivar Cavalese (L4):



Fig 43. cultivar Cavalese (tesi D vs test)



Fig 44 cultivar Cavalese (tesi B vs test)

Cultivar Menorca:



Fig 45 cultivar Menorca (tesi B vs test)



Fig 46 cultivar Menorca (tesi B vs test)

3.4 - Analisi dei dati ottenuti dallo spettrocolorimetro

- Azienda Campetti

Lo spettrocolorimetro rappresenta una nuova metodologia per la valutazione del colore in floricoltura, ed è stata messa a punto con questa tesi. Infatti mediante questo strumento è stato possibile verificare quale parametro di colore fosse influenzato da trattamenti specifici, cioè L^* , a^* e b^* e l'indice ΔE , questi parametri esprimono rispettivamente: la luminosità, l'andamento dal verde al rosso, l'andamento dal giallo al blu e infine $\Delta E^* = (\text{radq}(\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2}))$.

L'utilizzo dello spettrocolorimetro ha permesso di evidenziare anche differenze di colore minime, non percepibili ad occhio nudo, e di confermare i risultati già visibili nelle foto precedenti.

Tendenzialmente, tutti i trattamenti hanno determinato un aumento dell'intensità del colore dei tepali nelle cv L1 (tab.7) ed L4 (tab.8), come era stato percepito anche ad occhio nudo, in seguito a variazioni dei valori di L^* , a^* e b^* .

Nella cv L1 (tab.7), in particolare, L^* tende a diminuire in seguito ai trattamenti, con una percezione più scura dell'immagine, a^* rimane uguale, mentre b^* tende ad aumentare in seguito ai trattamenti, andando dalle tonalità blu verso il giallo. Considerando l'indice ΔE del 1° fiore, del 2° fiore, del 3° fiore e della media dei primi tre fiori, si vede che nel 1° fiore ΔE varia da 3,10 (tratt.E) a 5,01 (tratt.A), nel 2° fiore varia da 2,48 (tratt.E) a 4,25 (tratt.B), nel 3° fiore varia da 3,51 (tratt.A) a 4,25 (tratt.B) mentre nella media dei primi 3 fiori il ΔE varia da 2,81 (tratt.E) a 3,92 (tratt.B).

Nella cv L4 (tab.8), il ΔE medio dei tre fiori è risultato compreso tra 2,64 (tratt.E) e 3,12 (tratt.B). Tuttavia queste variazioni di colore sono risultate dovute a diverse variazioni dei tre parametri a seconda del trattamento effettuato. Infatti, nel trattamento B il valore di L^* è risultato più elevato, avvicinandosi al valore del testimone (55,79 contro 55,97), mentre il valore di b^* è risultato di gran lunga il più basso in assoluto (3,21) rispetto sia al testimone (5,70) che agli altri trattamenti (6,00 e 5,46). Gli altri due trattamenti (A ed E), invece, si diversificano dal testimone solo per un aumento del valore di A (rispettivamente 30,19 e 30,04 rispetto a 28,08 del controllo).

Relativamente alle altre due cultivars, L2 (tab.9) e L3 (tab.10), Lo strumento ha permesso di confermare, come si era già visto ad occhio nudo, che i trattamenti hanno determinato variazioni di colore molto lievi e non percepibili ad occhio nudo.

Tab 7. Valori medi di L*, a*, b* e di ΔE^* (Trattamento vs Testimone) per differenti trattamenti sulla cv Fangio relativamente ai primi tre fiori per stelo (i valori che non presentano lettere uguali sono significativamente diversi per $P \leq 0,05$ – Test SNK)

TRATTAMENTO	L*	a*	b*	ΔE^* (1° fiore)	ΔE^* (2° fiore)	ΔE^* (3° fiore)	ΔE^* (media)
A	39,06 bc	31,98 a	6,55 a	5,01	3,24	3,51	3,54
B	38,76 c	32,01 a	6,85 a	3,51	4,26	4,25	3,92
E	39,85 b	32,37 a	6,58 a	3,10	2,48	3,71	2,81
ABE	39,18 bc	32,05 a	6,44 a	3,33	3,45	3,87	3,38
TEST	42,39 a	32,26 a	5,40 b	-	-	-	-

Tab 8. Valori medi di L*, a*, b* e di ΔE^* (Trattamento vs Testimone) per differenti trattamenti sulla cv Cavalese relativamente ai primi tre fiori per stelo (i valori che non presentano lettere uguali sono significativamente diversi per $P \leq 0,05$ – Test SNK)

TRATTAMENTO	L*	a*	b*	ΔE^* (media)
A	53,81 b	30,19 a	6,00 a	3,04
B	55,79 a	29,96 a	3,21 b	3,12
E	54,22 b	30,04 a	5,46 a	2,64
TEST	55,97 a	28,08 b	5,70 a	-

Tab 9. Valori medi di L*, a*, b* e di ΔE^* (Trattamento vs Testimone) per differenti trattamenti sulla cv Tresor relativamente ai primi tre fiori per stelo (i valori che non presentano lettere uguali sono significativamente diversi per $P \leq 0,05$ – Test SNK)

TRATTAMENTO	L*	a*	b*	ΔE^* (media)
A	55,87 a	42,35 a	48,68 a	1,99
B	56,01 a	43,26 a	49,86 a	0,94
ABE	55,86 a	42,87 a	49,10 a	1,54
TEST	56,71 a	42,93 a	50,39 a	-

Tab. 10. Valori medi di L*, a*, b* e di ΔE^* (Trattamento vs Testimone) per differenti trattamenti sulla cv Menorca relativamente ai primi tre fiori per stelo (i valori che non presentano lettere uguali sono significativamente diversi per $P \leq 0,05$ – Test SNK)

TRATTAMENTO	L*	a*	b*	ΔE^* (media)
A	68,64 a	18,25 a	36,92 a	1,02
B	69,25 a	19,16 a	38,18 a	1,08
E	68,42 a	19,66 a	38,61 a	1,22
TEST	68,34 a	18,91 a	37,65 a	-

4 – DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La qualità della pianta di *Lilium* è spesso influenzata dalla stagione di coltivazione. E' risaputo che durante la stagione autunno-invernale, quando fattori come la radiazione solare e la temperatura sono sfavorevoli, le caratteristiche morfologiche del *Lilium* siano peggiori rispetto alle coltivazioni primaverili ed estive. La pianta spesso presenta una maggiore percentuale di aborti fiorali, un precoce appassimento e un'attenuazione dell'intensità del colore dei fiori, fattori imputabili ad una ridotta fotosintesi e ad una conseguente minor disponibilità di zuccheri.

Nelle prove effettuate presso l'azienda Campetti e presso il CRA-ISF di Pescia (PT), si è cercato di trovare le condizioni per ottenere fiori con colori brillanti e steli fiorali di buona qualità anche in epoca sfavorevole, mediante l'utilizzo di sostanze semplici e di facile reperimento da parte del floricoltore.

Per la misurazione dell'intensità del colore è stata adottata una tecnica nuova, cioè è stato impiegato uno spettrocolorimetro che ha garantito semplici ed immediate misure dei vari parametri del colore. Lo spettrocolorimetro trova impiego in altri settori industriali, dal settore alimentare a quello automobilistico (verniciature), ed è stato messo a punto in questa tesi per un nuovo utilizzo.

La sensibilità dell'apparecchio e la facilità di impiego hanno permesso di ottenere centinaia di dati in pochi minuti, permettendo di rilevare anche minime differenze di colore fra i controlli ed i trattati in quelle cultivars in cui questa differenza non era così evidente ad occhio nudo. Il suo facile trasporto, mediante una valigetta, può permettere le misure direttamente in campo senza distruzione di materiale vegetale. La tecnologia utilizzata, inoltre, grazie al fatto che il software dello strumento emette dati numerici, permette un confronto tra prove effettuate a distanza nel tempo e nello spazio,

cosa che invece non sarebbe possibile con altre tecniche (ad es. carte colorimetriche) o mediante il confronto di immagini fotografiche.

L'utilizzo di zuccheri (saccarosio o fruttosio + glucosio), di solfato potassico e di stimolatori di antociani (Bion e kinetina), generalmente applicati su prodotti orto-frutticoli, hanno garantito un miglioramento significativo della colorazioni dei fiori, soprattutto in quelli dalle tonalità fucsia (cv Fangio) e rosa (cv Cavalese).

Questi dati trovano conferma in prove effettuate da altri autori. Solfanelli *et al.* (2006) hanno infatti dimostrato che la somministrazione di zuccheri a piantine di *Arabidopsis* provoca un aumento della biosintesi di antociani, facendo diventare le foglioline rosse. In altre prove, invece, è stato dimostrato che la somministrazione per via fogliare di solfato potassico su prodotti ortofrutticoli migliora sensibilmente il colore della buccia in situazioni particolari in cui la radiazione solare risulta insufficiente (ad es. pomodoro o melanzana coltivati nel Nord-Italia) o in cui l'escursione termica giornaliera in estate non risulta elevata (ad es. mele a buccia rosa, tipo Pink Lady, coltivate nel Centro-Italia) (Pierandrei, comunicazione personale). Infine, prodotti come il Bion o la kinetina sono stati impiegati da altri autori al fine di migliorare alcune caratteristiche come, rispettivamente, la resistenza alle infezioni parassitarie (Muccinelli, 2004) e la longevità delle piante (Pinelli e Veraldi, 2004); questi prodotti, tuttavia, si sono rivelati in grado anche di incrementare la biosintesi di antocianine, come il Bion sull'uva (Iriti *et al.*, 2004) o la kinetina su colture cellulari di *Camphotoca* (Pasqua *et al.*, 2005).

Queste sostanze, inoltre, nelle nostre prove, hanno determinato un miglioramento di altri importanti aspetti qualitativi dello stelo florale. Infatti, il rifornimento di sostanze energetiche mediante spruzzatura fogliare ha permesso una totale riduzione degli aborti floreali nelle piante trattate, mentre i controlli hanno presentato una percentuale di aborti rilevante (tra il 5 ed il 12%). Un ulteriore aspetto migliorato dai trattamenti è stata la longevità degli steli, risultata tendenzialmente più alta nelle piante trattate rispetto ai testimoni non trattati. Infine, i trattamenti hanno anche determinato un aumento delle dimensioni dei bocci floreali in tutte le cultivars testate.

In conclusione, la prova ha dimostrato che l'apporto di sostanze energetiche, di facile reperimento da parte del vivaista, alle piante di *Lilium*, in periodi in cui le condizioni climatiche sono sfavorevoli, consente di ovviare a diversi problemi che in inverno affliggono i coltivatori. Tutto ciò può consentire la produzione di fiori di ottima qualità per tutto l'arco dell'anno e un conseguente soddisfacimento del consumatore finale che può trovare in ogni stagione un buon prodotto.

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
- ACCATI, E., 1986. I fitoregolatori nel metabolismo stagionale delle piante: riflessi eventuali sui bonsai.
- 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
- BOO H., TOMITAKA Y., ICHIMURA M., KIMURA M., 1997. *Effect of environmental factors on anthocyanin synthesis and sugar content in Cichorim 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.
- Celikel F.G., Dodge L.L., Reid M.S. 2002. *Efficacy of 1- MCP and Promalin for extending the postharvest life of Oriental lilies* . Scientia Hortic: 93 : 149-155
- Davies K.M., Schwinn K.E., 1997, *Flower color*. 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.
- Di Genova G., 2000. *Lilium: elementi di tecnica vivaistica*. 40-43
- E. Calderoni, N. Parrilli, 1985, *La coltivazione del gladiolo in pien'aria in Emilia-Romagna*
- Elgar, H.J., Woolf, A.B. and Bielecki, R.L. 1999. *Ethylene production by 3 lily species and their response to ethylene exposure*. *Postharvest Biol. Technol.* 16:257-267.
- 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.
- Filip Rolland, Elena Baena-Gonzalez, and Jen Sheen 2006. *Sugar sensing and : Conserved and Novel Mechanisms*, Vol. 57: 675-709
- 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.
- Giorgio Rampinini, *Gladiolus*, *Clamer Informa*, Novembre 2005, 29-52
- Grassotti A. e Nesi B., 2002. *Florovivaismo tra innovazione e novità*
- 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., (1994). *An improved method for transforming plants through electroporation*. *Plant Science* 102,81-89.
- Griesbach R.J., 2005 *Biochemistry and Genetics of Flower Color*. *Plant Breeding Reviews*, 25:89-114
- Grotewold E., *The Genetics and Biochemistry of Floral Pigments*, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 2006, 761-780
- 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.

- Han S.S., Miller J.A. 2003. Role of ethylene in postharvest quality of cut oriental lily 'Stargazer'. *Plant Growth Regul.* 40: 213-222
- HELLER W., FORKMANN G., 1993. *Biosynthesis of flavonoids*. In: Harborne, J.B. (ed.), *The Flavonoids: Advances in Research Since 1986*. Chapman & Hall, London, pp. 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., 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. , Ornam. Plant & Tea* 13: 31-39.
- Iriti M., Rossoni M., Borgo M., Faoro F., 2004. Benzothiadiazole enhances resveratrol and anthocyanin biosynthesis in grapevine, meanwhile improving resistance to botrytis cinerea. ISMEA, Filiera Fiori e Piante, Luglio 2004
- ISTAT.1994-Statistiche dell'agricoltura,della zootecnia e dei mezzi di produzione
- Jong Suk Lee, Mark S.Roh, *Proceedings of the international symposium on the genus Lilium*, Taejon, Korea, 28 Agosto-1 Settembre,1994.
- 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*. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 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-colour 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.
- 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.
- 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 (suppl.2), 550-551.
- LEE A.K., SUH J.K., 1996. *Effect of harvest stage, pre- and post-harvest treatment on longevity of cut Lilium flowers*. *Acta Hort.* 414. p. 287-293

- De Ranieri M., G.C. Fanizza, A. Callegari, Liliu-Aspetti botanici e varietali, Giornate di floricoltura, Viareggio 13-14 Giugno 1984. 5-21
- Maffei M., 1999. *Metabolismo e prodotti secondari delle piante*, Utet.
- 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
- 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, FL, pp. 1-10.
- Mercuri A., De Benedetti L., Bruna S., Bregliano R., Bianchini C., Foglia G., Schiva T., 2003. *Agrobacterium-mediated transformation with Rol genes of Lilium longiflorum Thunb*. *Acta Horticulturae* 129-136.
- 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
- Muccinelli, pronuario fitofarmaci, decima edizione, Edagricole, 2004, pag 120-121
- 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 copigmentation and flower color in lisianthus*. *Mol Breed* 9: 217-229.
- 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.
- Nowak, J. e Mynett, K. 1985. *The effect of sucrose, STS and 8-HQC on the quality of Lilium inflorescences cut at the bud stage and stored at low temperature*. *Scientia Hort*. 25:299-302
- 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.
- PARUPS E.V., MOLNAR J.M., 1972. *Histochemical study of xylem blockage in cut roses*. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 97: 532-534.
- Gabriella P., Barbara Monacelli, Nadia Mulinacci, Simona Rinaldi, Catia Giaccherini, Marzia Innocenti, Franco Francesco Vinceri *The effect of growth regulators and sucrose on anthocyanin production in Camptotheca acuminata*

- Pinelli S., Veraldi S., Maggio-Giugno 2004, Dermo Cosmo, vol. 2 num. 3.
- RAK J., NOWAK J., 1989. *The effect of gibberellic acid on growth and flowering of snapdragon cutting*. Acta Hort. 251: 67-69.
- Rumine P, 1984. I principali nemici animali del genere *Lilium*
- 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. (U.S.A.), 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.
- 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, pp. 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.
- SOLFANELLI C., POGGI A., LORETI E., ALPI A., PERATA P., 2006. *Sucrose-Specific induction of the anthocyanin biosynthetic pathway in Arabidopsis*.
- 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
- SWARTH, A. 1980. *Quality of Lilium 'Enchantment' flowers as influenced by season and STS*. Acta Hort. 113:45-49.
- TSUKAYA H., 1991. *Sugar-dependent expression of the CHS-A gene for chalcone synthase from petunia in transgenic Arabidopsis*. Plant Physiol., 97, 1414-1421.

- UDDIN, A. F. M. J., HASHIMOTO, F., SHIMIZU, K., SAKATA, 2004. Monosaccharides and chitosan sensing in bud growth and petal pigmentation in *Eustoma grandiflorum*. *Scientia Horticulturae*, (Vol. 100) (No. 1/4) 127-138
- VAN DOORN W.G., WOLTERING E.J. 1991. Developments in the use of growth regulators for the maintenance of postharvest quality in cut flowers and potted plants. *Acta Hort.* 298: 195-209.
- 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* pp. 94-130.
- VITRAC X., LARRONDE F., KRISA S., DECENDIT A., DEFFIEUX G., MERILLON J.M., 2000. *Sugar sensing and Ca²⁺-calmodulin requirement in Vitis vinifera cells producing anthocyanins*. *Phytochemistry* 53: 659-665.
- WATAD A.A., D.J. Yun, T. Matsumoto, X. Niu, Y. Wu, A.K. Kononowicz, R.A. Bressan, P.M. Hasegawa, 1998, Microprojectile bombardment-mediated transformation of *Lilium*.
- 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.
- 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.