



Facoltà di Agraria
Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroalimentari
(DiSTA)
Laboratorio di Post-raccolta (LAPO)

**DOTTORATO DI RICERCA IN
BIOTECNOLOGIE DEGLI ALIMENTI
XIX CICLO**

**Controllo della maturazione post-raccolta della
banana (*Musa* sp.) attraverso l'inibizione della
percezione dell'etilene:
effetto dell'1-metilciclopropene (1-MCP)**

SSD AGR/15

Coordinatore del Dottorato:

Prof. Ing. Mauro Moresi

Tutor: Prof. Fabio Mencarelli:

Tesi di Dottorato di: Giovanni De Martino

ANNO ACCADEMICO 2005-2006

Indice

Summary	4
Sommario	5
1. <u>Cenni sull'importanza commerciale della coltura del banano (Musa sp.)</u>	7
2. <u>L'etilene: l'ormone della maturazione</u>	9
2.1 La biosintesi dell'etilene	10
2.1.1 <i>La via MSAE</i>	11
2.1.2 <i>Il ciclo di Yang</i>	11
2.1.3 <i>La regolazione della via MSAE</i>	12
2.2 La trasduzione del segnale	15
2.3 Inibitori della sintesi dell'etilene	17
2.3.1 <i>AVG e AOA (inibitori dell'ACS)</i>	18
2.3.2 <i>Inibitori dell'ACO</i>	19
2.4 Inibitori dell'azione dell'etilene	19
2.4.1 <i>Inibitori non competitivi</i>	19
2.4.1.1 <i>CO₂</i>	19
2.4.1.2 <i>Benzotiadiazolo (MCEB), ossido di etilene, acido diiodidrossibenzoico (DIHB)</i>	20
2.4.1 <i>Inibitori competitivi</i>	20
2.4.2.1 <i>Ioni Ag (I)</i>	20
2.4.2.2 <i>Norbornadiene e cicloolefine</i>	21
2.4.2.3 <i>Ciclopropeni: l'1-metilciclopropene (1-MCP)</i>	22
3. <u>La maturazione postraccolta della banana</u>	27
3.1 <i>Maturità del frutto, green life e ripenio</i>	27
3.2 <i>Effetto dell'1-MCP sulla maturazione della banana</i>	32
4. <u>Scopo della tesi</u>	34
5. <u>Materiali e Metodi</u>	35
5.1 <i>Materiali e metodi relativi alla sperimentazione condotta presso il Laboratorio Postraccolta del Dipartimento di Tecnologie Agroalimentari dell'Università di Viterbo</i>	35
5.1.1 <i>Frutti</i>	35
5.1.2 <i>Trattamenti con etilene</i>	35
5.1.3 <i>Sintesi ed applicazione dell'1-MCP</i>	35
5.1.4 <i>Produzione di etilene e respirazione</i>	36
5.1.5 <i>Rilievi colorimetrici</i>	36
5.1.6 <i>Consistenza e deformabilità della polpa</i>	36
5.1.7 <i>Contenuto in solidi solubili</i>	37

5.2	Materiali e metodi relativi alla sperimentazione condotta presso il Gosford Horticultural Institute del NSW Department of Primary Industries (Gosford, NSW, Australia)	37
5.2.1	<i>Frutti</i>	37
5.2.2	<i>Trattamenti con etilene</i>	37
5.2.3	<i>Sintesi ed applicazione dell'1-MCP</i>	37
5.2.4	<i>Produzione di etilene e respirazione</i>	38
5.2.5	<i>Produzione di etanolo e acetaldeide</i>	38
5.2.6	<i>Consistenza della polpa</i>	38
5.2.7	<i>Rilievi colorimetrici</i>	38
5.2.8	<i>Fluorescenza e contenuto in clorofilla</i>	39
5.2.9	<i>Contenuto in solidi solubili</i>	39
6.	<u>Presentazione e discussione dei risultati</u>	40
6.1	<u>EFFETTO DELL'1-MCP SULLA GREEN LIFE E SULLA SHELF LIFE DEI FRUTTI</u>	40
6.1.1	<i>Preparazione dell'esperimento</i>	40
6.1.2	<i>Presentazione e discussione dei risultati</i>	40
6.2	<u>EFFETTO DELLA DURATA DEL TRATTAMENTO CON 1-MCP SULLA SHELF LIFE DEI FRUTTI</u>	47
6.2.1	<i>Preparazione dell'esperimento</i>	47
6.2.2	<i>Presentazione e discussione dei risultati</i>	48
6.3	<u>EFFETTO DEL TRATTAMENTO CON 1-MCP SULLA SHELF LIFE DEI FRUTTI IN RELAZIONE ALLO STADIO DI MATURAZIONE POSTRACCOLTA (colour stage 2)</u>	51
6.3.1	<i>Preparazione dell'esperimento</i>	51
6.3.2	<i>Presentazione e discussione dei risultati</i>	51
6.4	<u>EFFETTO DEL TRATTAMENTO CON 1-MCP SULLA SHELF LIFE DEI FRUTTI IN RELAZIONE ALLO STADIO DI MATURAZIONE POSTRACCOLTA (colour stage 3-4)</u>	55
6.4.1	<i>Preparazione dell'esperimento</i>	55
6.4.2	<i>Presentazione e discussione dei risultati</i>	56
6.5	<u>EFFETTO DELL'1-MCP IN RELAZIONE ALLA DURATA DEL TRATTAMENTO CON ETILENE ED ALLA TEMPERATURA DI CONSERVAZIONE</u>	59
6.5.1	<i>Preparazione dell'esperimento</i>	59
6.5.2	<i>Presentazione e discussione dei risultati</i>	60
6.6	<u>EFFETTO DELL'1-MCP E DI ALTRI TRATTAMENTI POST-CLIMATERICI SULL'IRREGOLARE EVOLUZIONE DEL COLORE DELLA BUCCIA</u>	66
6.6.1	<i>Preparazione dell'esperimento</i>	66
6.6.2	<i>Presentazione dei risultati</i>	67
6.6.3	<i>Discussione dei risultati</i>	68
6.7	<u>EFFETTO DELL'UMIDITÀ RELATIVA DELL'AMBIENTE DI CONSERVAZIONE SULL'EVOLUZIONE DEL COLORE DELLA BUCCIA IN SEGUITO AL TRATTAMENTO CON 1-MCP</u>	75
6.7.1	<i>Preparazione dell'esperimento</i>	75
6.7.2	<i>Discussione dei risultati</i>	76

6.7.3 Conclusioni relative all'effetto dell'umidità relativa dell'ambiente di conservazione sull'evoluzione del colore della buccia in seguito al trattamento con 1-MCP	77
<u>7. Discussioni finali</u>	85
<u>8. Conclusioni</u>	91
<u>9. Acknowledgements/Ringraziamenti</u>	93
<u>10. Bibliografia</u>	94
<u>Appendice</u>	107

Summary

This PhD project aimed to the understanding of the effect of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on banana fruit. 1-MCP is a new ethylene antagonist that has been shown to prevent or delay ethylene-induced effects on many fruit: this gaseous compound inhibits ethylene action by binding to ethylene receptors. In fact, the affinity of 1-MCP for the binding sites is higher than ethylene. Bananas are a typical climacteric fruit where once ripening has been initiated with ethylene exhibit a short shelf life due to rapid deterioration of peel colour and pulp firmness. Bananas are commercially ripened by treating 'mature green' fruit with ethylene. Once ripening has commenced the peel uniformly and rapidly changes colour to full yellow with brown flecks within 2 - 4 days at 20°C. In our experiments we tested the efficacy of 1-MCP on prolonging banana shelf life. We evaluated different various exposure time (3-6-12-24 hours), different timing of application (during early climacteric stage or when partially ripe), different ethylene exposure time (24-48 hours) and the effect of temperature and relative humidity on uneven peel degreening observed during the trials. Under the conditions tested we found that application for 24 h at 20°C of 200 nl l⁻¹ 1-MCP on bananas at colour stage 2 successfully delayed ethylene-induced effects, resulting in increased shelf life in terms of delayed colour development, pulp firmness and soluble solids accumulation. Moreover, we observed that delayed treatments on partially ripe bananas (colour stage 3-4) were not capable to contrast ripening-related events. Despite good results of 1-MCP delaying ripening, an uneven peel colour development following treatment has been observed. This uneven ripening of the peel appears when, after ethylene treatment, 1-MCP is applied to bananas which have not completely lost their green peel colour, and results in a dull-grey appearance. Here we report and discuss our results and some possible reasons for the failure of 1-MCP treated fruit to ripen normally.

Sommario

Con questo Progetto di Dottorato è stato portato avanti uno studio che mirava alla comprensione degli effetti dell'1-metilciclopropene (1-MCP) sulla banana (*Musa* sp.). L'1-MCP è un nuovo antagonista dell'azione dell'etilene ed è stata ampiamente dimostrata l'efficacia nel prevenire o ritardare gli effetti etilene-indotti in una vasta serie di frutti: questo composto gassoso inibisce l'azione dell'ormone legandosi proprio ai recettori dell'etilene presenti sulla membrana. Infatti, l'affinità dell'1-MCP per i siti di legame è maggiore di quella dell'etilene stesso. Le banane sono un tipico esempio di frutto climaterico che, una volta avviate al ripenio con etilene, manifestano una shelf life decisamente breve a causa del rapido deterioramento del colore della buccia e della consistenza della polpa. A livello commerciale vengono "maturate" artificialmente con l'etilene ed una volta avviata la fase climaterica la buccia vira in maniera rapida e uniforme al giallo pieno e si osserva la comparsa della tipica "tigratura" (*black spotting*) nel giro di 2-4 giorni a 20°C. Con i nostri esperimenti abbiamo valutato l'efficacia dell'1-MCP sul prolungamento della shelf life. Sono state testate differenti durate del trattamento con 1-MCP (3-6-12-24 h), il momento dell'applicazione del composto (durante le prime fasi climateriche o ad uno stadio più avanzato), differenti durate di trattamento con etilene (24-48 h) e l'effetto della temperatura e dell'umidità relativa sull'irregolare evoluzione del colore della buccia talvolta osservato durante le prove. Nelle condizioni da noi testate l'applicazione per 24 ore a 20°C di 200 nl l⁻¹ di 1-MCP su banane ad un *colour stage* 2 ha efficacemente ritardato gli effetti etilene-indotti, incrementando la shelf life dei frutti in termini di rallentato sviluppo del colore, di mantenimento della consistenza della polpa e di accumulo di solidi solubili. Inoltre, abbiamo osservato che trattamenti tardivi su banane ad uno stadio *partially ripe* (*colour stage* 3-4) non erano capaci di contrastare gli effetti della maturazione. A dispetto dei buoni risultati ottenuti, è stato osservato un irregolare evoluzione del colore della buccia dei frutti trattati con 1-MCP. Questa anomalia nella maturazione della buccia si manifesta quando,

in seguito al trattamento commerciale con etilene, l'1-MCP viene applicato su banane che non hanno ancora completamente perso il colore verde, risultando di una colorazione grigio-pallida.

In questa Tesi sono riportati e discussi i risultati ottenuti nel corso della sperimentazione ed alcune possibili spiegazioni alle anomalie maturative riscontrate in seguito al trattamento con 1-MCP.

1. Cenni sull'importanza commerciale della coltura del banano (*Musa* sp.)

Quella della banana (*Musa* spp.) rappresenta una delle più importanti produzioni alimentari del pianeta, con una produzione mondiale che nel 2005 è stata di 72,6 milioni di tonnellate (FAO, 2006). La varietà Cavendish rappresenta un'importante derrata da esportazione ed è quella che per il momento domina il mercato mondiale, con una produzione totale di circa 20 milioni di tonnellate l'anno (FAO, 2006). L'esportazione delle banane, comunque, rappresenta meno del 15% della produzione mondiale di questo frutto: più dell'85% della produzione deriva da una vasta gamma di cultivar di banano e platano coltivate da piccoli proprietari terrieri e dalle loro famiglie. Per milioni di persone nelle regioni più povere del mondo banane e platani rappresentano la fonte di amido di maggiore importanza (Price, 1995). Esiste una certa confusione in alcune parti del globo riguardo alla distinzione tra 'banana' e 'platano', che spesso deriva dall'utilizzo culinario che se ne fa. Questo ha portato Simmonds (1966) a restringere il termine 'platano' al nome di una cultivar per un gruppo di cloni strettamente correlati geneticamente all'interno del gruppo AAB (vd. sotto), caratteristica saliente dei quali è la scarsa palatabilità del frutto consumato tal quale dovuta alla presenza di elevate quantità di amido nella polpa a maturazione. Le varietà di banane da cottura (consumate fritte, lessate, al forno) sono l'alimento base di oltre 400 milioni di persone nei paesi in via di sviluppo. Inoltre, le banane sono anche impiegate nella produzione di fibre e di birra, ed in India anche nella medicina tradizionale.

La maggior parte delle cultivar edibili di banane e platani derivano da due membri della Famiglia *Musaceae*, *Musa acuminata* e *Musa balbisiana*. Secondo la classificazione generalmente accettata, banani diploidi che derivano dalle specie polimorfiche di *Musa acuminata* vengono classificati AA. Nel corso della meiosi diploidi del tipo AA possono dare triploidi del tipo AAA, tra i quali troviamo la cultivar Cavendish. L'ibridazione tra i diploidi AA e i diploidi di *Musa balbisiana*

(BB) ha portato alla formazione di diversi tipi AAB e ABB, alcuni dei quali scoperti recentemente (Price, 1995). Comunque, l'insieme dei banani e dei platani coltivati sono rappresentati da cultivar triploidi altamente sterili e la partenocarpia è una caratteristica essenziale delle cultivar commerciali di banana, che risulta essere sotto il controllo di almeno tre geni dominanti: P_1 , P_2 and P_3 (Ortiz, 1995). Fino al 1940 la cultivar 'Gros Michel' dominava il commercio internazionale di banane, fino a quando le coltivazioni non furono decimate da una fusariosi (Panama Disease / Mal di Panama). Nel corso degli anni seguenti venne quindi avviata alla produzione commerciale una cultivar resistente del sottogruppo Cavendish, che ha rimpiazzato completamente quelle coltivate in precedenza.

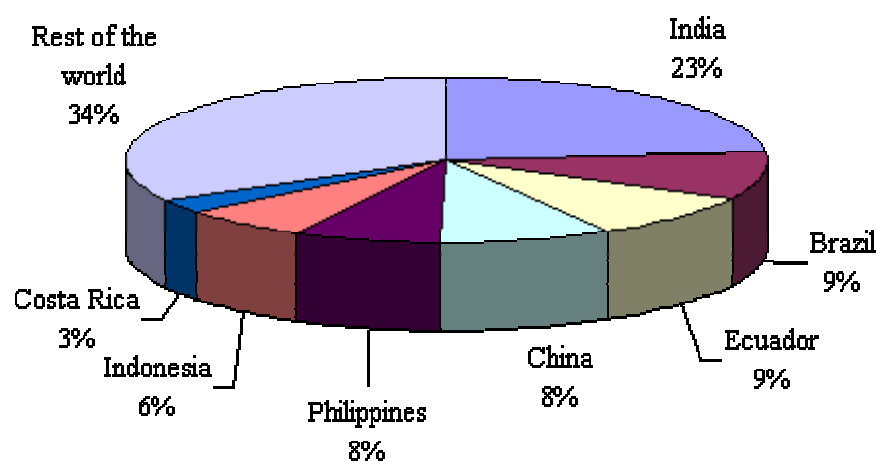


Fig. 1.1 Paesi esportatori di banana (Fonte: UNCTAD, 2004)

2. L'etilene: l'ormone della maturazione

L'etilene è una delle più semplici molecole organiche dotate di attività biologica: questo idrocarburo gassoso insaturo è universalmente riconosciuto come l'ormone responsabile della maturazione dei frutti (Burg, 1962; Biale e Young, 1981) ed è inoltre coinvolto nella regolazione di diversi processi metabolici nelle piante come la senescenza, l'abscissione, la crescita, la radicazione e molti altri aspetti dello sviluppo (Mattoo e Suttle, 1991). A causa del suo effetto sui tessuti vegetali (da molti autori definito "spettacolare") riveste inoltre una rilevante importanza commerciale: per la sua implicazione nel processo di senescenza, importanti perdite di prodotto si verificano annualmente nel settore ortofrutticolo, perdite che diventano ancora più consistenti se si considerano quei paesi che non dispongono di mezzi e tecnologie tali da garantire ottimali condizioni di refrigerazione e trasporto.

La scoperta dell'attività biologica dell'etilene si deve a Dimitry Nikolayevich Neljubov (1879-1926): egli notò che l'etilene era il componente del gas d'illuminazione che causava la crescita orizzontale di giovani piantine eziolate di pisello (Neljubov, 1901). Successivamente in California, Denny (1924) mostrò che l'etilene promuoveva lo sverdimento dei limoni, mettendo in evidenza il fatto che il gas era già attivo a bassissime concentrazioni, che non era nocivo per l'uomo e non c'era pericolo di infiammabilità a quei livelli d'esercizio. Kidd e West (1932) notarono che l'etilene stimolava il climaterio respiratorio delle mele e osservarono inoltre che le esalazioni di questi frutti imitavano l'effetto dell'etilene su giovani plantule, suggerendo che le mele potessero produrre etilene.

La prova definitiva che le piante producessero piccole quantità di etilene fu fornita dall'inglese Gane (1934): questa scoperta è ancor più importante se si pensa che fu raggiunta nonostante l'uso di metodi di analisi poco sensibili (e che richiedevano tempi assai lunghi) che generalmente consistevano nel bloccare l'etilene con il perclorato di mercurio, nel suo successivo rilascio e nella sua misura con l'impiego di manometri. In seguito, le ricerche sul coinvolgimento dell'etilene

nella maturazione dei frutti subiscono un notevole impulso grazie all'avvento delle tecniche gascromatografiche. Ai giorni nostri è possibile rilevare concentrazioni nell'ordine di parti per miliardo (ppb) con tempi di analisi che vanno da 1 a 4 minuti, ed è stato sviluppato anche un nuovo metodo per la rilevazione dell'etilene che prevede l'uso di un rilevatore laser fotoacustico che può misurare fino a 50 parti per miliardo di miliardi (ppt) di etilene (Voeselek *et al.*, 1997).

2.1 La biosintesi dell'etilene

2.1.1 La via MSAE

È oramai stato accertato che il precursore biologico dell'etilene nelle piante superiori è l'amminoacido α -L-metionina (Lieberman, 1979). La via biosintetica attraverso la quale si arriva all'etilene viene definita con la sigla MSAE, che sta ad indicare gli intermedi della biosintesi: L-metionina, S-adenosilmetionina (AdoMet), acido 1-amminociclopropan-1-carbossilico (ACC), etilene (Fig. 2.1); l'esistenza di questa via è stata dimostrata attraverso l'uso di inibitori, precursori e composti marcati (Yang e Hoffman, 1984; McKeon *et al.*, 1995). Il primo passaggio consiste nella trasformazione della metionina nella sua forma attivata, la S-adenosilmetionina (AdoMet), in cui l'atomo di zolfo è legato al ribosio dell'adenosina; questa reazione è catalizzata dall'enzima S-adenosil transferasi che necessita della presenza di una molecola di ATP. La formazione dell'ACC a partire dall'AdoMet è mediata dall'enzima ACC sintasi (ACS) (Adams e Yang, 1979): questo enzima catalizza l'eliminazione della metiltioadenosina (MTA) che entra nel "ciclo di Yang", cioè quell'insieme di reazioni che permettono la rigenerazione della metionina (Baur *et al.*, 1971). Senza questo riciclaggio la concentrazione di zolfo ridotto presente limiterebbe la quantità di metionina disponibile e la sintesi di etilene (Burg e Claggett, 1967).

L'enzima ACC ossidasi (ACO, detto anche EFE: ethylene forming enzyme) catalizza l'ultimo passaggio di questa via biosintetica permettendo la conversione dell'ACC a etilene, reazione che richiede la presenza di ossigeno. Parte dell'ACC

presente nel tessuto non viene convertito in etilene ma in un suo coniugato non volatile, l'*N*-malonil ACC (MACC) (Hoffman *et al.*, 1982) che non viene degradato e sembra accumularsi nel tessuto: la coniugazione dell'ACC può essere intesa come una forma di stoccaggio solo nel caso in cui sia saturata l'attività dell'ACO o i livelli di ACC siano molto elevati. L'ossidazione dell'ACC oltre a produrre etilene, porta alla formazione di acido cianoformico (CN-COOH) che viene successivamente convertito nei tessuti a CO₂ e acido cianidrico (HCN). La scarsità di HCN libero nei tessuti che producono elevate quantità di etilene indica la capacità di detossificare questo composto: grazie all'enzima β-cianoalanina sintasi l'HCN reagisce con la cisteina per formare β-cianoalanina e H₂S (Peiser *et al.*, 1984).

2.1.2 Il ciclo di Yang

La metionina si trova in concentrazioni abbastanza ridotte e pressochè costanti nei tessuti vegetali, compresi quelli dei frutti in via di maturazione, che producono grandi quantità di etilene. Dato che la metionina è l'unico precursore dell'etilene nelle piante superiori, i tessuti che posseggono alte velocità di produzione di etilene richiedono un rifornimento continuo di questo aminoacido. Questo rifornimento è garantito dal riciclaggio della metionina attraverso il ciclo di Yang (Burg, 1973; Murr e Yang, 1975), una catena di reazioni regolate da due enzimi chiave, l'MTA nucleosidasi e l'MTR chinasi (Kushad *et al.*, 1983). Come precedentemente accennato, il metiltio (CH₃S-) gruppo della metionina viene rilasciato dall'AdoMet come 5'-metiltioadenosina (MTA) durante la formazione dell'ACC. L'MTA viene idrolizzato a 5'-metiltioribosio (MTR), il quale fornisce sia il metiltio-gruppo sia il 2-amminobutirrato per la sintesi della metionina (Yang e Hoffman, 1984). L'MTR viene quindi convertito in metionina attraverso l'acido 2-cheto-4-metiltiobutirrico con rilascio di acido formico (Miyazaki e Yang, 1987).

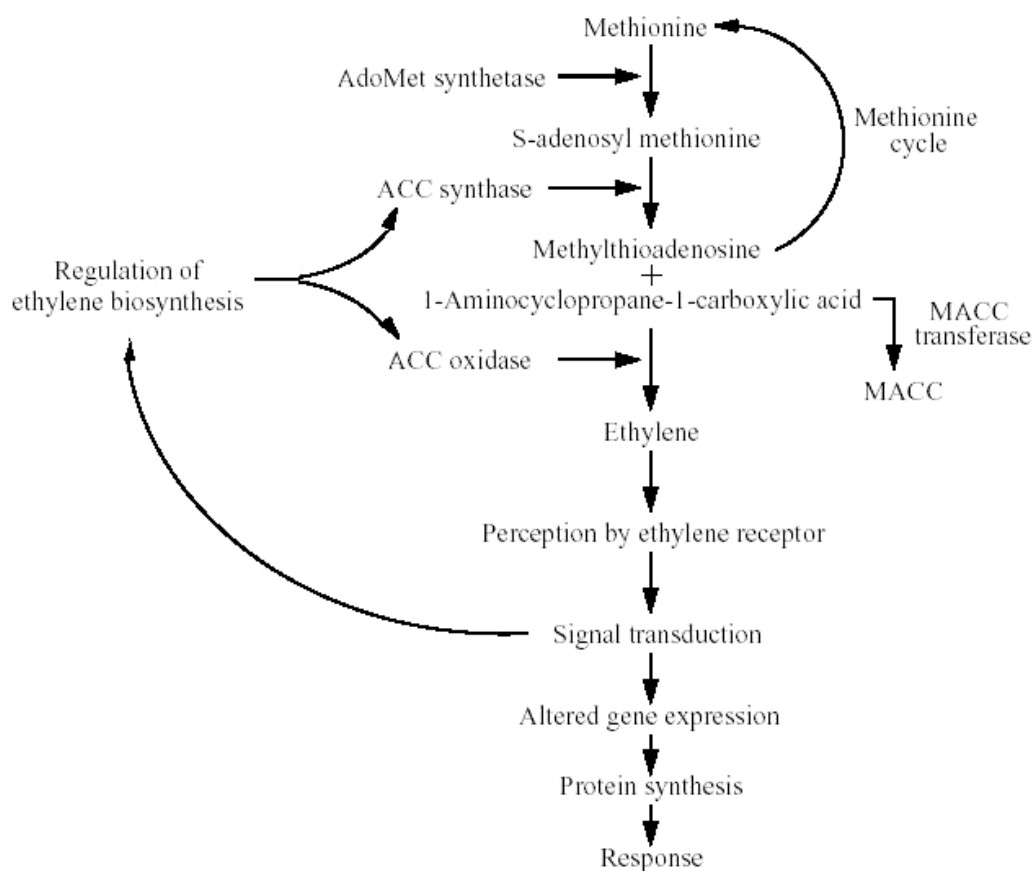


Fig. 2.1 Via biosintetica dell'etilene ed interazione con i recettori.

2.1.3 La regolazione della via MSAE

Sono stati proposti due diversi sistemi di regolazione della biogenesi dell'etilene nei frutti climaterici: il *sistema 1* è responsabile della produzione basale di etilene, della scarsa produzione durante l'accrescimento dei frutti (anche di quelli non climaterici) ed è caratterizzato da un meccanismo di regolazione a “feedback negativo” (autoinibitorio); il *sistema 2* è invece responsabile dell'incremento e della conseguente produzione autocatalitica di etilene dei frutti climaterici. Quest'ultimo sistema è caratterizzato da un meccanismo di regolazione a “feedback positivo”. Solo il Sistema 2 è autocatalitico (McMurchie *et al.*, 1972),

anche se l'etilene da entrambi i sistemi viene prodotto attraverso la stessa via biosintetica (McGlasson, 1985).

La maturazione normalmente inizia in una regione del frutto e si diffonde poi verso le regioni adiacenti, mentre l'etilene diffonde liberamente da una cellula all'altra.

La regolazione a feedback positivo è una caratteristica dei frutti in maturazione e dei fiori senescenti, nei quali l'esposizione ad etilene o propilene esogeni provoca un aumento di biosintesi dell'etilene grazie all'induzione dell'ACS o dell'ACO (Alexander e Grierson, 2002). Sappiamo che questi enzimi sono entrambi codificati da famiglie multigeniche e che la loro espressione è variamente regolata da fattori ambientali ed ormonali.

Sono stati identificati 8 geni che codificano per isoenzimi con attività ACC-sintasica, nel pomodoro, *LEACS1A*, *LEACS1B*, *LEACS2-7* (Zarembinski e Theologis, 1994; Oetiker *et al.*, 1997; Shiu *et al.*, 1998), e molti altri sono stati identificati in frutti sia climaterici, sia non climaterici.

L'ACS mostra omologia con le amminotransferasi piridossal-5-fosfato dipendenti e studi di complementazione dei mutanti hanno dimostrato che l'enzima si comporta come un dimero (Tarun e Theologis, 1998). La presenza dei trascritti di *LEACS2* e di *LEACS4* durante la maturazione è stata ben documentata (Rottman *et al.*, 1991; Barry *et al.*, 2000).

Recenti lavori hanno confermato la presenza di *LEACS1A* e di *LEACS6* già prima dell'inizio della maturazione e mostrato che ciascuno degli isozimi ha un differente schema di espressione. In base allo studio di mutanti Nr e Rin ("never-ripe" e "ripening-inhibitor", rispettivamente), si è giunti alla conclusione che *LEACS1A* ed *LEACS6* sono coinvolti nel sistema 1 di sintesi dell'etilene, quello presente nei frutti immaturi (Barry *et al.*, 2000). Il sistema 1 continua ad operare finché viene raggiunta una capacità maturativa. A questo punto vi è una fase di transizione durante la quale l'espressione di *LEACS1A* aumenta mentre viene indotto *LEACS4*. Sempre durante questa fase, inizia ad operare il sistema 2, autocatalitico, mantenuto dall'induzione etilen-dipendente di *LEACS2* (Barry *et al.*, 2000). Mutazioni antisenso di *LEACS2*, infatti, riducevano la sintesi di etilene

durante la maturazione allo 0,1% rispetto al controllo. I frutti antisenso mostravano uno schema anormale di maturazione come un rammollimento ritardato e un picco climaterico ridotto (Oeller *et al.*, 1991).

Ancora è dibattuta la questione se la regolazione dell'ACS avvenga a livello della trascrizione, della traduzione o successivo alla traduzione. Secondo quanto emerso da analisi in vitro l'attività dell'ACS codificata dal gene *LEACS2*, nel pomodoro, aumenta in seguito a delezione di 52 amminoacidi dall'estremità carbossi-terminale. (Li e Mattoo, 1994; Li *et al.*, 1996). Ma è stato anche osservato che *LEACS2* viene fosforilata in frutti di pomodoro sottoposti a traumi. Tuttavia il ruolo della fosforilazione potrebbe essere non quello di regolare l'attività specifica dell'enzima bensì quello di regolarne il turnover (Spanu *et al.*, 1994). In ogni caso la fosforilazione potrebbe proteggere la proteina dalla degradazione, quindi causando l'accumulo dell'ACS e dunque l'aumento dell'attività totale, con conseguente aumento della sintesi dell'etilene (Tatsuki e Mori, 2001).

In merito all'ACO, inizialmente si pensava che l'attività dell'ACS fosse il passaggio limitante nel controllo della biosintesi dell'etilene, mentre l'attività dell'ACO fosse costitutiva. Oggi sappiamo invece che un aumento di attività ACC-ossidasi precede quello dell'ACS nei frutti preclimaterici, in risposta all'etilene, indicando che anche l'ACO è importante per regolare la produzione d'etilene (Liu *et al.*, 1985).

Gli enzimi ACO sono membri della famiglia delle ossidasi/ossigenasi Fe(II)-dipendenti. L'attività in vitro dell'ACO richiede ascorbato come substrato e la CO₂ prodotta durante il picco climaterico attiverebbe l'enzima in vivo (Dong *et al.*, 1992; Smith e John, 1993).

Due modelli sono stati proposti per spiegare l'azione dell'enzima: nel primo modello, l'associazione dell'ascorbato con lo ione Fe(II) attiva un O₂ legato a produrre specie chimiche osso-ferriche altovalenti che ossidano l'ACC ad etilene (Zhang *et al.*, 1997). Più recentemente è stato ipotizzato che il ruolo dello ione Fe(II) è di legare l'ACC e l'O₂ simultaneamente e di promuovere l'evento ossidoriduttivo che produce l'etilene (Rocklin *et al.*, 1999).

L'analisi dell'espressione genica per l'ACO nei frutti in maturazione mostra che

ciascun gene della famiglia multigenica ACO è altamente regolato, e che i trascritti dei singoli geni si accumulano in grado diverso nei distinti stadi di sviluppo (Barry *et al.*, 1996).

La conclusione è che molto probabilmente il primo passo nella biosintesi autocatalitica d'etilene è la sintesi proteica di ACO1, l'etilene prodotto induce l'espressione genica delle ACS che a loro volta rendono disponibile più ACC alla catalisi delle ACO.

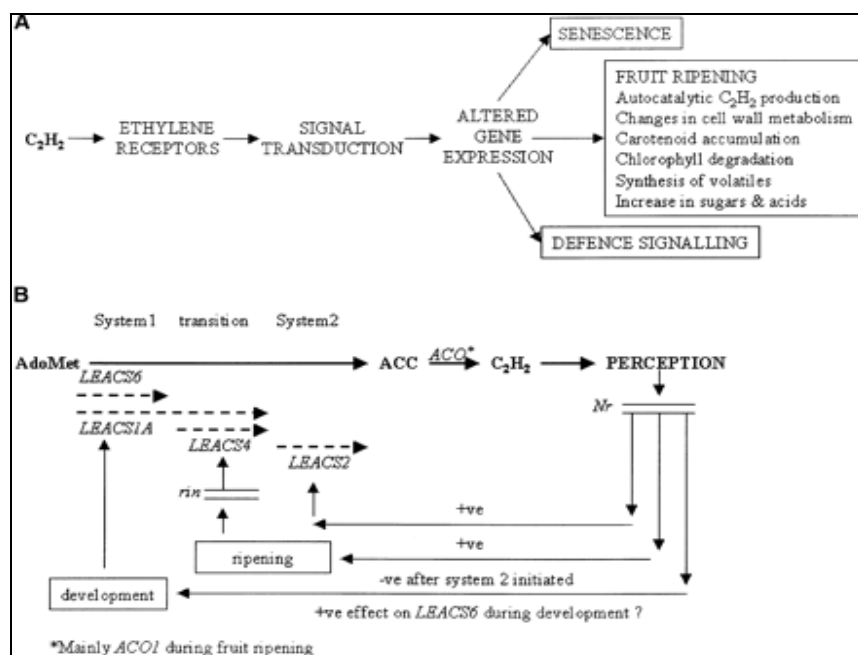


Fig. 2.2 (A) Rappresentazione schematica del ruolo che l'etilene ha durante la maturazione del pomodoro; (B) Modello per spiegare la differente regolazione dell'espressione genica dell'ACS durante la transizione dal sistema 1 al sistema 2 per la sintesi d'etilene nel pomodoro. I simboli $\pm ve$ (negative) and +ve (positive) si riferiscono all'azione dell'etilene sulle vie biochimiche che reprimono ($\pm ve$) o stimolano (+ve) l'espressione genica dell'ACS. (Fonte: Alexander e Grierson, 2000)

2.2 La trasduzione del segnale

Sono stati fatti molti progressi nella delucidazione della via di trasduzione del segnale etilenico. Gli studi si sono concentrati sui mutanti di *Arabidopsis spp.*. Di particolare interesse si sono rivelati i mutanti per il gene *ETR1* (Bleecker *et al.*, 1988; Guzman ed Ecker, 1990).

La proteina *ETR1* è omologa alla famiglia dei trasduttori di segnale dei procarioti conosciuti come regolatori a due componenti. Nei batteri le due componenti, il sensore ed il regolatore di risposta, modulano le risposte ad un'ampia gamma di stimoli di sviluppo ed ambientali (Stock *et al.*, 2000). *ETR1* funziona come un dimero e mostra un legame ad alta affinità con l'etilene mediato da ioni rame (Schaller e Bleeker, 1995).

Le proteine etilen-recettori possono essere strutturalmente separate in tre domini:

1. Il dominio sensore (amminoacidi 1-313) contiene tre (3) ripiegamenti idrofobici, che si ipotizza attraversino la membrana cellulare. Il legame con l'etilene avviene entro questa regione idrofobica aminoterminale. Questo dominio ammino-terminale è abolito in diversi mutanti etilen-insensibili. Tale dominio contiene anche gli amminoacidi necessari per la dimerizzazione ed un sito di legame con il rame, nonché un subdominio chiamato GAF, la cui funzione è ancora da stabilire (Klee, 2002).
2. Il dominio chinasi (amminoacidi 314-581) ha un'estesa sequenza omologa alle istidina-chinasi (HK). Il centro catalitico delle HK è definito da 5 subdomini (H, N, G1, F, G2). *ETR1* contiene tutti questi subdomini e si è dimostrato che ha attività HK in vitro (Gamble *et al.*, 1998). In teoria l'attività HK trasmetterebbe il segnale ai componenti a valle della via di trasduzione.
3. Infine vi è il dominio regolatore di risposta (amminoacidi 582-738). Questa sequenza è identica alla porzione di risposta dei sistemi procariotici a due componenti e contiene aspartato attivo nel fosforilare proteine batteriche.

Esperimenti fatti utilizzando combinazioni di mutanti recettor-soppressi indicano che i recettori si comportano da regolatori negativi (Hua e Meyerowitz, 1998). I mutanti per uno o due geni codificanti recettori non hanno un fenotipo univoco, probabilmente a causa della ridondanza di recettori. Invece, i mutanti tripli o quadrupli mostrano una costitutiva ipersensibilità all'etilene, ossia rispondono a concentrazioni inferiori a quelle efficaci nei genotipi selvatici.

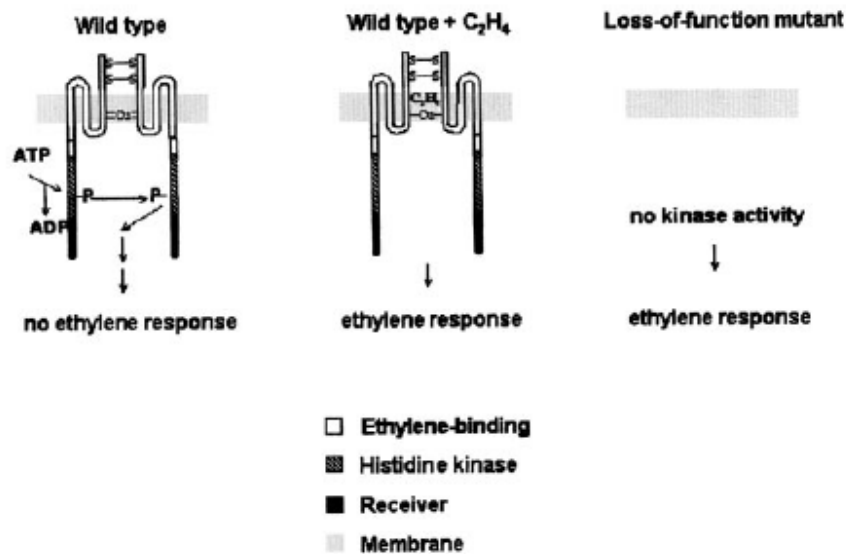


Fig. 2.3 Rappresentazione schematica del recettore dell'etilene. Benché l'attività del recettore sia indicata come una proteina chinasi, ciò non è ancora provato definitivamente. In qualche modo, tuttavia, il recettore sopprime la trasduzione del segnale in assenza di etilene. Quando l'etilene si lega, viene tolto il blocco alla trasduzione del segnale. La rimozione dei recettori, come nel caso di mutanti antisenso, rimuove l'attiva soppressione della risposta all'etilene. Mutanti che hanno solo parzialmente perso la funzione del recettore richiedono meno etilene, rispetto al genotipo selvatico, per rispondere positivamente all'etilene, giacché contengono, su base molare, meno recettori da inattivare. (Fonte: Klee, 2002)

Il modello derivato da questi esperimenti prevede che nello stato di “default” , ossia di non legame con l'etilene, il recettore sia attivo ed il legame con l'etilene ne determini l'inattivazione. L'attività chinasi presente nel dominio 2 del recettore sopprime, nello stato di default, l'espressione di geni etilen-indotti. Un recettore incapace di legare l'etilene non può dunque essere inattivato. Con questo modello si può prevedere che un minor numero di recettori presenti nella membrana cellulare aumenta la sensibilità all'etilene, mentre, all'inverso, un maggior numero riduce la sensibilità ad esso. Comunque non si sa ancora precisamente quale attività viene regolata, visto che altri recettori, come *l'ERS2*, non hanno attività istidin-chinasica (Klee, 2002) (Fig. 2.3).

2.3 Inibitori della sintesi dell'etilene

Dei frutti e dei vegetali raccolti annualmente ed avviati alla commercializzazione, una percentuale significativa viene perduta a causa della prematura senescenza o

per diversi tipi di alterazioni, ed il ruolo prominente dell'etilene nel controllo della maturazione e nella senescenza dei frutti è stato documentato da tempo. Uno dei primi cambiamenti biochimici percepibili che avvengono in un frutto all'inizio del ripenio è un rapido incremento nella biosintesi di etilene (Speirs e Brady, 1992; Yang e Hoffman, 1984). Questo aumento nella produzione di etilene induce la trascrizione di geni che codificano per le proteine responsabili dei cambiamenti associati al ripenio dei frutti. Quindi, la manipolazione della sensibilità all'etilene attraverso l'uso di inibitori non tossici possono influenzare decisamente la shelf-life di frutti, vegetali e piante ornamentali.

2.3.1 AVG e AOA (inibitori dell'ACS)

Sappiamo che i microrganismi producono una gran varietà di molecole che inibiscono la produzione di etilene (Lieberman, 1977). Tra queste vi è la rizobitossina, un inibitore della biosintesi di metionina in *Salmonella typhimurium*, ed i suoi analoghi molecolari. In mele e plantule di sorgo si è osservato una riduzione del 75% nella produzione di etilene dopo trattamento con rizobitossina (Owens et al., 1971).

L'AVG, amminoetossivinilglicina [$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$], è un analogo sintetico della rizobitossina. L'AOA (acido amminoossiacetico; acido 3-amminoossipropionico) ha degli amminogruppi che sono degli efficaci inibitori della produzione di etilene (Amrhein e Wenker, 1979).

Come analogo degli amminoacidi, l'AVG può inibire la sintesi proteica, ma a concentrazioni più basse sopprime la sintesi di etilene (Saltveit e Larson, 1983).

Sia l'AVG che l'AOA agiscono inibendo l'ACS. Curve dose-risposta hanno mostrato che l'AVG è circa 10 volte più efficace dell'AOA nel ridurre la produzione di etilene in semenzali di lattuga (Abeles e Wydoski, 1987). L'AVG controlla la respirazione, la perdita di consistenza, la produzione di volatili e l'accumulo di acidi grassi nella cuticola, mentre minor attività viene esercitata sull'acidità e sulla degradazione della clorofilla (Halder-Doll e Bangerth, 1987).

Oggi l'AVG esiste sotto forma di un formulato commerciale usato per ritardare il distacco delle mele dalla pianta (ReTain®).

2.3.2 Inibitori dell'ACO

La trasformazione dell'ACC in etilene può essere inibita, oltre che da condizioni anaerobiche (Sato e Esashi, 1983), da analoghi strutturali dell'ACC (Apelbaum *et al.*, 1981). Anche l'AIBA (acido α -amminoisobutirrico) è risultato efficace, pur non avendo un anello a tre atomi di carbonio, in quanto inibisce il trasporto dell'ACC (Saftner, 1989).

Tra gli altri inibitori della ACO vi sono anche gli ioni Co(II), le poliammine, l'*n*-propilgallato, il caprilato di sodio, il benzilisotiocianato (Toppan *et al.*, 1982), acidi grassi (Hyodo e Tanaka, 1982), alte concentrazioni di fosfato, l'acido salicilico (Leslie e Romani, 1988) e la temperatura al punto di congelamento (Wang e Adams, 1982).

Tuttavia l'uso di queste molecole è stato limitato all'ambito sperimentale dato che non sono prive di effetti più o meno tossici sull'organismo umano.

2.4 Inibitori dell'azione dell'etilene

Esistono due classi di inibitori dell'azione dell'etilene. Alcuni sono non competitivi e bloccano l'azione dell'etilene semplicemente rallentando il metabolismo cellulare. La seconda classe di inibitori, che ci interessa maggiormente, in quanto non agiscono sul metabolismo cellulare in generale, include molecole che si combinano con i recettori dell'etilene e così prevengono le risposte da esso indotte. Tuttavia nessuno degli inibitori competitivi è privo di effetti specifici di rallentamento del metabolismo. Ciò che è importante, inoltre, è che gli effetti degli inibitori dell'azione possono essere annullati sottoponendo i tessuti ad un flusso di etilene.

2.4.1 Inibitori non competitivi

2.4.1.1 CO₂

E' ancora dibattuto se la CO₂ sia o no un inibitore competitivo. Da tempo è noto che essa riduce gli effetti etilene-indotti su mele (Kidd e West, 1934) e banane

(Cousins, 1910) e previene l'abscissione e la senescenza fiorale. La somiglianza strutturale tra gli analoghi dell'etilene e la CO_2 suggerisce che essa inibisca competitivamente l'etilene (Burg e Burg, 1967). Composti come il monossido di carbonio ($\text{C}=\text{O}$) l'allene ($\text{CH}_2=\text{C}=\text{CH}_2$) e la stessa CO_2 ($\text{O}=\text{C}=\text{O}$) sono accomunati dall'avere un orientamento analogo dei doppi legami. Tuttavia alcune osservazioni suggeriscono che questa interpretazione non è corretta. Ad esempio si sa che questa molecola non blocca il recettore dell'etilene in piante di riso, al contrario del norbornadiene (Sanders *et al.*, 1990). Inoltre, in studi dose-risposta con plantule intatte di lattuga, si vide che la CO_2 inibiva l'azione dell'etilene, ma il trattamento successivo con etilene non richiedeva concentrazioni più alte dell'ormone rispetto al controllo (Abeles e Wydoski, 1987).

2.4.1.2 Benzotriazolo (MCEB), ossido di etilene, acido diiodoidrossibenzoico (DIHB)

Studi sulla germinazione dei semi e sul radicamento di plantule di lattuga hanno portato alla conclusione che l'MCEB si comporta come intossicante (Abeles, 1986).

L'ossido di etilene, strutturalmente simile all'etilene, blocca la maturazione dei pomodori, e il suo effetto sembra essere dovuto ad una soppressione del metabolismo di tipo intossicante (Veen, 1987). Merita un cenno l'acido diiodoidrossibenzoico (DIHB) che, come l'ossido di etilene, sembra agire come inibitore non competitivo (Abeles e Wydoski, 1987). Studi sulla germinazione dei semi di lattuga e sul radicamento di plantule di lattuga hanno suggerito che l'MCEB si comporta come intossicante, non come inibitore competitivo (Abeles, 1986).

2.4.2 Inibitori competitivi

2.4.2.1 Ioni Ag (I)

Si riporta qui solo un cenno all'effetto degli ioni Ag(I) . Beyer (1976) riportò che l' AgNO_3 bloccava l'azione dell'etilene. Furono successivamente sperimentati gli

effetti di altri metalli ma solo l'azione dell'Ag(I) era persistente e specifica. Subito si propose che l'Ag(I) interagisse con l'etilene sostituendosi ad un altro metallo (Cu^+) presente nel recettore dell'etilene. Oggi sappiamo che l'argento è un inibitore efficace in tutti i sistemi studiati (Cook e Van Staden, 1987). Ovviamente l'argento non può essere usato in prodotti eduli, in quanto tossico per l'organismo umano, ma è stato ampiamente usato sui fiori, tanto che oggi viene bandito per l'elevato inquinamento che ha provocato.

2.4.2.2 *Norbornadiene e cicloolefine*

I composti 2,5-norbornadiene, ciclopentadiene, furano, pirrolo, tiofene, 1-metilpirrolo, dicitoclopentadiene, metilciclopentadiene, cicloesatriene sono stati testati sulle banane per la loro azione inibente la maturazione (Sisler e Wood, 1988). Il miglior inibitore tra questi è risultato il norbornadiene, efficace a concentrazioni di $500\text{-}2000\ \mu\text{l l}^{-1}$ (Sisler e Yang, 1984). Concentrazioni più alte hanno effetti tossici (Blankenship e Sisler, 1989). La sua attività è dovuta alla sua conformazione cis-2 con doppio legame. Questo fu dimostrato da studi sull'effetto dell'1-butene, cis-2-butene e trans-2-butene. Su epicotili eziolati di pisello trattati con $0,3\ \mu\text{l l}^{-1}$ di etilene, l'1-butene somministrato in dosi di $25000\ \mu\text{l l}^{-1}$ bloccava l' "effetto triplo", ossia la comparsa dei sintomi di ridotto allungamento dell'apice, aumento dell'accrescimento diametrico e ripiegamento dell'apice ad uncino. Ugualmente si comportava il cis-2-butene, mentre il trans-2-butene non dava alcun effetto etilen-inibitorio. Si concluse che un doppio legame ad un'estremità della catena può introdursi nel recettore etilenico ed impedirne l'interazione con l'ormone. L'ingombro sterico del trans-2-butene ne impedirebbe il legame col recettore (Sisler e Yang, 1984). Il norbornadiene è liquido a temperatura ambiente ha un odore sgradevole e soprattutto è un sospetto cancerogeno. Esso viene normalmente applicato allo stato gassoso o come liquido evaporante.

Il diazociclopentadiene (DACP) è un debole inibitore dell'etilene, ma sotto irraggiamento nel visibile dà luogo alla formazione di diverse sostanze più attive che bloccano la risposta all'etilene per diversi giorni. A 25°C questo blocco dura circa 10-12 giorni in frutti di pomodoro. I composti attivi non sono stati ancora

identificati in quanto molto instabili. Un problema pratico fondamentale è che il DACP è esplosivo in alte concentrazioni, limitandone l'uso commerciale (Sisler e Serek, 1997).

2.4.2.3 Ciclopropeni: l'1-metilciclopropene (1-MCP)

I ciclopropeni sono degli efficaci antagonisti dell'azione etilenica. Il CP (ciclopropene), l'1-MCP (1-metilciclopropene) e il 3,3-DMCP (3,3-dimetilciclopropene) sono tutti attivi, ma CP ed 1-MCP sono circa 1000 volte più attivi del 3,3-DMCP (Sisler e Serek, 1997). Altri ciclopropeni mono-, di- o tri-sostituiti sono risultati efficaci nell'inibire l'etilene, ma con trattamenti a concentrazioni superiori da 1 a 5 ordini di grandezza rispetto al CP e all'1-MCP e per un periodo d'efficacia inferiore (Sisler e Serek, 1999; Sisler *et al.*, 1999). Tutte queste sostanze sono dei gas inodori a temperatura ambiente. La maggior parte degli studi sono stati svolti sull'1-MCP, dato che è più stabile del CP e più attivo di tutti gli altri ciclopropeni.

I lavori preliminari sulla scoperta dell'1-MCP come inibitore dell'etilene sono stati condotti negli Stati Uniti, nei laboratori della North Carolina State University e questi ricercatori detengono il brevetto per l'uso dei ciclopropeni come inibitori dell'etilene (Sisler e Blankenship, 1996).

Questo composto è risultato essere un buon derivato per l'uso pratico in quanto meno volatile rispetto agli altri ciclopropeni e attivo a concentrazioni decisamente più basse (Sisler *et al.*, 1999). Inizialmente la commercializzazione dell'1-MCP è stata intrapresa dalla Floralife Inc. per l'utilizzo su prodotti ornamentali: l'azienda formulò una polvere di α -ciclodestrine che rilasciava 1-MCP quando veniva miscelata con acqua. Nel 1999 il prodotto fu quindi approvato dall'Agenzia di Protezione Ambientale degli Stati Uniti (EPA) e cominciò la distribuzione con il nome commerciale EthylBloc[®]. Le applicazioni commerciali su prodotti destinati all'alimentazione umana sono state poi avviate dalla Agrofresh Inc., sotto il nome commerciale SmartFresh[®]. A temperatura e pressione standard, l'1-MCP si trova allo stato gassoso, ha formula molecolare C_4H_6 e peso molecolare di 54 g mol⁻¹. La sicurezza e la tossicità dell'1-MCP nei confronti dell'uomo, degli animali e

dell'ambiente hanno dato risultati estremamente favorevoli (EPA, 2002): il composto viene usato a basse concentrazioni, ha una modalità d'azione non-intossicante ed è chimicamente simile a molte sostanze naturali innocue; durante i test eseguiti su cavie, non è stato registrato nessun segnale clinico di tossicità ne tantomeno fenomeni di mortalità. Inoltre, anche l'UE ha emanato un rapporto di valutazione in merito (vd. Appendice A).

L'1-MCP si lega ai recettori dell'etilene in maniera tale da prevenire il legame dell'etilene e tutte le reazioni a cascata indotte dall'azione dell'ormone (Sisler e Serek, 1997) (Fig. 2.4). Secondo Sisler e Serek (1997), l'1-MCP andrebbe ad interferire con lo stesso sito di legame dell'etilene, occupandolo al suo posto, secondo il seguente modello:

1. l'etilene va ad interagire con il metallo presente nella porzione sensore del recettore etilenico, sottraendo temporaneamente elettroni;
2. un ligando, in posizione trans rispetto all'etilene, uscirebbe dal complesso mentre un secondo ligando lo sostituirebbe contemporaneamente all'uscita dell'etilene;
3. l'effetto finale è di aver sostituito un ligando con un altro, così da formare un complesso attivo.
4. L'1-MCP, in entrata, si comporta esattamente come l'etilene, ma non esce dal complesso, perciò non si può formare il complesso attivo.

Il modello suddetto non troverebbe riscontro in alcune prove. In particolare, sembra che il sito di legame per l'etilene non sia più disponibile una volta che vi si è legato l'1-MCP, perché concentrazioni di etilene fino a $1000 \mu\text{l l}^{-1}$ non sono riuscite a provocare in petali di garofano la tipica risposta di avvizzimento, dopo il trattamento con 1-MCP a concentrazioni molto più basse (50 nl l^{-1} per 6 h, a 24°C). Questa ed altre evidenze sperimentali hanno concorso nell'elaborare un nuovo modello (Celikel e Reid, 2001):

1. Si suppone che i cambiamenti allosterici relativi all'attività della chinasi del recettore (il secondo dominio individuato su di esso) scoprano nel dominio sensore una regione di amminoacidi in grado di interagire con l'1-MCP; quando l'1-MCP si lega, l'attività chinasi è irreversibilmente attivata

e il sito di legame per l'etilene non è esposto, cosicché il regolatore svolge il suo blocco sui processi etilen-indotti;

2. Tuttavia, se l'etilene anticipa l'1-MCP, può trovare scoperta la regione contenente il suo sito di legame, legarsi ad esso e così impedire sia il cambiamento allosterico che renderebbe possibile il legame del recettore con l'1-MCP, sia l'attività chinasi regolatrice negativa dei processi etilen-indotti.

Riguardo alle applicazioni e agli effetti, proprio per le caratteristiche appena citate, l'1-MCP previene gli effetti etilene-indotti in una vasta serie di prodotti ortofrutticoli. L'effetto dell'1-MCP include l'inibizione del ripenio dei pomodori (Serek *et al.*, 1995b; Sisler *et al.*, 1996b; Wills e Ku, 2002) e del mango (Jiang e Joyce, 2000), il ritardo della senescenza delle fragole (Ku *et al.*, 1999) e dei broccoli (Ku e Wills, 1999), l'inibizione dello sverdimento degli agrumi (Porat *et al.*, 1999), la riduzione dell'incidenza del danno da freddo nel melone (Ben-Amor *et al.*, 1999) ed il controllo dell'imbrunimento interno (*black heart*) dell'ananas (Selvarajah *et al.*, 2001). Inoltre, l'incremento dell'espressione dei geni che codificano per gli mRNA nel Sistema 2 di produzione di etilene nel pomodoro (*LE-ACS2*, *LE-ACS4* e *LE-ACO1*), viene ampiamente controllato dai trattamenti con 1-MCP.

È stato dimostrato che l'efficacia del trattamento è legata allo stadio di maturazione, alla cultivar e alla concentrazione utilizzata, ed esiste una interazione tra tempi, temperature e concentrazioni del trattamento. Riguardo alle temperature di trattamento, sulle mele, un'applicazione a 3°C richiedeva 9 ore di trattamento, mentre a temperature più elevate erano necessarie solo 6 ore per prolungare la maturazione (DeEll *et al.*, 2002). Considerando le concentrazioni attive, le risposte ai trattamenti variano notevolmente a seconda del frutto considerato. Per rallentare la maturazione delle mele erano necessario 1 $\mu\text{l l}^{-1}$ (Sisler *et al.*, 1996a), mentre per bloccare l'azione dell'etilene su broccoli le concentrazioni variavano tra 1 e 12 $\mu\text{l l}^{-1}$ (Fan e Mattheis, 2000a; Able *et al.*, 2002a). In relazione alla cultivar, emergevano altre differenze ancora. Infatti, nelle mele "McIntosh" e "Law Rome"

la risposta all'1-MCP era più dipendente dalla concentrazione rispetto alle cultivar "Delicious" ed "Empire" (Watkins *et al.*, 2000). Dalle ricerche di Botondi *et al.* (2003) emergevano differenze sia nella composizione aromatica sia nell'attività glicosidasi tra diverse varietà di albicocche in risposta alle medesime concentrazioni applicate.

Per quanto riguarda gli effetti osservati sulle banane, si rimanda al Capitolo 3, dove verrà esposto lo stato dell'arte in merito all'applicazione e agli effetti dell'1-MCP su questo frutto.

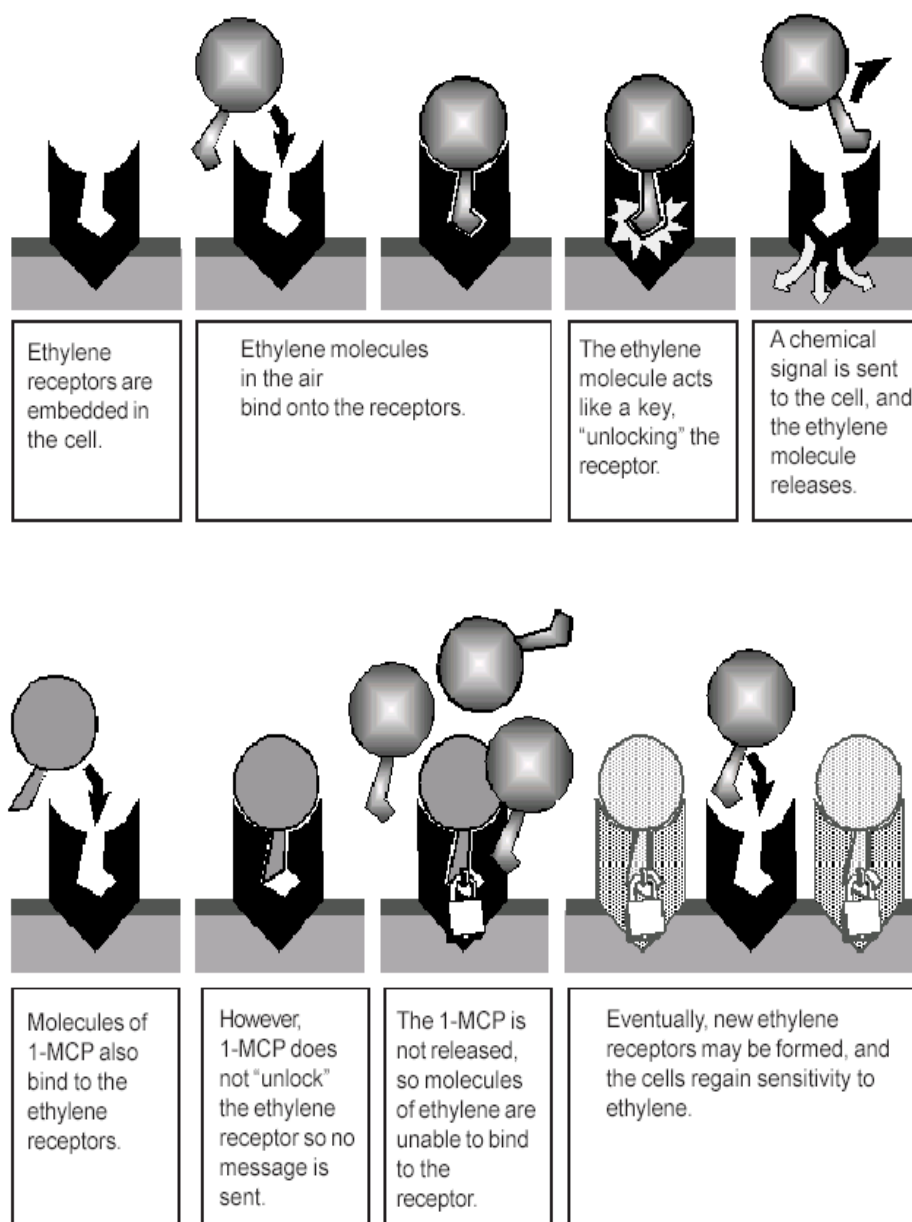


Fig. 2.4 In alto: il legame dell'etilene con il recettore "sblocca" il recettore e viene lanciato un segnale chimico alle cellule che permette la cascata di reazioni. In basso: l'1-MCP si lega al recettore dell'etilene, non avviene lo "sbloccaggio" del recettore e la molecola resta legata, in maniera tale da non permettere all'etilene di legarsi e di esercitare la sua azione (diagramma eseguito da Jenny Bower, Dept. of Pomology, UC Davis).

3. La maturazione postraccolta della banana

3.1 Maturità del frutto, green life e ripenio

La green life (letteralmente “vita verde”) del frutto rappresenta il tempo che intercorre tra la raccolta del frutto maturo e l’inizio del climaterio respiratorio, in altre parole la fase pre-climaterica subito dopo la raccolta (Peacock e Blake, 1970; Turner, 1997). Una banana ad un determinato stadio di maturazione ha una green life potenziale: ogni trattamento o situazione ambientale che possa costituire causa di stress per il frutto, può portare ad una riduzione della green life o all’immediato instaurarsi della fase climaterica (Burg, 1962). Risulta quindi di primaria importanza il controllo del climaterio respiratorio per prolungare la conservazione delle banane (Salminen e Young, 1975).

Con il proseguire dello sviluppo del frutto (misurato come numero di giorni dall’antesi o dall’emergenze del casco) esso diventa sempre più ‘maturo’. La maturità alla raccolta è l’età fisiologica del frutto al momento della raccolta commerciale (Liu, 1978) e racchiude i requisiti per la maturità fisiologica: in altre parole, al momento della raccolta il frutto deve aver raggiunto uno stadio di sviluppo tale che possa poi sviluppare caratteristiche di edibilità e serbevolezza accettabili. Inoltre, altre considerazioni di ordine commerciale possono portare a dei compromessi tra maturità alla raccolta e, ad esempio, determinate richieste del mercato in termini di standard di qualità quali pezzatura e colore del frutto o la necessità di garantire una green life più lunga per raggiungere mercati più lontani (Wills *et al.*, 1998).

Col proseguire della maturazione il frutto aumenta in peso ma diminuisce la green life (Turner e Rippon, 1973). Per ogni settimana di anticipo rispetto alla maturità commerciale, la green life aumenta di 3-5 giorni, ma il peso del casco diminuisce di circa il 10% (Peacock, 1975). Una maturità ottimale permetterà al frutto di raggiungere una buona pezzatura (Hord e Spell, 1962) e gradevoli caratteristiche

organolettiche (McGlasson, 1985) garantendo al tempo stesso una green life sufficientemente lunga tale da permetterne la commercializzazione nel mercato prescelto (Thompson e Burden, 1995; Turner, 1997).

E' da tempo risaputo che l'applicazione di etilene esogeno promuove la maturazione di diversi frutti, banane comprese (Sievers & True, 1912). Questo fenomeno può essere sfruttato per eseguire misurazioni affidabili della maturità del frutto su banane raccolte nella fase pre-climaterica, in quanto con il proseguire della maturazione il frutto aumenta la sensibilità all'etilene (Burg, 1962; Burg e Burg, 1964). Al contrario, frutti raccolti più anticipatamente avranno una green life più lunga rispetto a frutti più maturi raccolti nella stessa stagione da piante simili cresciute sotto le stesse condizioni, proprio per la minore sensibilità all'etilene (Liu, 1976a; Marriott *et al.*, 1979; McGlasson, 1985).

Il termine della green life è segnato dall'inizio della fase di *ripening* (Peacock e Blake, 1970), fase climaterica o di ripenio. Durante questa fase nella banana avviene una sequenza di cambiamenti quali il viraggio del colore della buccia dal verde al giallo e i cambiamenti nel gusto, nell'aroma e nella consistenza della polpa, dovuti alla conversione dell'amido in zuccheri; a questi fenomeni si aggiunge la perdita di consistenza legata ai cambiamenti nella parete cellulare e, col proseguire della fase climaterica, si assiste all'evoluzione delle sostanze volatili (John e Marchal, 1995; Wills *et al.*, 1998) (Fig. 2.5).

La via più efficace per ridurre la green life ed indurre l'inizio della fase climaterica è quella di somministrare al frutto un'appropriata concentrazione di etilene. Comunque, mentre le banane producono piccole quantità di etilene che in certe circostanze può essere sufficiente ad avviare il climaterio, queste non sempre maturano immediatamente (Burg e Burg, 1964). Ad esempio, banane raccolte ad uno stadio "light full $\frac{3}{4}$ " matureranno a 24°C in 1-2 settimane, mentre sulla pianta rimarrebbero verdi per 40-50 giorni.

E' stato osservato che la sensibilità dei tessuti di banana all'etilene aumenta dopo la raccolta in un certo numero di cultivar (Burg e Burg, 1965a), compresa la 'Williams' (Vendrell e McGlasson, 1971), forse a causa della presenza di qualche sostanza inibitrice che dopo la raccolta del frutto viene a mancare (Burg e Burg,

1965a). Questo “inibitore endogeno del ripenio” (Liu, 1976b), che si pensa limiti l’attività dell’ACS (Hoffman e Yang, 1982), potrebbe essere l’acido indolacetico (IAA) (Vendrell, 1969), l’effetto del quale declina gradualmente dopo la raccolta. Comunque, la presenza di un inibitore endogeno è stata contestata da Lieberman (1979). Un’ipotesi alternativa trarrebbe in causa l’attività integrata degli ormoni di crescita con l’intera pianta mantenuta fin quando il frutto è attaccato alla pianta stessa, attività persa o alterata col tempo dopo il distacco dalla pianta madre (Lieberman, 1979). Teorie più recenti legano questo evento al fatto che il numero di recettori per l’etilene aumenta con il progredire della maturazione (Sisler e Serek, 1997), o al fatto che l’enzima ACC ossidasi (ACO) aumenta la sua attività durante la maturazione, producendo così abbastanza etilene da stimolare l’attività dell’ACS (Bufler, 1986; Dominguez e Vendrell, 1993).

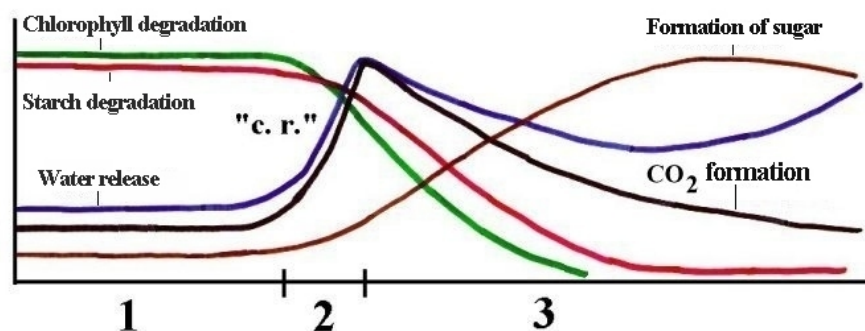


Fig. 2.5 Sequenza dei cambiamenti che avvengono durante il *ripening* della banana. 1, fase preclimaterica (colorazione verde); 2, fase climaterica (viraggio del colore dal verde al giallo); 3, fase postclimaterica (colorazione gialla). “c.r.”, climateric rise = picco climaterico.

Nei frutti climaterici, tra i quali banane, mango, pomodori e mele, si assiste ad un pronunciato aumento della respirazione in corrispondenza della fase di ripenio: questi frutti sono detti climaterici (Wills *et al.*, 1998). In questi frutti, la fase di ripenio viene rapidamente indotta quando la quantità di etilene presente eguaglia o supera un determinata soglia in termini di concentrazione e di tempo di esposizione. La dose minima di etilene esogeno capace di promuovere il ripenio in banane “Gros Michel” è di 0,1-1,0 $\mu\text{l l}^{-1}$ (Burg, 1962; Burg e Burg, 1962) e 0,1 μl

l^{-1} si pensa sia proprio la concentrazione soglia per avviare il ripenio delle banane (Biale *et al.*, 1954; Burg e Burg, 1962; Brady *et al.*, 1970; Liu, 1976c; Inaba and Nakamura, 1988). Comunque, Peacock (1972) affermava che qualsiasi livello di etilene porta ad una diminuzione della green life, e l'efficacia varia in funzione del logaritmo della concentrazione e del tempo di esposizione. Inoltre, brevi periodi di esposizione all'etilene possono non indurre immediatamente il ripenio, ma rendere i tessuti più sensibili all'etilene (Liu *et al.*, 1985; Bufler, 1986; Halevy e Mayak, 1981; Hoffman e Yang, 1982).

La concentrazione endogena di etilene è generalmente molto più elevata di quella esterna di $0,1-1,0 \mu l l^{-1}$ prima che il climaterio respiratorio abbia inizio (Burg, 1962). Ad esempio, banane conservate in un'atmosfera contenente etilene ad una concentrazione inferiore agli $0,005 \mu l l^{-1}$, presentavano una concentrazione di etilene endogeno di $0,05-2,1 \mu l l^{-1}$ (Burg e Burg, 1962). Durante lo sviluppo di banane "Lacatan" l'etilene endogeno rimaneva particolarmente costante a $0,14-0,22 \mu l l^{-1}$ fino all'inizio della fase climaterica (Burg e Burg, 1965b). Questi autori constatarono che per avere un'efficacia l'etilene esogeno deve essere somministrato a concentrazioni uguali o superiori a quella interna al frutto, in quanto una concentrazione minore non influenzerebbe la concentrazione intercellulare pre-esistente ad un livello tale da generare una risposta. Comunque, per Peacock (1972), il concetto secondo il quale l'etilene endogeno stimolerebbe l'inizio del ripenio solo una volta superata una certa soglia risultava inadeguato e concluse che l'etilene endogeno è fisiologicamente attivo durante tutto il corso della green life. A supporto di questa teoria Liu (1976c) constatò che $0,01-0,1 \mu l l^{-1}$ di etilene aumentavano l'attività respiratoria di banane "Dwarf Cavendish" e che concentrazioni di $0,015-0,05 \mu l l^{-1}$ riducevano la shelf-life in 2/3 dei lotti di banane testati. L'autore concluse che la concentrazione soglia per l'azione dell'etilene nelle banane era inferiore a $0,015 \mu l l^{-1}$. Queste piccole concentrazioni influenzano la respirazione dei tessuti (Burg e Burg, 1962). Esistono, quindi, due approcci per gestire la green life: modificare la quantità di etilene presente o ridurre la sensibilità del frutto all'etilene.

Riguardo alla fase climaterica, l'etilene prodotto durante questo periodo può, come precedentemente riportato, mediare i cambiamenti associati al ripenio, quali ad esempio il cambiamento di colore e la perdita di consistenza. In riferimento al viraggio del colore, viene definita shelf life il tempo che impiega il frutto di banana (espresso in "giorni di shelf life") per passare dallo stadio di colore 4 allo stadio di colore 7 (Paull, 1996) (Fig. 2.6). L'apparente eccesso di etilene che accompagna il ripenio è necessario per la completa integrazione di tutti i processi che avvengono nel frutto in questa fase (Quazi e Freebairn, 1970). Burg e Burg (1962) osservarono che banane maturate a 16 °C e 24 °C presentavano livelli interni di etilene di 0,1 $\mu\text{l l}^{-1}$ fino al giorno prima dell'inizio del climaterio, quindi i

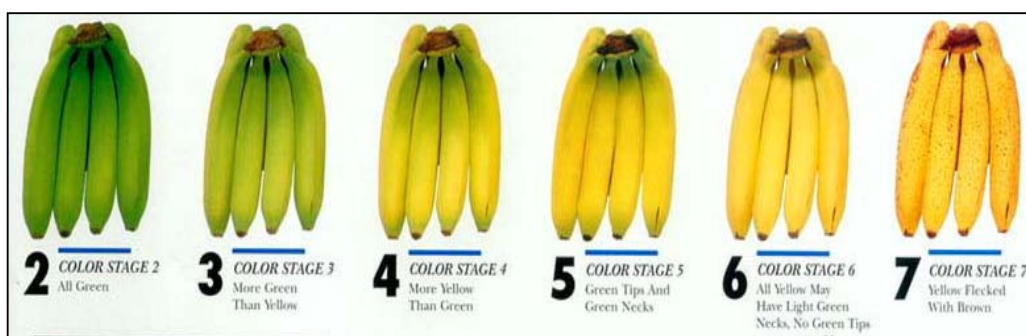


Fig. 2.6 Banana color chart. Sequenza dei cambiamenti di colore della buccia che avvengono durante il *ripening* della banana. Il *colour stage* (stadio di colore) viene associato ad un numero per permettere agli operatori del settore un immediata correlazione con lo stadio di maturazione. Questo metodo, inoltre, facilita le operazioni di distribuzione a livello globale.

livelli raddoppiavano (a 24 °C) o triplicavano (a 16 °C). Quando un innalzamento nei livelli di CO₂ veniva rilevato (a conferma dell'inizio del climaterio respiratorio), la concentrazione interna di etilene era superiore a 1,5 $\mu\text{l l}^{-1}$. Questo picco nella produzione di etilene durava 3 giorni e coincideva con i maggiori cambiamenti di colore e consistenza. I massimi livelli interni di etilene erano di 6 $\mu\text{l l}^{-1}$ a 16 °C e di 40 $\mu\text{l l}^{-1}$ a 24 °C e coincidevano con l'inizio dell'innalzamento dei livelli di CO₂ un temporaneo declino nella produzione di etilene coincideva con il picco di produzione di CO₂. Questo depone a favore del fatto che l'etilene, nella banana, sia un ormone della maturazione (Burg e Burg, 1962).

Nel caso di banane ed avocado, le tecniche gas-cromatografiche mostrano che ben prima del climaterio, la concentrazione intercellulare di etilene aumenta fino ad un livello tale da stimolare il ripenio dei frutti (Burg e Burg, 1965a). Peacock (1972) espose le banane a brevi trattamenti con elevate concentrazioni di etilene e notò che sebbene la fase di ripenio non fosse immediatamente stimolata, la green life dei frutti si riduceva, segnale questo dell'attività fisiologica dell'etilene nel corso della green life del frutto.

3.3 Effetto dell'1-MCP sulla maturazione della banana

Come esposto in precedenza l'1-MCP ritarda o riduce gli effetti etilene-indotti in una vasta gamma di frutti e vegetali.

Comunque, mentre l'1-MCP ha dimostrato una certa efficacia nel ritardare il ripenio delle banane, le concentrazioni attive utilizzate nei diversi studi disponibili, risulta alquanto variabile. Sisler *et al.* (1996b) hanno mostrato che l'esposizione a $0,01 \mu\text{l l}^{-1}$ per 24 ore era sufficiente a proteggere le banane per 11-12 giorni contro 18 ore di trattamento con $1000 \mu\text{l l}^{-1}$ di etilene, mentre banane trattate con $0,0007$ non beneficiavano di nessuna protezione dagli effetti dell'etilene. Secondo le esperienze di Golding *et al.* (1998) un trattamento di $450 \mu\text{l l}^{-1}$ prolungava la green life delle banane mantenute in atmosfera normale per 20-30 giorni, e per 2-20 giorni quella dei frutti tenuti continuamente in presenza di $500 \mu\text{l l}^{-1}$ di propilene. Gli stessi autori riportarono che 1 ora di esposizione a $45 \mu\text{l l}^{-1}$ di 1-MCP estendeva la green life solo se l'applicazione veniva fatta 6 o 12 ore dopo l'inizio del trattamento con propilene, ma non dopo 24 ore di esposizione. Macnish *et al.* (1997) hanno dimostrato un'estensione della shelf life delle banane a 20°C effettuando un trattamento con $15 \mu\text{l l}^{-1}$ di 1-MCP, pari a quattro volte quella dei frutti non trattati e ugualmente esposti all'etilene. Jiang *et al.* (1999a) hanno mostrato come l'esposizione di 24 ore a $0,5$ o $1 \mu\text{l l}^{-1}$ di 1-MCP a 20°C estendeva la green life da 16 a 31 giorni rispetto ai frutti del controllo. Jiang *et al.* (1999b) dimostrarono che 1 ora di trattamento con $1 \mu\text{l l}^{-1}$ di 1-MCP a 20°C eliminava gli effetti del trattamento con $100 \mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per almeno 5 giorni (la durata

dell'esperimento). In questi esperimenti non veniva fatto alcun riferimento allo stadio di maturazione del frutto (*i.e.* giorni dall'emergenza del casco alla raccolta), che potrebbe aver influenzato il decorso maturativo, in quanto la sensibilità all'etilene aumenta con l'aumentare dell'età fisiologica del frutto. Di fatto, Harris *et al.* (2000) osservarono che 500 nl l⁻¹ di 1-MCP erano più efficaci nell'estendere la green life nei frutti più immaturi rispetto a quelli raccolti ad uno stadio più avanzato. Bagnato *et al.* (2003) verificarono che l'applicazione di 1-MCP a differenti concentrazioni poteva estendere la shelf life delle banane dopo 48 ore di trattamento con etilene senza compromettere la qualità dei frutti. Per contro, Pelayo *et al.* (2003) riportarono che l'efficacia dell'1-MCP era troppo inconsistente per un'applicazione commerciale. Questi autori constatarono che in alcuni esperimenti, trattando banane ad uno stadio 3-4, con 1000 nl l⁻¹ per 6 o 24 ore, la produzione di etilene era maggiore ma i tassi respiratori ridotti e che i cambiamenti nel colore della buccia e nella consistenza della polpa risultavano ritardati senza nessun impatto negativo sulla composizione aromatica del frutto. Ma nei successivi esperimenti su banane allo stesso stadio l'azione dell'1-MCP fu giudicata meno efficace.

4. Scopo della tesi

Con questo Progetto di Dottorato è stato portato avanti uno studio che mirava alla comprensione degli effetti dell'1-metilciclopropene (1-MCP) sulla maturazione postraccolta delle banane (*Musa* sp., gruppo AAA, sottogruppo Cavendish, cultivar Williams). Questo composto gassoso previene gli effetti etilene-indotti in una vasta gamma di frutti attraverso il legame con i recettori dell'etilene (Sisler and Serek, 1997).

Dopo la raccolta le banane vengono trasportate ai mercati di destinazione ma, prima di arrivare alla fase di vendita al dettaglio, devono essere trattate commercialmente con etilene per indurre la fase climaterica, durante la quale il frutto sviluppa le tipiche caratteristiche di aroma, gusto e colore che ne fanno un frutto particolarmente apprezzato da tutte le fasce di consumatori. Sebbene siano sufficienti concentrazioni di 10–50 $\mu\text{l l}^{-1}$ (Thompson e Seymour, 1982), nella pratica commerciale vengono utilizzate concentrazioni saturanti dell'ordine di 500-1000 $\mu\text{l l}^{-1}$ allo scopo di garantire una maturazione uniforme di polpa e buccia. Infatti, senza il trattamento commerciale con etilene la polpa dei frutti tende ad ammorbidire ma la buccia acquisisce una colorazione opaca giallo-pallido, decisamente poco attrattiva.

Purtroppo, una volta indotto il climaterio con etilene, a seconda delle condizioni di conservazione (temperatura, umidità, quantità di etilene esogeno) e varietali, nel giro di 3-5 giorni si osserva un rapido decadimento qualitativo. Va inoltre ricordato che la banana, essendo un frutto tropicale, teme l'esposizione alle basse temperature.

Risulta quindi di estremo interesse commerciale la ricerca di un mezzo che permetta un mantenimento delle caratteristiche qualitative durante la fase di conservazione e distribuzione delle banane.

5. Materiali e metodi

5.1 Materiali e metodi relativi alla sperimentazione condotta presso il Laboratorio Postraccolta del Dipartimento di Tecnologie Agroalimentari dell'Università di Viterbo

5.1.1 Frutti

Per la sperimentazione sono stati utilizzati box commerciali di banane (Musa sp., gruppo AAA, sottogruppo Cavendish, cultivar Williams) forniti dal Centro di Distribuzione Dole di S. Palomba (Roma). Questi frutti (come la quasi totalità delle banane importate in Europa) provengono dalle piantagioni dell'area Centro-Americana (Costarica, Ecuador). Per ogni lotto/trattamento venivano testate 10 banane per la produzione di etilene e di CO₂, per il colore della buccia, per la consistenza e la deformabilità della polpa e per il contenuto in solidi solubili.

5.1.2 Trattamenti con etilene

I frutti venivano posizionati in celle a tenuta di gas da 300 l ed il ripenio veniva indotto tramite l'esposizione al gas etilene (C₂H₄) stoccato in bombole collegate alle celle utilizzate per il trattamento. All'interno delle celle veniva inoltre posizionata della calce per impedire un eccessivo accumulo di CO₂.

5.1.3 Sintesi ed applicazione dell'1-MCP

L'1-MCP (SmartFresh™, Agrofresh Ltd.) è stato sintetizzato utilizzando il kit fornito dalla casa produttrice seguendo la procedura consigliata dalla casa stessa. In un becker veniva posta una tavoletta di "Light Orange SmartFresh™ Tablets" ed una di "Blue Activator", quindi veniva aggiunta una Soluzione Attivante. Una tavoletta di "Light Orange SmartFresh™" libera 200 nl l⁻¹ di 1-MCP in un volume di 300 l. Il becker veniva quindi posto nelle celle a tenuta di gas in presenza delle banane da trattare.

5.1.4 Produzione di etilene e respirazione

Ad ogni prelievo i singoli frutti venivano posti in dei contenitori di vetro a chiusura ermetica da 2,8 l forniti di un setto per il campionamento di etilene. La produzione di etilene veniva misurata iniettando 1 ml di gas prelevato dallo spazio di testa in un gas cromatografo Fractovap 4200 (Carlo Erba Spa, Milano, Italia) equipaggiato con un detector a ionizzazione di fiamma (FID) e colonna di allumina attivata da 1 m (80-100 mesh) riscaldata a 100°C. I risultati venivano espressi come $\mu\text{l kg}^{-1} \text{h}^{-1}$.

Il tasso respiratorio veniva determinato tramite un analizzatore ad infrarossi OXYCARB (Isolcell, Italia) ed espresso come $\text{ml kg}^{-1} \text{h}^{-1}$.

5.1.5 Rilievi colorimetrici

L'analisi colorimetrica della buccia è stata eseguita tramite un colorimetro Minolta CM-2600d (Minolta CO., LTD, Japan), posizionando il sensore in prossimità della zona equatoriale del frutto. I risultati sono stati espressi attraverso le abbreviazioni del sistema CIELAB (L^* , a^* , b^*) e riportando i valori come a^* e come H° (Hue angle).

5.1.6 Consistenza e deformabilità della polpa

L'analisi della consistenza è stata effettuata con un penetrometro da tavolo del tipo Fruit Pressure Tester 327 (Effegi, Gaiarine, Ravenna, Italy). Da una sezione trasversale prelevata dalla parte centrale del frutto veniva tolta la buccia e si applicava una pressione fino alla completa rottura della polpa. I risultati venivano espressi come kg cm^{-2} .

Lo studio della deformabilità rappresenta un'analisi non distruttiva della consistenza della polpa. Il test è stato eseguito mediante un Instron Universal Testing Machine mod 4301 (Instron Inc., Canton, MS, USA), equipaggiato di un puntale di 35 mm di diametro. La forza di compressione era impostata a 10 N e la velocità di discesa della traversa era di 10 mm min^{-1} .

5.1.7 Contenuto in solidi solubili

Cinque grammi di polpa di banana venivano omogeneizzati con 10 ml di acqua distillata, quindi si procedeva alla centrifugazione per 10 minuti a 5000 rpm. La determinazione finale del grado rifrattometrico veniva fatta ponendo una piccola quantità del surnatante in un rinfuso di acqua distillata, si omogeneizzava il prodotto così ottenuto e si procedeva quindi alla centrifugazione (10 minuti a 5000 rpm). La determinazione finale veniva fatta ponendo una piccola quantità del surnatante in un rifrattometro RL-2 (Abbè, Officine Galileo, Firenze, Italia) ed il contenuto in solidi solubili veniva espresso come gradi Brix.

5.2 Materiali e metodi relativi alla sperimentazione condotta presso il Gosford Horticultural Institute del NSW Department of Primary Industries (Gosford, NSW, Australia)

5.2.1 Frutti

Per la sperimentazione sono state utilizzate banane (*Musa* sp., gruppo AAA, sottogruppo Cavendish, cultivar Williams) ottenute da una coltivazione sita in Coffs Harbour (NSW, Australia). Per ogni lotto/trattamento venivano testate cinque banane (una per ogni casco) per la produzione di etilene e di CO₂, la consistenza della polpa e il colore della buccia, contenuto e fluorescenza della clorofilla nella buccia e contenuto in solidi solubili.

5.2.2 Trattamenti con etilene

I frutti venivano posizionati in un contenitore da 60 l a tenuta di gas ed il ripenio veniva indotto tramite l'esposizione al gas etilene (C₂H₄) stoccato in bombole collegate ai contenitori utilizzati per il trattamento. All'interno dei contenitori veniva inoltre posizionata della calce per impedire un eccessivo accumulo di CO₂.

5.2.3 Sintesi ed applicazione dell'1-MCP

L'1-MCP veniva sintetizzato a partire dal formulato commerciale Ethylbloc® (ingrediente attivo 1-MCP 3,3%; Rohm and Haas, Australia). L'adeguata quantità

di Ethylbloc® veniva messa in un becker da 30 ml che veniva successivamente sistemato in un contenitore a tenuta di gas da 220 l nel quale erano state posizionate le banane da trattare. Nel becker veniva aggiunta una adeguata quantità di acqua distillata ed i contenitori venivano sigillati e tenuti a 20°C per tutta la durata del trattamento.

5.2.4 Produzione di etilene e respirazione

L'etilene veniva rilevato tramite un gas-cromatografo GowMac Model 580 con colonna di allumina attivata (2m x 2mm DI, acciaio inossidabile) e detector a ionizzazione di fiamma, con azoto come gas carrier (28 ml min⁻¹), idrogeno (20 ml min⁻¹), aria (300 ml min⁻¹). La quantità di gas iniettata era di 1 ml ed il limite inferiore di rilevamento era di 0.01 ml l⁻¹.

La produzione di CO₂ veniva determinata in un sistema di respirazione flow-through tramite analizzatore ad infrarossi IRGA (Horiba Model PIR-2000, Kyoto, Japan).

5.2.5 Produzione di etanolo e acetaldeide

La produzione di etanolo e acetaldeide veniva monitorata per via gas-cromatografica: i frutti venivano posti in barattoli (1.6 l) di vetro sigillati a 20°C ed 1 ml dello spazio di testa veniva iniettato in un gas-cromatografo Varian Model Star 3400 CX.

5.2.6 Consistenza della polpa

La consistenza della polpa veniva misurata su una fettina trasversale di polpa di banana del diametro di 1 cm (senza buccia) tramite un penetrometro Effegi (diametro del puntale 8 mm) montato su un bancale da laboratorio.

5.2.7 Rilievi colorimetrici

Il colore della buccia veniva rilevato sui due lati opposti nella parte centrale del frutto con un colorimetro Minolta CR-400, usando le abbreviazioni del sistema CIELAB (L*, a*, b*) e riportando i valori come Hue angle.

5.2.8 *Fluorescenza e contenuto in clorofilla*

Sulla stessa porzione di buccia utilizzata per i rilievi colorimetrici, veniva misurata sia la fluorescenza della clorofilla (parametri Fm, Fv) mediante un fluorimetro OS-30p (Opti-Science, MA, USA) settato su modalità “mode 3”, sia il contenuto in clorofilla tramite estrazione in DMF e successiva spettroscopia (Inskeep e Bloom, 1984).

5.2.9 *Contenuto in solidi solubili*

Cinque grammi di polpa di banana venivano omogeneizzati con 10 ml di acqua distillata, quindi si procedeva alla centrifugazione per 10 minuti a 5000 rpm. La determinazione finale del grado rifrattometrico veniva fatta ponendo una piccola quantità del surnatante in un ~~un~~ aggiunti 10 ml di acqua distillate, si omogeneizzava il prodotto così ottenuto e si procedeva quindi alla centrifugazione (10 minuti a 5000 rpm). La determinazione finale veniva fatta ponendo una piccola quantità del surnatante in un rifrattometro digitale da laboratorio (mod. Palette PR-32, Atago Co. ltd, Japan) ed il contenuto in solidi solubili veniva espresso come gradi Brix.

6. Presentazione e discussione dei risultati

6.1 *Effetto dell'1-MCP sulla green life e sulla shelf life dei frutti*

6.1.1 *Preparazione dell'esperimento*

Quattro box commerciali di banane (*Musa* sp., gruppo AAA, sottogruppo Cavendish, cultivar Williams) ad un *colour stage* 2, sono stati prelevati al Centro di Maturazione Dole di S. Palomba (Roma) e trasportati nei nostri laboratori. I frutti sono stati quindi sottoposti a 4 diversi trattamenti:

- CONTROLLO GREEN-LIFE. I frutti non sono stati sottoposti a nessun trattamento e lasciati maturare naturalmente.
- CONTROLLO SHELF-LIFE. I frutti sono stati trattati con 200 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 ore a 20°C.
- ETILENE/1-MCP. I frutti sono stati trattati con etilene (200 $\mu\text{l l}^{-1}$, 24 ore a 20°C) e quindi esposti a 200 nl l^{-1} di 1-MCP per 24 ore a 20°C.
- 1-MCP/ETILENE. I frutti sono stati prima sottoposti ad un trattamento di 200 nl l^{-1} di 1-MCP per 24 ore a 20°C e successivamente trattati con 200 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 ore a 20°C.

I frutti dei diversi lotti sono stati quindi conservati separatamente alla temperatura di 20°C e periodicamente testati per i parametri fisiologici e qualitativi.

6.1.2 *Presentazione e discussione dei risultati*

Effetto dell'1-MCP sulla green life

Nel corso di questo esperimento l'applicazione pre-climaterica di 1-MCP (1-MCP/etilene) mostrava un significativo effetto sull'attività respiratoria sia in termini di intensità sia in termini di prolungamento della green-life (*i.e.* giorni necessari al raggiungimento del climaterio) (Fig. 6.1). In questi frutti un aumento

della produzione di etilene veniva rilevato dopo 18 giorni (Fig. 6.2) ed il tasso respiratorio cominciava a crescere dopo 20 giorni di conservazione a 20°C. I frutti del controllo (controllo-Green Life), invece, mostravano il tipico andamento climaterico, con un picco nella produzione di etilene al 12° giorno e con tassi respiratori che s'innalzavano in maniera sostenuta dopo questa data (Fig. 6.1, 6.2).

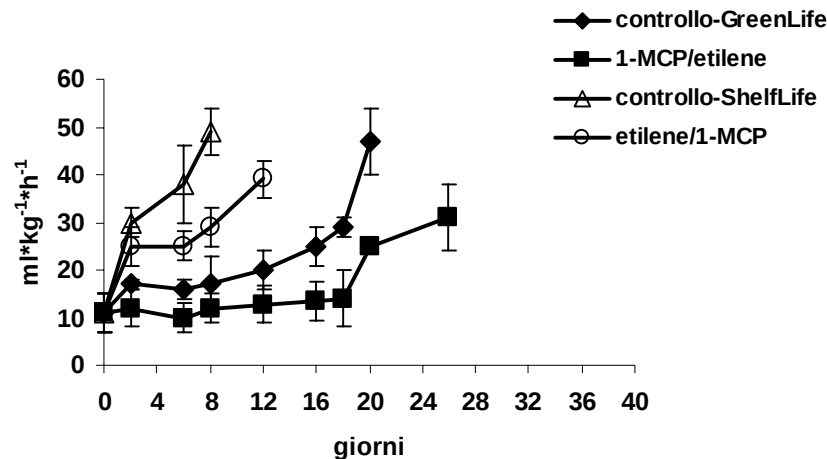


Fig. 6.1 Produzione di CO₂ di banane non trattate né con etilene né con 1-MCP oppure trattate dapprima con 1-MCP (200 nl l⁻¹) per 24 ore a 20°C ed in seguito con etilene (200 µl l⁻¹) per 24 ore a 20°C, oppure trattate solamente con etilene (200 µl l⁻¹) per 24 ore a 20°C, oppure trattate dapprima con etilene (200 µl l⁻¹) per 24 ore a 20°C ed in seguito con 1-MCP (200 nl l⁻¹) per 24 ore a 20°C e conservate a 20°C. Le barre indicano l'errore standard (ES; n = 10). Se assenti, le barre dell'ESM ricadono all'interno delle dimensioni del simbolo.

Effetti simili sono stati notati da Golding et al. (1998): nei loro esperimenti questi autori osservarono che il trattamento con 1-MCP ritardava l'instaurarsi della fase climaterica ed influenzava l'intensità di risposta di questi parametri fisiologici. Jiang et al. (1999a) avevano invece osservato una contemporanea inibizione della produzione di etilene e della respirazione a seguito del trattamento con 1-MCP all'interno di confezioni in film plastico.

L'analisi colorimetrica mostrava sostanzialmente un più rapido ingiallimento delle banane del controllo, come indicato dal passaggio del parametro "a" da valori negativi a valori positivi (scomparsa del colore verde), mentre il viraggio di colore era più lento nelle banane trattate con 1-MCP (Fig. 6.3). Questi ultimi, a differenza del controllo, mantenevano infatti un colore verde più o meno accentuato e cominciavano il viraggio al giallo solamente intorno al 30° giorno di

conservazione (Fig. 6.3). I frutti del controllo non trattato completavano il viraggio tra il 14° ed il 18° giorno di conservazione.

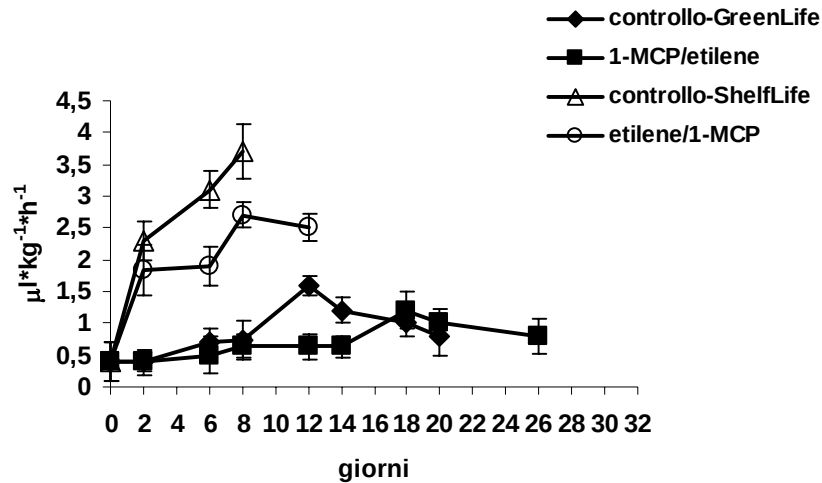


Fig. 6.2 Produzione di etilene di banane non trattate né con etilene né con 1-MCP oppure trattate dapprima con 1-MCP (200 nl l⁻¹) per 24 ore a 20°C ed in seguito con etilene (200 μl l⁻¹) per 24 ore a 20°C, oppure trattate solamente con etilene (200 μl l⁻¹) per 24 ore a 20°C, oppure trattate dapprima con etilene (200 μl l⁻¹) per 24 ore a 20°C ed in seguito con 1-MCP (200 nl l⁻¹) per 24 ore a 20°C e conservate a 20°C. Le barre indicano l'errore standard (ES; n = 10). Se assenti, le barre dell'ES ricadono all'interno delle dimensioni del simbolo.

Per quel che riguarda l'ammorbidimento della polpa, i campioni del lotto 1-MCP/etilene manifestavano un deciso mantenimento della consistenza nel tempo (Fig. 6.4), con valori elevati e più o meno costanti. Questo effetto sull'inibizione della perdita di consistenza delle banane, quando l'1-MCP veniva somministrato prima del trattamento con etilene, è stato rilevato anche da Lohani *et al.* (2004). Gli autori attribuirono questo effetto ad una diminuita sensibilità della pectinmetilesterasi, della poligalatturonasi e della pectato liasi all'azione dell'etilene.

La generalizzata soppressione del metabolismo respiratorio dei frutti, caratteristica della fase fisiologica di green life delle banane, ha fatto sì che l'andamento del contenuto zuccherino avesse un'evoluzione quasi speculare per i 2 trattamenti fino al 12° giorno (Fig. 6.5). Da questo momento in poi il trattamento con 1-MCP manifestava un certo controllo di questo parametro: con l'instaurarsi della fase climaterica nei frutti del controllo, infatti, aumentava il tasso di conversione

dell'amido in zuccheri semplici nella polpa, mentre nei frutti trattati il contenuto in solidi solubili mostrava un andamento costante.

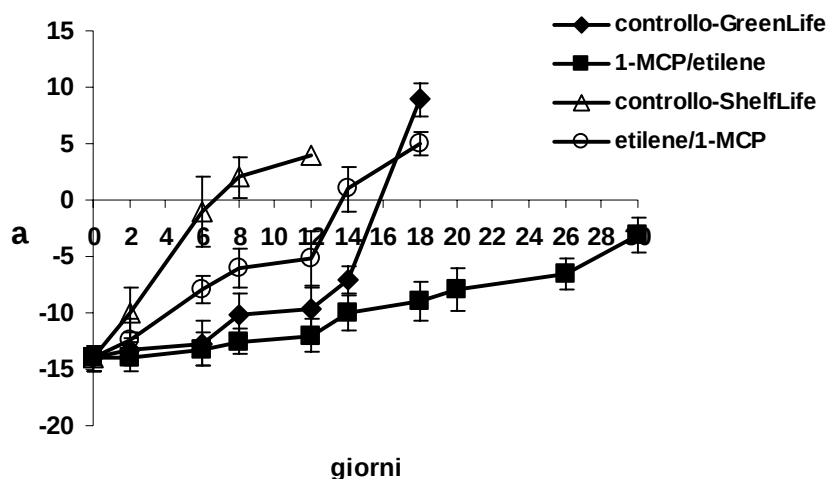


Fig. 6.3 Colore della buccia (a) di banane non trattate né con etilene né con 1-MCP oppure trattate dapprima con 1-MCP (200 nl l⁻¹) per 24 ore a 20°C ed in seguito con etilene (200 µl l⁻¹) per 24 ore a 20°C, oppure trattate solamente con etilene (200 µl l⁻¹) per 24 ore a 20°C, oppure trattate dapprima con etilene (200 µl l⁻¹) per 24 ore a 20°C ed in seguito con 1-MCP (200 nl l⁻¹) per 24 ore a 20°C e conservate a 20°C. Le barre indicano l'errore standard (ES; n = 10). Se assenti, le barre dell'ES ricadono all'interno delle dimensioni del simbolo.

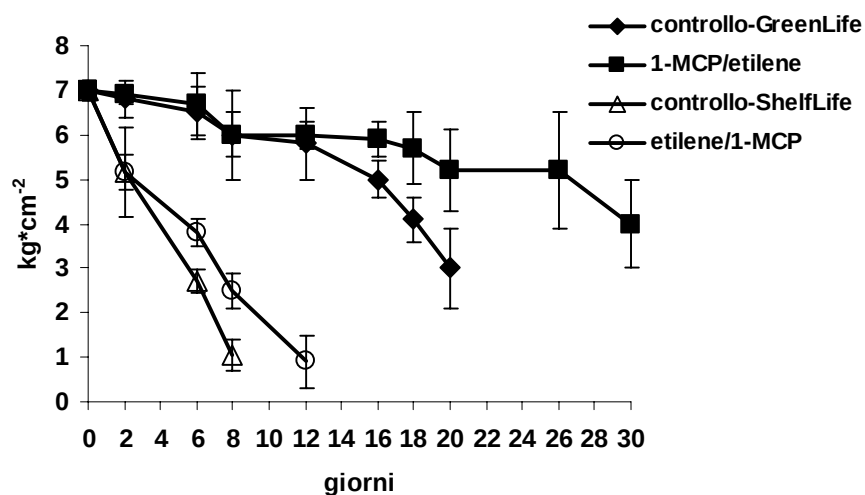


Fig. 6.4 Consistenza della polpa di banane non trattate né con etilene né con 1-MCP oppure trattate dapprima con 1-MCP (200 nl l⁻¹) per 24 ore a 20°C ed in seguito con etilene (200 µl l⁻¹) per 24 ore a 20°C, oppure trattate solamente con etilene (200 µl l⁻¹) per 24 ore a 20°C, oppure trattate dapprima con etilene (200 µl l⁻¹) per 24 ore a 20°C ed in seguito con 1-MCP (200 nl l⁻¹) per 24 ore a 20°C e conservate a 20°C. Le barre indicano l'errore standard (ES; n = 10). Se assenti, le barre dell'ES ricadono all'interno delle dimensioni del simbolo.

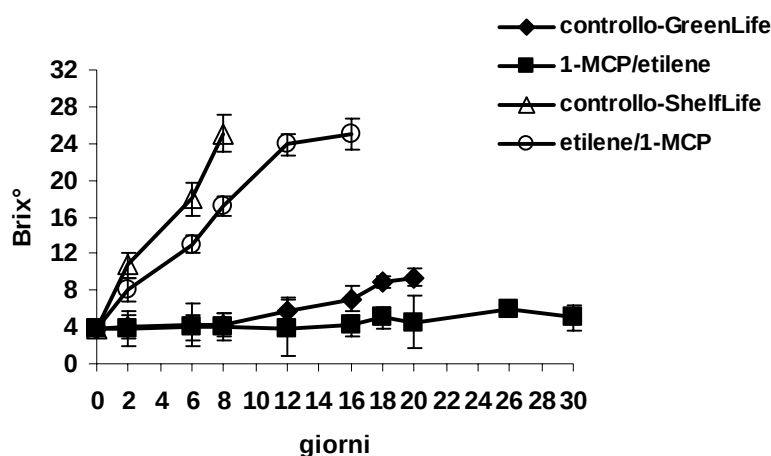


Fig. 6.5 Contenuto in solidi solubili di banane non trattate né con etilene né con 1-MCP oppure trattate dapprima con 1-MCP (200 nl l⁻¹) per 24 ore a 20°C ed in seguito con etilene (200 µl l⁻¹) per 24 ore a 20°C, oppure trattate solamente con etilene (200 µl l⁻¹) per 24 ore a 20°C, oppure trattate dapprima con etilene (200 µl l⁻¹) per 24 ore a 20°C ed in seguito con 1-MCP (200 nl l⁻¹) per 24 ore a 20°C e conservate a 20°C. Le barre indicano l'errore standard (ES; $n = 10$). Se assenti, le barre dell'ES ricadono all'interno delle dimensioni del simbolo.

Effetto dell'1-MCP sulla shelf life

In questo esperimento, a differenza del precedente, tutte le banane erano già state indotte al ripenio tramite il trattamento con 200 µl l⁻¹ di etilene. Di conseguenza, la produzione di etilene endogeno ed i processi di ripening erano già fase di svolgimento sia nei campioni del controllo (controllo-ShelfLife) che in quelli successivamente trattati con 1-MCP (etilene/1-MCP).

Nelle Figure 6.1 e 6.2 sono riportati gli andamenti del tasso respiratorio e della produzione di etilene. Dall'analisi dei dati, si evince che questi parametri fisiologici venivano influenzati in maniera differente dal trattamento con 200 nl l⁻¹ di 1-MCP. L'effetto del composto sulla respirazione risultava più marcato rispetto all'azione esercitata sulla produzione di etilene endogeno. Il climaterio respiratorio non veniva posticipato nel tempo come nel caso delle prove di green life ma risultava comunque inferiore in termini di magnitudo rispetto ai frutti del controllo (Fig. 6.1). Per quel che riguarda la produzione di etilene, anche in questo caso il climaterio non veniva posticipato nei campioni trattati e le differenze in termini di etilene svolto erano meno evidenti rispetto a quanto riscontrato nei tassi respiratori

(Fig. 6.2). La spiegazione di tale andamento va probabilmente ricercata nelle peculiari caratteristiche di azione dell'1-MCP. Questo composto è infatti un inibitore della percezione dell'etilene ed i nostri dati mostrano che il trattamento con 1-MCP non sia riuscito ad intervenire sul meccanismo di produzione autocatalitica tipico dei frutti in fase di ripenio, ma che abbia comunque fornito protezione dagli effetti indotti dall'ormone (questo effetto sarà evidenziato in seguito durante la discussione dei risultati delle analisi colorimetriche).

La maggiore influenza dell'1-MCP sul metabolismo respiratorio rispetto alla produzione di etilene endogeno è stata osservata anche da Golding *et al.* (1998): questi autori notarono che l'applicazione di $45 \mu\text{l l}^{-1}$ di 1-MCP per 6 ore dopo un trattamento con propilene (composto analogo all'etilene) di $500 \mu\text{l l}^{-1}$ non riusciva ad inibire il climaterio respiratorio ed etilenico. Inoltre, gli stessi autori, rilevarono che, rispetto ai frutti di controllo, le banane trattate con 1-MCP presentavano livelli di produzione di etilene più elevati e tassi respiratori decisamente più contenuti. Pelayo *et al.* (2003), invece, notarono un effetto simile dell'1-MCP su questi parametri fisiologici, ma su banane ad un stadio di maturazione più avanzato.

Per quanto concerne i rilievi colorimetri sulla buccia, è evidente l'effetto inibente esercitato dall'1-MCP sull'evoluzione del colore. Le banane trattate, infatti, pur presentando nei primi 2 giorni di conservazione a 20°C valori di "a" (scomparsa del verde) simili ai frutti del controllo, completavano il viraggio di colore con 4 giorni di ritardo (Fig. 6.3). È interessante notare come l'effetto dell'1-MCP sui frutti trattati sia in contrasto con i risultati dell'andamento della produzione di etilene (Fig. 6.2). L'azione "protettiva" esercitata dall'1-MCP da noi precedentemente citata giustifica il rallentato sviluppo del colore nelle banane trattate seppur in presenza di elevati tassi di etilene svolto. In questi frutti, quindi, la percezione dell'ormone risultava inibita dall'1-MCP. I frutti del controllo, invece, continuavano la normale evoluzione del colore in quanto non protetti dall'azione dell'etilene climaterico.

Anche la perdita di consistenza della polpa mostrava andamenti divergenti tra le banane del lotto etilene/1-MCP e quelle non trattate. A 2 giorni dal trattamento con

etilene non vi erano differenze tra i campioni dei due diversi trattamenti, ma il divario diveniva evidente dopo 6 ed 8 giorni di mantenimento a 20°C (Fig. 6.4). A questo punto della conservazione era palese il mantenimento della consistenza nei frutti trattati con 1-MCP. Degno di nota il fatto che i frutti trattati al termine della loro conservazione (12° giorno) presentavano valori di consistenza molto simili a quelli del controllo non trattato all'8° giorno (termine della conservazione per questo lotto) (Fig. 6.4). I nostri risultati sono in accordo con Jiang et al. (1999b).

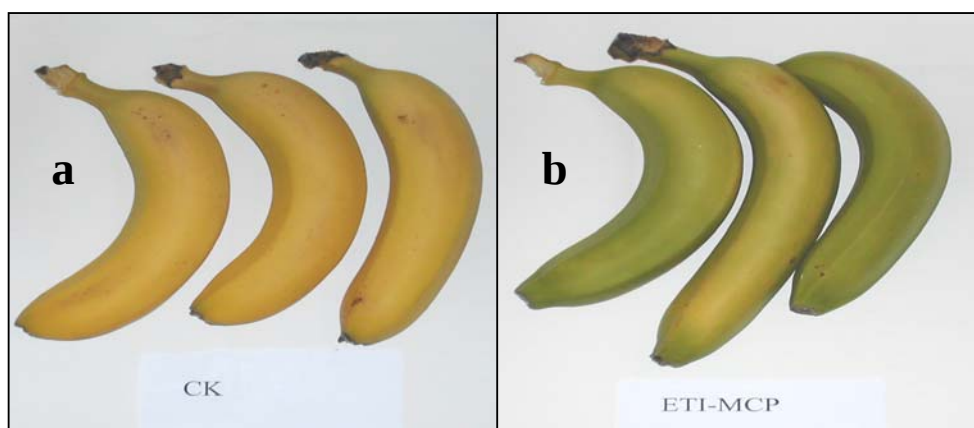


Fig. 6.6. Confronto tra diversi trattamenti a 5 giorni dal trattamento con 200 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene (mantenimento a 20°C) (Prova 1). a = controllo shelf life; b = etilene/1-MCP.

Questi autori riportarono una inibizione della perdita di consistenza su banane trattate con una concentrazione di 1-MCP cinque volte superiore (1000 nl l^{-1}) a quella da noi utilizzata (200 nl l^{-1}) ma con una durata di esposizione minore (12 h a 20°C) rispetto al nostro esperimento (24 h a 20°C). L'ottenimento di risultati simili ma con differenti concentrazioni e durata di esposizione all'1-MCP, trova spiegazione nelle osservazioni degli autori sopracitati, i quali constatarono che la risposta delle banane all'1-MCP era strettamente dipendente dall'interazione tra concentrazione e durata del trattamento (Jiang et al., 1999b).

Come osservato per gli altri parametri qualitativi, anche l'evoluzione dei solidi solubili mostrava un decorso differente per i due lotti di banane (Fig. 6.5). Dopo 2 giorni di conservazione non vi erano differenze tra il controllo ed i campioni trattati ma il gap diventava significativo dopo 6 giorni e proseguiva nel corso del mantenimento a 20°C. Ancora, come osservato nel corso dei rilievi colorimetrici,

al termine della shelf life le banane trattate con 1-MCP presentavano la stessa concentrazione zuccherina dei frutti del controllo al giorno 8 (termine della shelf life per questo lotto). Jiang et al. (1999a) hanno rilevato che i cambiamenti di colore della banana erano più sensibili al trattamento con 1-MCP, rispetto alla consistenza della polpa.

6.2 Effetto della durata del trattamento con 1-MCP sulla shelf life dei frutti

6.2.1 Preparazione dell'esperimento

Sei box commerciali di banane (*Musa* sp., gruppo AAA, sottogruppo Cavendish, cultivar Williams) ad un *colour stage* 2, sono state prelevate al Centro di Maturazione Dole di S. Palomba (Roma) e trasportate nei nostri laboratori. I frutti sono stati quindi sottoposti a 4 diversi trattamenti:

- CONTROLLO. I frutti sono stati trattati con 200 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 ore a 20°C.
- ETILENE/1-MCP 3h. I frutti sono stati trattati con 200 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 ore a 20°C e successivamente esposti a 200 nl l^{-1} di 1-MCP per 3 ore a 20°C.
- ETILENE/1-MCP 6 h. I frutti sono stati trattati con 200 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 ore a 20°C e successivamente esposti a 200 nl l^{-1} di 1-MCP per 6 ore a 20°C.
- ETILENE/1-MCP 12 h. I frutti sono stati trattati con 200 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 ore a 20°C e successivamente esposti a 200 nl l^{-1} di 1-MCP per 12 ore a 20°C.

I frutti dei diversi lotti sono stati quindi conservati separatamente alla temperatura di 20°C e periodicamente testati per i parametri fisiologici e qualitativi.

6.2.2 *Presentazione e discussione dei risultati*

Come possiamo osservare in Figura 6.7, l'andamento dell'attività respiratoria non presentava differenze tra i diversi lotti durante il corso della prova ma, al giorno 2, il picco climaterico dei campioni trattati per 12 ore con 1-MCP (eti/1-MCP 12 h) risultava significativamente inferiore a quello degli altri lotti. Questo effetto inibitorio sulla produzione di CO₂ era già stato osservato nella precedente prova per i campioni trattati con 1-MCP (Fig. 6.1). Anche per quanto riguarda la produzione di etilene, gli andamenti dei diversi lotti (trattati e non) erano speculari, ad eccezione del trattamento eti/1-MCP 12h: i frutti di questo lotto, infatti, mostravano livelli di etilene decisamente superiori (Fig. 6.8). I dati dei rilievi fisiologici sono in accordo con gli effetti già notati nel corso di questa prima parte della sperimentazione e con le osservazioni di altri autori (Golding *et al.* 1998) riguardo al duplice effetto dell'1-MCP, inibitorio sulla respirazione e stimolante nei confronti della produzione di etilene.

In Figura 6.9 sono riportati i risultati relativi all'analisi colorimetrica. Dall'esame di questi dati è possibile ricavare due diversi trend per i campioni in conservazione. Fino all'8° giorno le banane del controllo non trattato e quelle del trattamento eti/1-MCP 3h presentavano uno sverdimento della buccia più accelerato rispetto agli altri 2 gruppi di frutti in conservazione (eti/1-MCP 6h, eti/1-MCP 12h): questi ultimi due lotti, infatti, mantenevano una colorazione verde più intensa fino all'8° giorno di conservazione. Una differenza significativa tra i frutti del trattamento eti/1-MCP 6h e quelli del trattamento eti/1-MCP 12h era riscontrabile dopo 12 giorni di conservazione a 20°C.

Questo dato depone a favore del fatto che un trattamento della durata di almeno 12 ore sia necessario per ottenere un effetto notevole dell'1-MCP con le concentrazioni da noi applicate (200 nl l⁻¹). È ragionevole pensare che nelle fasi finali della conservazione, la minore protezione dagli effetti etilene-indotti nelle banane del lotto eti/1-MCP 6h rispetto a quelle del lotto eti/1-MCP 12h sia dovuta all'incapacità del composto di competere con l'azione dell'etilene presente. Dobbiamo infatti considerare che l'espressione dei siti recettori aumenta con il progredire della maturazione (Klee e Tieman, 2002), quindi, l'etilene endogeno

svolto dai frutti potrebbe essere capace di stimolare il ripenio una volta che nuovi siti si siano formati.

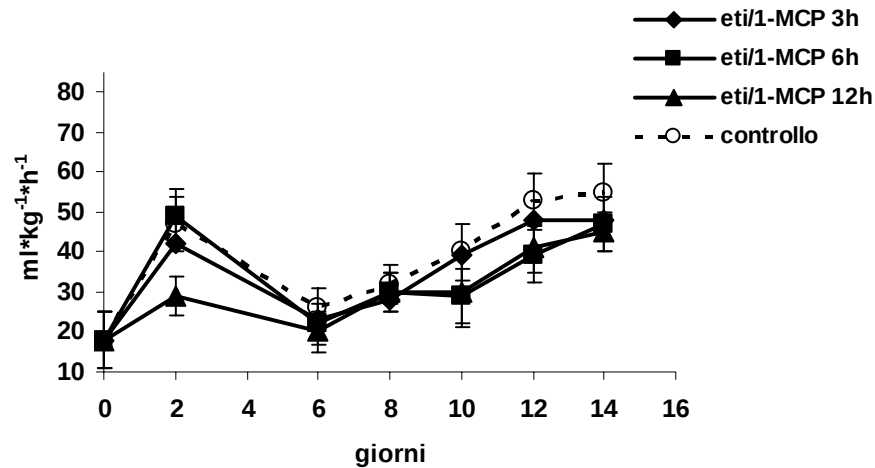


Fig. 6.7 Produzione di CO₂ di banane trattate solamente con 200 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 ore a 20°C oppure trattate dapprima con 200 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 ore a 20°C ed in seguito con 200 nl l⁻¹ di 1-MCP per 3, 6 o 12 ore a 20°C e conservate a 20°C. Le barre indicano l'errore standard (ES; $n = 10$). Se assenti, le barre dell'ES ricadono all'interno delle dimensioni del simbolo.

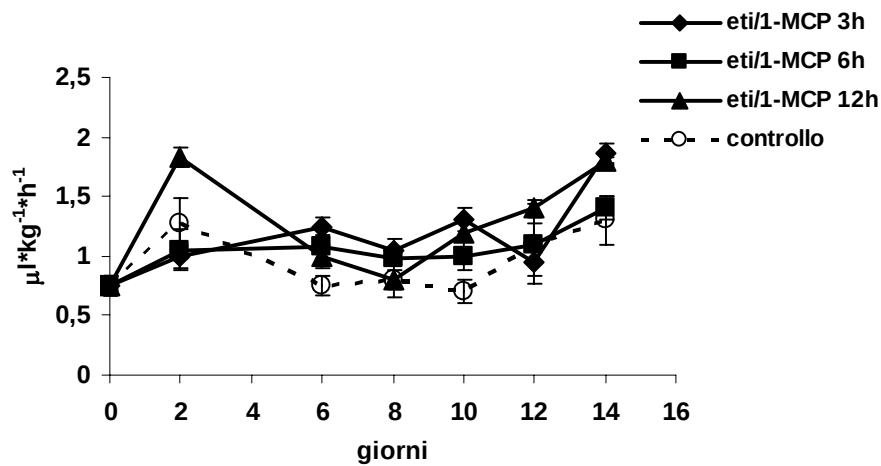


Fig. 6.8 Produzione di etilene di banane trattate solamente con 200 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 ore a 20°C oppure trattate dapprima con 200 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 ore a 20°C ed in seguito con 200 nl l⁻¹ di 1-MCP per 3, 6 o 12 ore a 20°C e conservate a 20°C. Le barre indicano l'errore standard (ES; $n = 10$). Se assenti, le barre dell'ES ricadono all'interno delle dimensioni del simbolo.

In relazione all'evoluzione del colore della buccia vanno però riportati alcune anomalie nel fenomeni di sverdimento della buccia nel lotto trattato con 1-MCP

per 12 ore. Alcuni campioni di questo lotto, infatti, perdevano la colorazione in maniera irregolare ed apparivano di un colore opaco con tinte che variavano dal grigio al bronzo (Fig. 6.10).

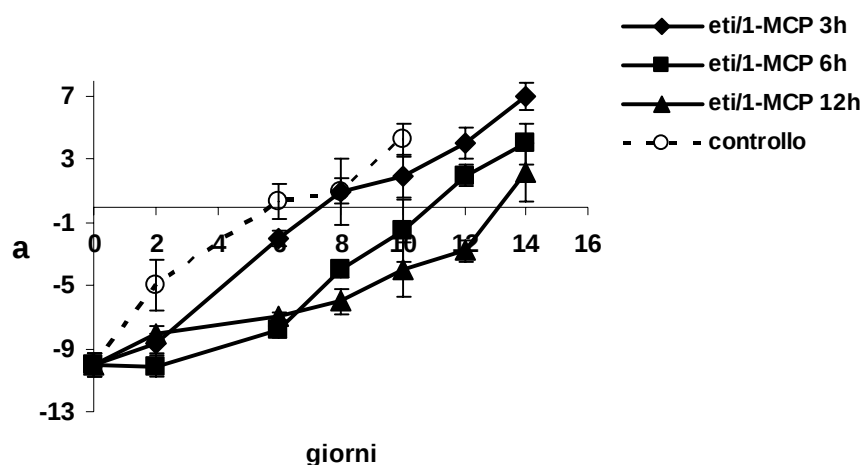


Fig. 6.9 Colore della buccia (a) di banane trattate solamente con $200 \mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 ore a 20°C oppure trattate dapprima con $300 \mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 ore a 20°C ed in seguito con 200 nl l^{-1} di 1-MCP per 3, 6 o 12 ore a 20°C e conservate a 20°C . Le barre indicano l'errore standard (ES; $n = 10$). Se assenti, le barre dell'ES ricadono all'interno delle dimensioni del simbolo.



Fig. 6.10 Maturazione anomala della buccia delle banana in seguito al trattamento con 200 nl l^{-1} di 1-MCP. al centro possiamo notare delle banana trattate con 1-MCP che non presentano sintomi.

6.3 Effetto del trattamento con 1-MCP sulla shelf life dei frutti in relazione allo stadio di maturazione postraccolta (colour stage 2)

6.3.1 Preparazione dell'esperimento

Otto box commerciali di banane (*Musa* sp., gruppo AAA, sottogruppo Cavendish, cultivar Williams) ad un *colour stage* 2, sono state prelevate al Centro di Maturazione Dole di S. Palomba (Roma) e trasportate nei nostri laboratori.

La metà dei frutti (4 box) sono stati trattati con 200 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 h a 20°C e conservati a 20°C in attesa che raggiungessero uno stadio di maturazione più avanzato (*colour stage* 3-4) per essere poi trattati con 200 nl l^{-1} di 1-MCP nell'esperimento successivo (vd. Cap. 5.4). I restanti 4 box di frutti sono stati quindi sottoposti a 3 diversi trattamenti:

- CONTROLLO. I frutti sono stati trattati con 200 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 ore a 20°C.
- 1-MCP 12h. I frutti sono stati trattati con 200 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 ore a 20°C e successivamente esposti a 200 nl l^{-1} di 1-MCP per 12 ore a 20°C.
- 1-MCP 24h. I frutti sono stati trattati con 200 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 h a 20°C e successivamente esposti a 200 nl l^{-1} di 1-MCP per 24 ore a 20°C.

I frutti dei diversi lotti sono stati quindi conservati separatamente alla temperatura di 20°C e periodicamente testati per i parametri fisiologici e qualitativi.

6.3.2 Presentazione e discussione dei risultati

In questa prova la produzione di CO_2 non presentava differenze tra i campioni trattati con 1-MCP (12 e 24 ore) ed il controllo, se non al secondo giorno, quando i frutti del trattamento da 24 ore manifestavano un netto calo del tasso respiratorio (Fig. 6.11).

La produzione di etilene era simile per tutti i trattamenti fino al termine della prova, ma i campioni del trattamento 1-MCP 24 h presentavano il picco di etilene

climaterico più basso rispetto agli altri (Fig. 6.12).

Il parametro colorimetrico “a” era influenzato dall’effetto protettivo dell’1-MCP nei confronti dell’azione dell’etilene, in quanto, seppur manifestando tassi di produzione simili, i frutti trattati con 1-MCP presentavano uno sverdimento (aumento di “a”) ritardato qualunque fosse il tempo di trattamento (12 o 24 ore): le banane trattate con 1-MCP, infatti, completavano il viraggio di colore con 4 giorni di ritardo rispetto a quelle del controllo (Fig. 5.12).

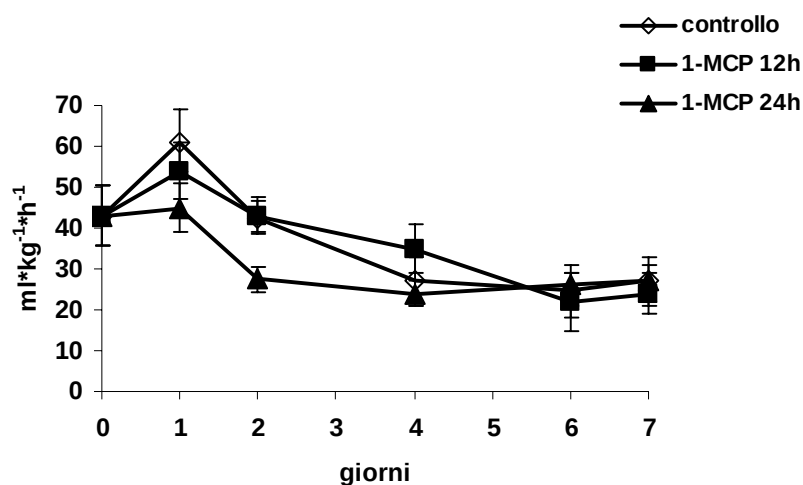


Fig. 6.11 Produzione di CO₂ di banane trattate solamente con 200 µl l⁻¹ di etilene per 24 ore a 20°C oppure trattate dapprima con 200 µl l⁻¹ di etilene per 24 ore a 20°C ed in seguito con 200 nl l⁻¹ di 1-MCP per 12 o 24 ore a 20°C e conservate a 20°C. Le barre indicano l’errore standard (ES; n = 10). Se assenti, le barre dell’ES ricadono all’interno delle dimensioni del simbolo.

Riguardo alla consistenza della polpa, si poteva notare una maggiore persistenza per questo parametro nei due lotti trattati con 1-MCP, con differenze minime tra il trattamento da 12 e 24 ore (Fig. 6.14) e tale risultato era confermato dall’analisi della deformabilità delle banane, che mostrava valori costantemente più elevati per il controllo (maggiore deformabilità = minore consistenza della polpa) già dal 4° giorno di conservazione a 20 °C (Fig. 6.15).

La concentrazione zuccherina ha confermato quanto osservato per la consistenza, relativamente all’efficienza dell’1-MCP, con il controllo che presentava valori più elevati rispetto ai due trattamenti (12 e 24 ore) fino al decimo giorno (Fig. 6.16); successivamente però i campioni trattati aumentavano la concentrazione zuccherina raggiungendo i valori riscontrati nel controllo (anche superiori nel caso

del trattamento con 1-MCP da 12 ore), ma con 2 giorni di ritardo. È interessante notare come i campioni del lotto 1-MCP 24h presentassero un contenuto in solidi solubili più contenuto rispetto al trattamento da 12 ore ed al controllo (Fig. 6.16).

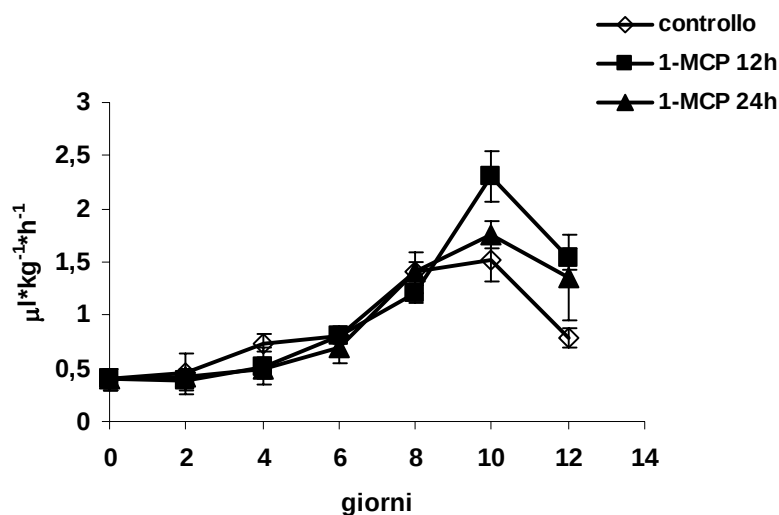


Fig. 6.12 Produzione di etilene di banane trattate solamente con 200 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 ore a 20°C oppure trattate dapprima con 200 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 ore a 20°C ed in seguito con 200 nl l^{-1} di 1-MCP per 12 o 24 ore a 20°C e conservate a 20°C. Le barre indicano l'errore standard (ES; $n = 10$). Se assenti, le barre dell'ES ricadono all'interno delle dimensioni del simbolo.

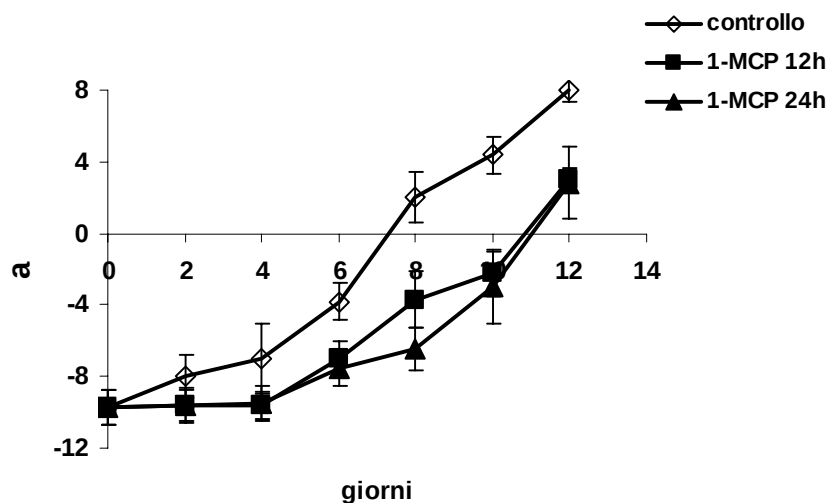


Fig. 6.13 Colore della buccia (a) di banane trattate solamente con 200 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 ore a 20°C oppure trattate dapprima con 200 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 ore a 20°C ed in seguito con 200 nl l^{-1} di 1-MCP per 12 o 24 ore a 20°C e conservate a 20°C. Le barre indicano l'errore standard (ES; $n = 10$). Se assenti, le barre dell'ES ricadono all'interno delle dimensioni del simbolo.

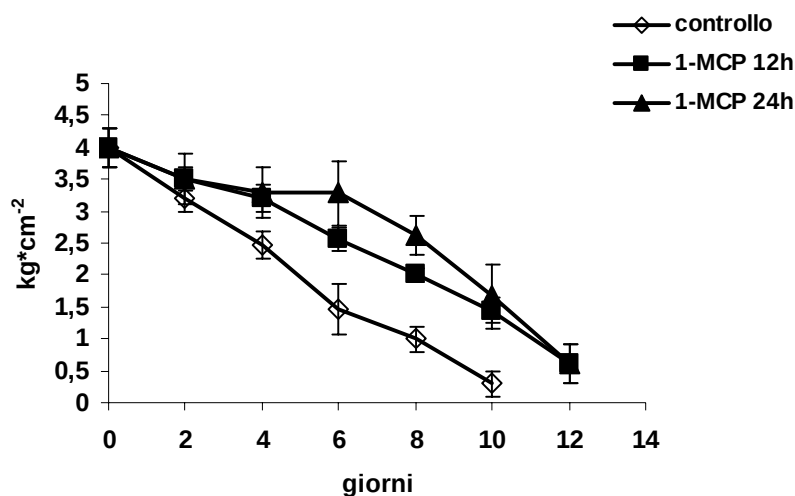


Fig. 6.14 Consistenza della polpa di banane trattate solamente con 200 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 ore a 20°C oppure trattate dapprima con 200 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 ore a 20°C ed in seguito con 200 nl l^{-1} di 1-MCP per 12 o 24 ore a 20°C e conservate a 20°C. Le barre indicano l'errore standard (ES; $n = 10$). Se assenti, le barre dell'ES ricadono all'interno delle dimensioni del simbolo.

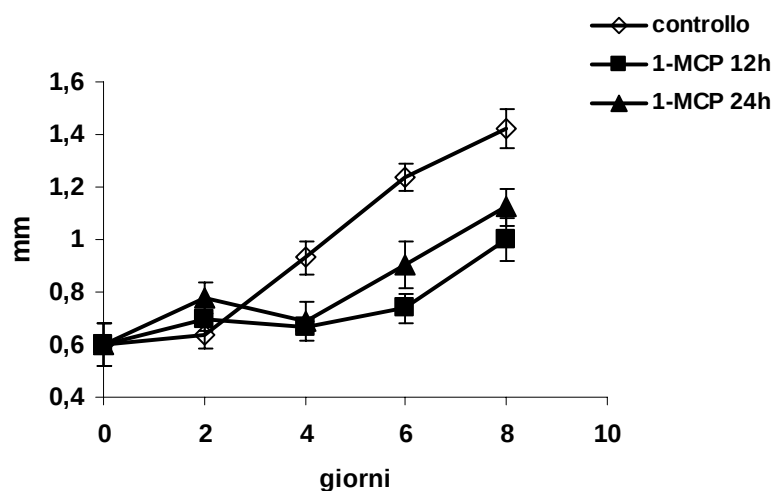


Fig. 6.15 Deformazione di banane (frutto intero) trattate solamente con 200 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 ore a 20°C oppure trattate dapprima con 200 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 ore a 20°C ed in seguito con 200 nl l^{-1} di 1-MCP per 12 o 24 ore a 20°C e conservate a 20°C. Le barre indicano l'errore standard (ES; $n = 10$). Se assenti, le barre dell'ES ricadono all'interno delle dimensioni del simbolo.

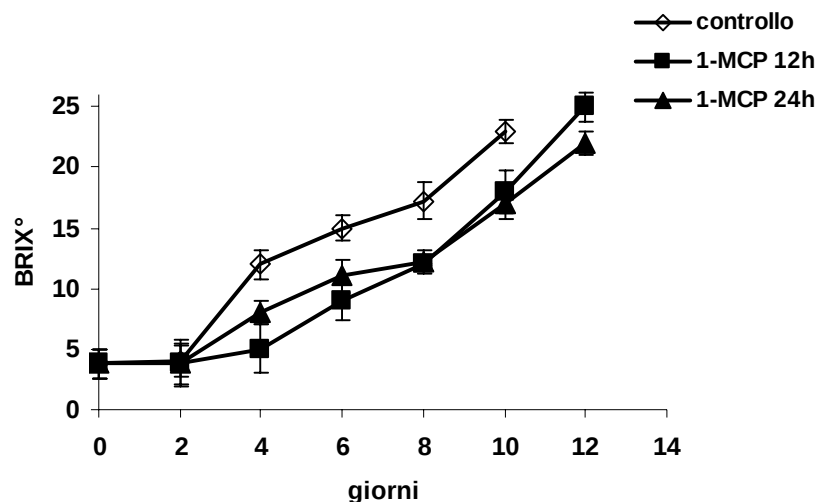


Fig. 6.16 Contenuto in solidi solubili (SSC) di banane trattate solamente con 200 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 ore a 20°C oppure trattate dapprima con 200 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 ore a 20°C ed in seguito con 200 nl l^{-1} di 1-MCP per 12 o 24 ore a 20°C e conservate a 20°C. Le barre indicano l'errore standard (ES; $n = 10$). Se assenti, le barre dell'ES ricadono all'interno delle dimensioni del simbolo.

6.4 Effetto del trattamento con 1-MCP sulla shelf life dei frutti in relazione allo stadio di maturazione postraccolta (colour stage 3-4)

6.4.1 Preparazione dell'esperimento

Come riportato nella precedente prova, 4 degli 8 box commerciali di banane (*Musa* sp., gruppo AAA, sottogruppo Cavendish, cultivar Williams) prelevati al Centro di Maturazione Dole di S. Palomba (Roma) ad un *colour stage* 2, erano stati sono state e trasportati nei nostri laboratori.

La metà dei frutti (4 box) erano stati trattati con 200 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 h a 20°C e conservati a 20°C in attesa che raggiungessero uno stadio di maturazione più avanzato (*colour stage* 3-4) per essere poi trattati con 200 nl l^{-1} di 1-MCP (vd. esperimento precedente). Questi frutti sono stati quindi sottoposti a 3 diversi trattamenti:

- CONTROLLO. I frutti sono stati trattati con 200 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 ore a 20°C.

- 1-MCP 12h. I frutti sono stati trattati con 200 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 ore a 20°C e successivamente esposti a 200 nl l^{-1} di 1-MCP per 12 ore a 20°C.
- 1-MCP 24h. I frutti sono stati trattati con 200 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 h a 20°C e successivamente esposti a 200 nl l^{-1} di 1-MCP per 24 ore a 20°C.

I frutti dei diversi lotti sono stati quindi conservati separatamente alla temperatura di 20°C e periodicamente testati per i parametri fisiologici e qualitativi.

6.4.2 Presentazione e discussione dei risultati

L'intensità respiratoria non mostrava differenze significative tra i frutti del controllo e quelli trattati con 1-MCP per 12 o 24: i valori di CO_2 prodotta erano molto simili e costanti nel tempo (Fig. 6.17).

Per quanto concerne la produzione di etilene, i campioni trattati per 24 h con 1-MCP svolgevano quantità maggiori rispetto al trattamento di 12 h e rispetto al controllo non trattato (Fig. 6.18).

L'analisi colorimetrica forniva valori molto simili senza differenze significative, con valori quasi coincidenti per i tre lotti di banane (dati non riportati), così come per la perdita di consistenza, che non mostrava differenze di rilievo tra i frutti dei diversi trattamenti (Fig. 6.19). Stesso discorso per quanto riguarda l'andamento della deformabilità delle polpa, in quanto si assisteva ad una generale e progressiva perdita di consistenza per tutti i frutti indipendentemente dal trattamento (Fig. 6.20).

Anche il contenuto in zuccheri confermava la non efficacia del trattamento condotto su banane ad uno stadio di maturazione più avanzato (Fig. 6.21).

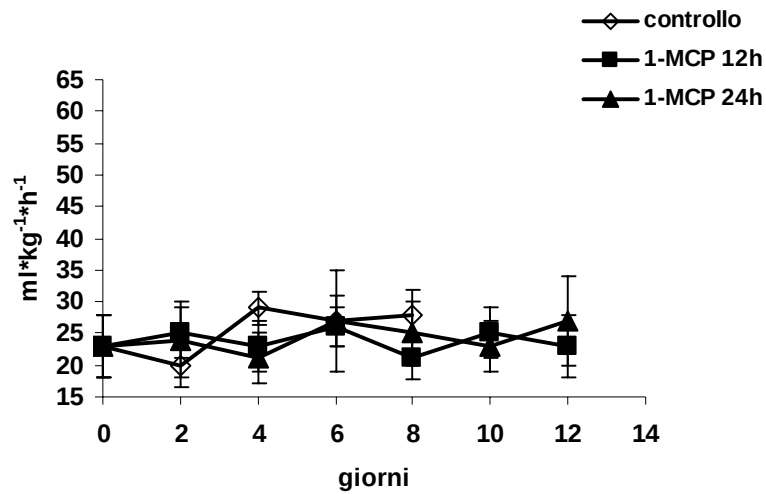


Fig. 6.17 Produzione di CO₂ di banane trattate solamente con 200 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 ore a 20°C oppure trattate dapprima con 200 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 ore a 20°C ed in seguito con 200 nl l^{-1} di 1-MCP per 12 o 24 ore a 20°C e conservate a 20°C. Le barre indicano l'errore standard (ES; $n = 10$). Se assenti, le barre dell'ES ricadono all'interno delle dimensioni del simbolo.

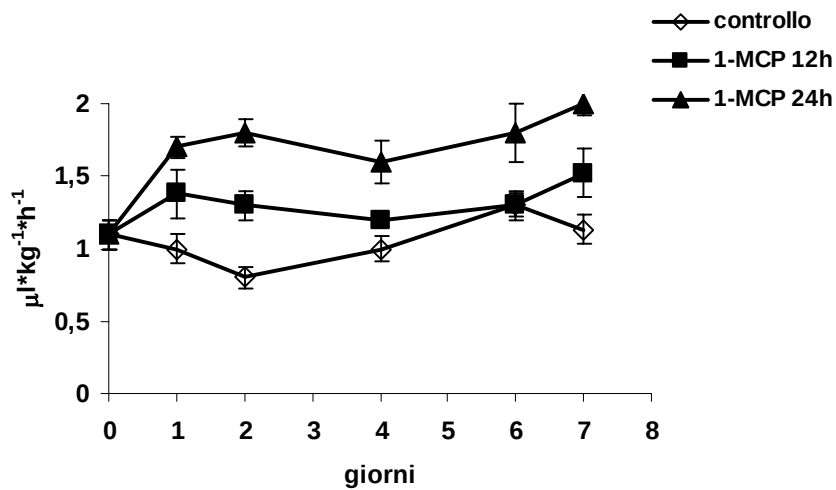


Fig. 6.18 Produzione di etilene di banane trattate solamente con 200 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 ore a 20°C oppure trattate dapprima con 200 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 ore a 20°C ed in seguito con 200 nl l^{-1} di 1-MCP per 12 o 24 ore a 20°C e conservate a 20°C. Le barre indicano l'errore standard (ES; $n = 10$). Se assenti, le barre dell'ES ricadono all'interno delle dimensioni del simbolo.

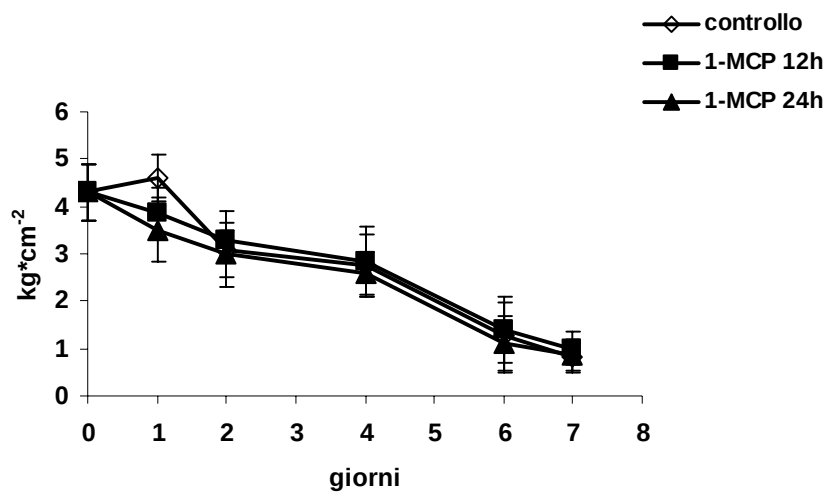


Fig. 6.19 Consistenza della polpa di banane trattate solamente con $200 \mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 ore a 20°C oppure trattate dapprima con $200 \mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 ore a 20°C ed in seguito con 200 nl l^{-1} di 1-MCP per 12 o 24 ore a 20°C e conservate a 20°C . Le barre indicano l'errore standard (ES; $n = 10$). Se assenti, le barre dell'ES ricadono all'interno delle dimensioni del simbolo.

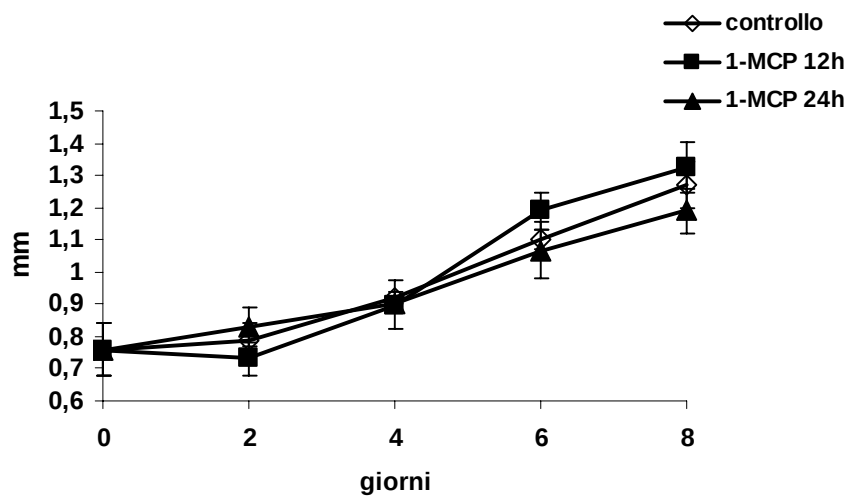


Fig. 6.20 Deformazione di banane (frutto intero) trattate solamente con $200 \mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 ore a 20°C oppure trattate dapprima con $200 \mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 ore a 20°C ed in seguito con 200 nl l^{-1} di 1-MCP per 12 o 24 ore a 20°C e conservate a 20°C . Le barre indicano l'errore standard (ES; $n = 10$). Se assenti, le barre dell'ES ricadono all'interno delle dimensioni del simbolo.

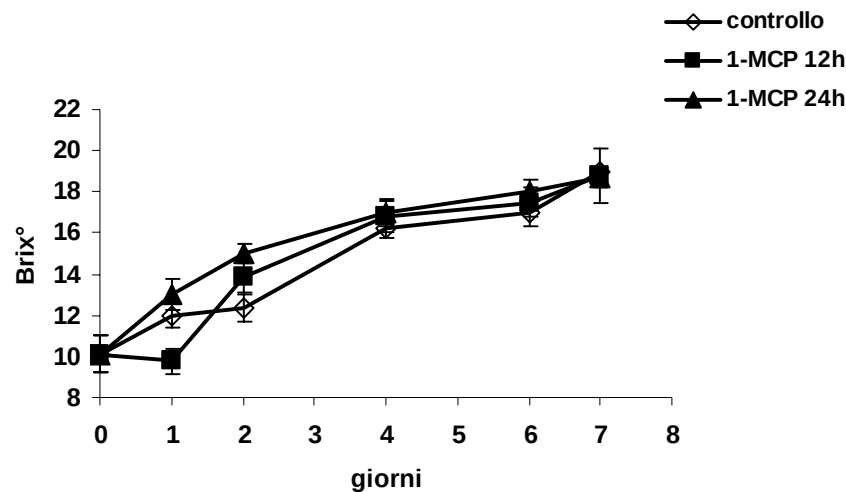


Fig. 6.21 Contenuto in solidi solubili (SSC) di banane trattate solamente con 200 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 ore a 20°C oppure trattate dapprima con 200 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 ore a 20°C ed in seguito con 200 nl l^{-1} di 1-MCP per 12 o 24 ore a 20°C e conservate a 20°C. Le barre indicano l'errore standard (ES; $n = 10$). Se assenti, le barre dell'ES ricadono all'interno delle dimensioni del simbolo.

6.5 Effetto dell'1-MCP in relazione alla durata del trattamento con etilene ed alla temperatura di conservazione

6.5.1 Preparazione dell'esperimento

Quattro box commerciali di banane (*Musa* sp., gruppo AAA, sottogruppo Cavendish, cultivar Williams) ad un *colour stage* 2, sono state prelevate al Centro di Maturazione Dole di S. Palomba (Roma) e trasportate nei nostri laboratori. I frutti sono stati quindi sottoposti a 4 diversi trattamenti:

- CONTROLLO 24 h. I frutti sono stati trattati con 200 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 h a 20°C.
- CONTROLLO 48 h. I frutti sono stati trattati con 200 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 48 h a 20°C.
- 1-MCP 24. I frutti sono stati trattati con 200 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 h a 20°C e successivamente esposti a 200 nl l^{-1} di 1-MCP per 24 h a 20°C.

- 1-MCP 48. I frutti sono stati trattati con 200 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 48 h a 20°C e successivamente esposti a 200 nl l^{-1} di 1-MCP per 24 h a 20°C.

I frutti dei diversi lotti sono stati quindi conservati separatamente a due diverse temperature, 14°C e 20°C, e periodicamente testati per i parametri fisiologici e qualitativi.

6.5.2 Presentazione e discussione dei risultati

Considerando il viraggio di colore della buccia dopo 6 giorni di conservazione a 20°C, infatti, (Fig. 6.22) era evidente il gap tra i diversi trattamenti. I frutti trattati con 1-MCP mostravano ancora una colorazione verde chiaro ($H^\circ \approx 100$) mentre i campioni del controllo non trattato avevano già effettuato il viraggio al giallo ($H^\circ = 85$). All'ottavo giorno i frutti non trattati giungevano al termine della loro conservazione (colorazione gialla completa e presenza di *black spotting*) mentre i frutti del trattamento con 1-MCP si apprestavano al viraggio del colore (buccia 50% giallo / 50% verde).

Prendendo in considerazione il parametro “consistenza”, si nota immediatamente una stretta correlazione con i risultati dei rilievi spettrocolorimetrici: il trattamento con 1-MCP controllava l'ammorbidimento della polpa in maniera decisa e dopo 6 e 8 giorni esisteva un netto divario tra questi frutti e quelli non trattati (Fig. 6.23). Inoltre, al termine della prova, i frutti trattati con 1-MCP presentavano ancora valori di consistenza leggermente superiori a quelli del controllo al giorno 8.

Effetto della temperatura di conservazione

Valutando l'effetto delle due diverse temperature di conservazione (14 e 20°C) è possibile trarre utili spunti di riflessione. Come previsto, la conservazione a bassa temperatura (14°C) portava ad un generale rallentamento del metabolismo dei frutti.

Prendendo in considerazione l'andamento del colore, nei frutti trattati con 1-MCP e conservati a 14°C, già a partire dal sesto giorno di conservazione veniva rilevato un rallentamento dello sverdimento e, rispetto allo stesso trattamento a 20°C,

questi frutti guadagnavano 2 giorni di conservazione (Fig. 6.22). Anche per i frutti del controllo conservati a 14°C si osservava un rallentamento del fenomeno di sverdimento a partire dal sesto giorno, con un prolungamento della conservazione quantificabile in 2 giorni (Fig. 6.22). Confrontando questi stessi lotti (1-MCP 14°C, 1-MCP 20°C) in riferimento all'ammorbidimento della polpa (Fig. 6.23), veniva osservato un significativo mantenimento della consistenza già a partire dal 10° giorno (ultimo rilievo della consistenza per i frutti del trattamento a 20°C). I frutti mantenuti a bassa temperatura (14°C) al giorno 15 presentavano valori simili a quelli osservati per i frutti mantenuti a 20°C.

Questo “effetto temperatura”, seppur preventivabile, assume ancora più importanza se si mettono a confronto i dati dei rilievi relativi ai frutti del controllo conservati a 14°C e quelli dei frutti trattati con 1-MCP e conservati a 20°C. Confrontando questi due lotti in riferimento alla perdita di consistenza, è interessante notare come l'effetto della bassa temperatura (14°C) sui frutti del controllo tenda a mimare l'azione dell'1-MCP sui frutti conservati a 20°C. (Fig. 6.24): è evidente e significativa la similitudine tra gli andamenti dei due gruppi, con i grafici praticamente sovrapponibili.

Considerando i cambiamenti di colore emergevano differenze leggermente più evidenti soprattutto al 6° giorno ma questo divario veniva colmato nelle ultime fasi della shelf life (Fig. 6.25).

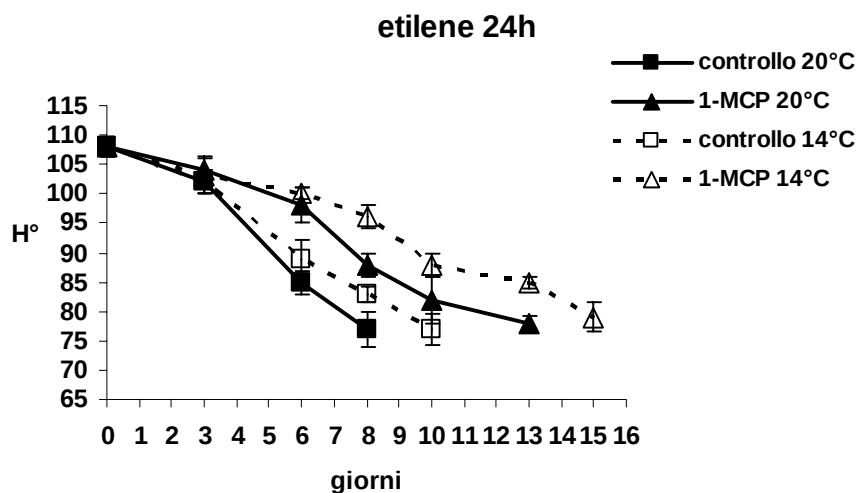


Fig. 6.22 Colore della buccia (Hue angle) di banane trattate con 200 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 ore a 20°C e conservate a 20°C, oppure trattate dapprima con 200 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 ore a 20°C ed in seguito con 200 nl l^{-1} di 1-MCP per 24 h a 20°C e conservate a 20°C, oppure trattate con 200 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 ore a 20°C e conservate a 14°C, oppure dapprima trattate con 200 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 ore a 20°C ed in seguito con 200 nl l^{-1} di 1-MCP per 24 h a 20°C e conservate a 14°C. Le barre indicano l'errore standard (ES; $n = 10$). Se assenti, le barre dell'ES ricadono all'interno delle dimensioni del simbolo.

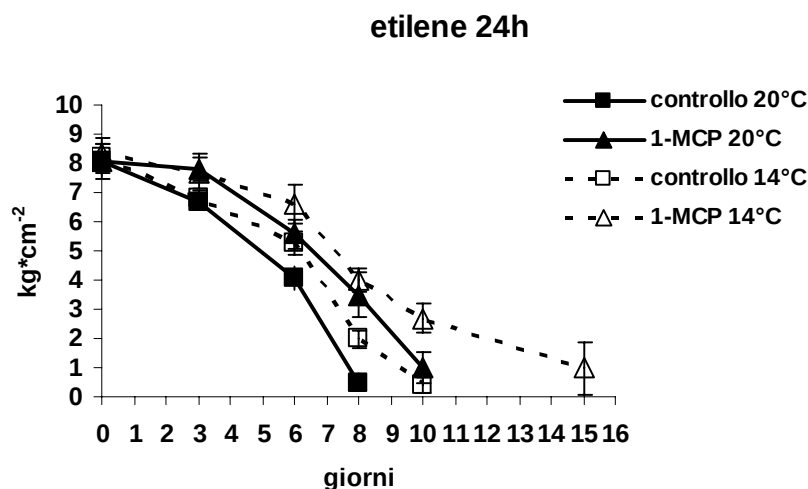


Fig. 6.23 Consistenza della polpa di banane trattate con 200 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 ore a 20°C e conservate a 20°C, oppure trattate dapprima con 200 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 ore a 20°C ed in seguito con 200 nl l^{-1} di 1-MCP per 24 h a 20°C e conservate a 20°C, oppure trattate con 200 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 ore a 20°C e conservate a 14°C, oppure dapprima trattate con 200 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 ore a 20°C ed in seguito con 200 nl l^{-1} di 1-MCP per 24 ore a 20°C e conservate a 14°C. Le barre indicano l'errore standard (ES; $n = 10$). Se assenti, le barre dell'ES ricadono all'interno delle dimensioni del simbolo.

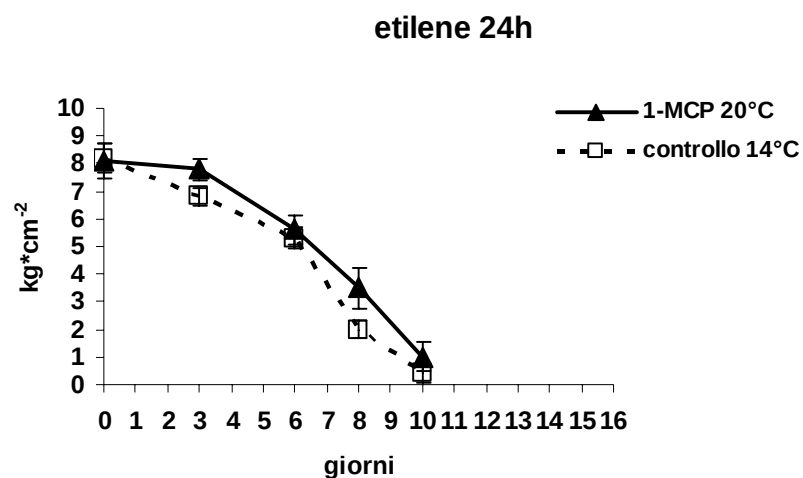


Fig. 6.24 Consistenza della polpa di banane trattate con 200 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 ore a 20°C ed in seguito con 200 nl l^{-1} di 1-MCP per 24 h a 20°C e conservate a 20°C, oppure solamente trattate 200 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 ore a 20°C e conservate a 14°C. Le barre indicano l'errore standard (ES; $n = 10$). Se assenti, le barre dell'ES ricadono all'interno delle dimensioni del simbolo.

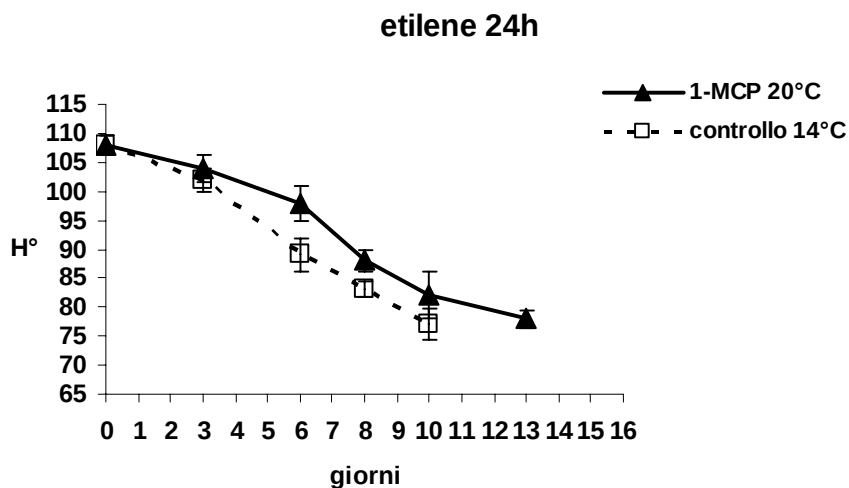


Fig. 6.25 Colore della buccia (Hue angle) di banane trattate con 200 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 ore a 20°C ed in seguito con 200 nl l^{-1} di 1-MCP per 24 h a 20°C e conservate a 20°C, oppure solamente trattate con 200 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 ore a 20°C e conservate a 14°C. Le barre indicano l'errore standard (ES; $n = 10$). Se assenti, le barre dell'ES ricadono all'interno delle dimensioni del simbolo.

Effetto del trattamento con etilene (24-48 h)

L'induzione della fase climaterica con 200 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene ha effettivamente inciso sulla conservazione, andando ad influenzare in maniera differente l'evoluzione dei parametri qualitativi a seconda della lunghezza del trattamento (24 o 48 h).

In Figura 6.26 sono riportati i risultati delle prove di consistenza relativi al mantenimento a 20°C. Prendendo in considerazione i campioni dei due controlli (controllo 24, controllo 48) è possibile notare che nel mantenimento a 20°C il trattamento prolungato con 200 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene (48 h) stimolava il ripenio dei frutti, con differenze significative tra i due lotti tra il terzo ed il sesto giorno di conservazione. Questa differente risposta in relazione alla lunghezza del trattamento con etilene era osservabile anche mettendo a confronto i trattamenti con 1-MCP effettuati dopo 24 h (1-MCP 24) o 48 h (1-MCP) dall'induzione del climaterio. I frutti del lotto "1-MCP 24" mantenevano una maggiore consistenza tra il 3 ed il 6 giorno, mentre il trattamento di 48 h accelerava i processi di ammorbidimento (Fig. 6.26).

Per quanto concerne lo sverdimento della buccia, le disuguaglianze tra i trattamenti erano di lieve entità (Fig. 6.27). Tra i frutti del controllo c'erano differenze solamente al terzo giorno di conservazione, con i frutti del lotto "controllo 24" che presentavano valori di H° più elevati, mentre nelle banane trattate del lotto "1-MCP 24" sembrava che l'evoluzione del colore fosse più contenuta al sesto giorno. Comunque, alla fine della conservazione, questi campioni manifestavano una maggiore ritenzione di colore rispetto al lotto "1-MCP 48".

Ulteriori osservazioni

Come riscontrato in una precedente prova, anche durante lo svolgimento di questo esperimento venivano riscontrate anomalie nel normale decorso maturativo della buccia dei frutti trattati con 1-MCP, indipendentemente dal momento del trattamento e dalla temperatura di conservazione.

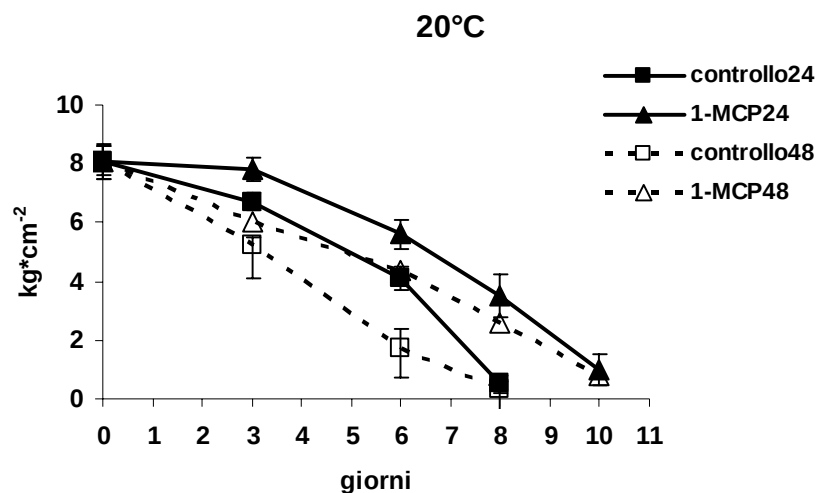


Fig. 6.26 Consistenza della polpa di banane trattate solamente con 200 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 o 48 ore a 20°C e conservate a 20°C, oppure trattate dapprima con 200 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 o 48 ore a 20°C ed in seguito con 200 nl l^{-1} di 1-MCP per 24 h a 20°C e conservate a 20°C. Le barre indicano l'errore standard (ES; $n = 10$). Se assenti, le barre dell'ES ricadono all'interno delle dimensioni del simbolo.

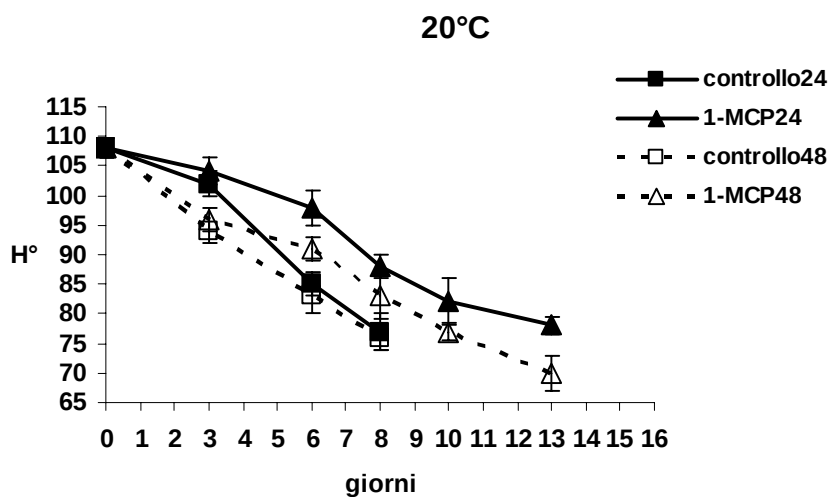


Fig. 6.27 Colore della buccia di banane (Hue angle) trattate solamente con 200 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 o 48 ore a 20°C e conservate a 20°C, oppure trattate dapprima con 200 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 o 48 ore a 20°C ed in seguito con 200 nl l^{-1} di 1-MCP per 24 h a 20°C e conservate a 20°C. Le barre indicano l'errore standard (ES; $n = 10$). Se assenti, le barre dell'ES ricadono all'interno delle dimensioni del simbolo.

6.6 Effetto dell'1-MCP e di altri trattamenti post-climaterici sull'irregolare evoluzione del colore della buccia

6.6.1 Preparazione dell'esperimento

Cinque caschi di banane (*Musa* sp., gruppo AAA, sottogruppo Cavendish, cultivar Williams) sono stati ottenuti da una coltivazione sita in Coff Harbour (New South Wales, Australia) e trasportati nei laboratori del Gosford Horticultural Institute, sede della sperimentazione. Le singole banane ottenute dai caschi sono state numerate e quindi immerse per 1 minuto in una soluzione contenente 200 mg l⁻¹ di fungicida tiabendazolo (Tecto 90, Merck, Sharp and Dohme, Granville, NSW, Australia) e lasciate asciugare a 20 °C prima di essere avviati al trattamento con etilene. I frutti sono stati quindi posizionati in un contenitore da 60 l ed il ripenio è stato indotto con un trattamento di 300 µl l⁻¹ di etilene per 24 h a 20 °C. Nel contenitore è stata inoltre posizionata della calce per evitare un eccessivo accumulo di CO₂.

Dopo il trattamento con etilene, le banane sono state allocate nei seguenti trattamenti:

- Controllo: i frutti sono stati solamente trattati con 300 µl l⁻¹ di etilene per 24 h a 20 °C
- 1-MCP: i frutti sono stati trattati con 200 nl l⁻¹ di 1-MCP per 24 ore a 20 °C.
- ETANOLO: i frutti sono stati trattati con 0.3 ml l⁻¹ di etanolo per 24 ore a 20 °C.
- N₂: I frutti sono stati esposti ad un'atmosfera di azoto (O₂ < 0,1%) 24 h a 20°C.
- CHILLING: i frutti sono stati esposti a 1±1C° per 24 ore.

I frutti dei diversi lotti sono stati quindi conservati separatamente alla temperatura di 20°C, e periodicamente testati per i parametri fisiologici e qualitativi.

6.6.2 *Presentazione dei risultati*

La produzione di etilene 24 ore dopo i diversi trattamenti (1-MCP, etanolo, N₂ e chilling) e 48 ore dopo il trattamento con etilene aumentava in maniera generalizzata (Fig. 6.28). Questo parametro non veniva influenzato dal trattamento con 1-MCP che in contrasto rallentava la perdita del colore verde della buccia. Una diminuzione del valore di hue angle (H°) è associata con il passaggio del colore della buccia dal verde (H°=115) al giallo (H°=90). Dopo 6 giorni di i frutti trattati con 1-MCP presentavano una decisa colorazione verde rispetto ai frutti degli altri trattamenti, specialmente se comparati al controllo non trattato ed al trattamento con etanolo (Fig. 6.29). A questo punto della prova, infatti, le banane degli altri lotti erano già completamente gialle con punteggiatura nera (*black spotting*) mentre un decremento nei valori di H° nei frutti trattati con 1-MCP veniva osservato solamente dall'ottavo giorno, anche se i rilevamenti del colore venivano effettuati sulla parte equatoriale del frutto e le banane perdono il colore verde proprio a partire da questa zona. In questi frutti alla fine dell'esperimento (giorno 14) il colore della buccia era simile a quello delle banane degli altri lotti al giorno 7-8; comunque, i frutti trattati con 1-MCP presentavano una irregolare colorazione verde chiaro muovendosi dal centro verso le punte ed era evidente un grigiore generalizzato nella buccia. Questo effetto, inoltre, veniva osservato sia sulle parti gialle sia su quelle ancora verdi (Fig. 6.33). Una rallentata evoluzione del colore (1-2 giorni se comparata con i frutti del controllo e del trattamento con etanolo) era stata osservata anche per i frutti trattati in atmosfera di N₂ o esposti a basse temperature per 24 h (Fig. 6.29).

Il contenuto in clorofilla della buccia mostrava un andamento simile a quello rilevato dalle analisi colorimetriche, con il controllo ed i frutti trattati con etanolo che mostravano valori più bassi nel corso della conservazione (Fig. 6.30). Dal giorno 6, il contenuto in clorofilla delle banane trattate con 1-MCP era significativamente più elevato. I dati ottenuti dall'analisi della fluorescenza della buccia confermavano i risultati delle analisi del contenuto in clorofilla: le banane trattate con 1-MCP avevano valori più alti in termini di fluorescenza dal giorno 6 in poi, rispetto agli altri trattamenti (Fig. 6.31). Il generale abbassamento nei valori

di Fm indica un più lento declino della funzionalità dei cloroplasti. Anche alla fine dell'esperimento, nei frutti trattati con 1-MCP veniva ancora osservata una consistente attività di fluorescenza con valori di Fm più elevati rispetto agli altri trattamenti al giorno 8 (Fig. 6.31). Questi risultati sono in accordo con i rilievi colorimetrici in quanto il declino del contenuto in clorofilla e nei valori di fluorescenza dei trattamenti con N₂ e a bassa temperatura comparati al controllo ed al trattamento con etanolo, mostravano un simile andamento. Comunque, questo ritardo nello sverdimento scompariva dopo 7 giorni di conservazione a 20°C, in quanto i frutti presentavano tutti valori simili (esclusi quelli del trattamento con 1-MCP).

La consistenza della polpa nei frutti del controllo e in quelli trattati con etanolo era la più bassa mentre i trattamenti con N₂ e "chilling" presentavano frutti con maggiore consistenza fino al giorno 4 (Fig. 6.32). Il trattamento con 1-MCP mostrava valori intermedi di consistenza fino al giorno 4, per poi manifestare una leggera ritenzione di questo parametro (rispetto agli altri trattamenti) fino alla fine dell'esperimento.

La produzione di etanolo ed acetaldeide veniva monitorata regolarmente su singole banane provenienti da tutti i trattamenti per tutta la durata dell'esperimento, ma nessuna particolare differenza tra i diversi trattamenti era stata notata nell'accumulo di questi composti (dati non riportati).

6.6.3 Discussione dei risultati

1-MCP

Molti studi sull'applicazione dell'1-MCP prima dell'induzione del ripenio con il trattamento con etilene, hanno mostrato un consistente effetto in termini di ritardata perdita di consistenza, evoluzione del colore e produzione di volatili, ma, applicando l'1-MCP subito dopo il trattamento commerciale con etilene, i risultati sono più variabili (Macnish *et al.*, 1997, 2000; Golding *et al.*, 1998; Jiang *et al.*, 1999a, b)

Nel nostro esperimento non tutti i parametri maturativi venivano influenzati allo stesso modo dal trattamento con 1-MCP effettuato a 24 ore dal trattamento con etilene, come già osservato in precedenti sperimentazioni (De Martino *et al.*, 2004). La produzione di etilene era simile per tutti i trattamenti, suggerendo che una volta iniziato il ripenio con l'etilene, l'esposizione all'1-MCP, all'etanolo, all'azoto o a basse temperature per 24 h non influenza la produzione di etilene. Questo risulta in contrasto con quanto riportato su precedenti lavori, dove la produzione di etilene di banane in seguito a trattamento con 1-MCP aumentava sia in banane (Golding *et al.*, 1998), che in altri frutti (De Martino *et al.*, 2006). Questo fenomeno sembra spiegarsi con l'incapacità dell'etilene a legarsi ai recettori perché già occupati dalle molecole di 1-MCP, con conseguente rilascio di etilene all'esterno del frutto. È inoltre già nota l'influenza dello stadio di maturazione sulla risposta all'etilene.

I risultati delle analisi riguardanti lo sverdimento della buccia (rilevamenti colorimetrici, contenuto e fluorescenza della clorofilla) mostravano che il ritardo causato dal trattamento con 1-MCP diventavano evidenti dal 5-6 giorno dopo il trattamento con etilene. Effetti simili sono stati osservati da Pelayo *et al.* (2003) con concentrazioni di 1-MCP più elevate e diversi tempi di esposizione.

Proprio i cambiamenti nel contenuto e nella fluorescenza della clorofilla (Fm) erano responsabili dell'andamento dello sverdimento dei frutti. Come già accennato, la fluorescenza della clorofilla è una misura dell'efficienza fotochimica dei cloroplasti, ed è stata utilizzata proprio per esaminare l'andamento dello sverdimento della buccia di banana (Jayanty *et al.*, 2002). Nelle esperienze di questi autori si assisteva ad un simultaneo declino della colorazione verde della buccia e dell'efficienza fotochimica dopo la fase del picco climaterico di etilene. In questo esperimento è interessante notare come i valori di Fm nella buccia dei frutti trattati con 1-MCP, dopo 7 e 8 giorni di conservazione, erano approssimativamente di 3 volte superiori ai valori dei frutti degli altri trattamenti negli stessi giorni (Fig. 6.31). Quindi, le banane del trattate con 1-MCP non solo mostravano una maggiore ritenzione di clorofilla, ma mantenevano anche la loro

efficienza fotochimica quando gli altri trattamenti erano già alla fine della loro shelf-life (nessuna presenza di clorofilla nella buccia).

Comunque, come si evince dai risultati relativi alla consistenza della polpa, risulta chiaro che buccia e polpa si comportano in maniera differente durante la fase di ripenio. I valori di consistenza nei frutti trattati con 1-MCP erano intermedi rispetto agli altri trattamenti, mentre la buccia sembrava essere protetta dagli effetti dell'etilene. Questa osservazione supporta la proposta di Vendrell e McGlasson (1971) che mostrarono come la polpa fosse più sensibile all'etilene rispetto alla buccia ed all'intero frutto.

Altri trattamenti post-climaterici

Considerando l'effetto delle altre condizioni sperimentali testate, abbiamo osservato come il trattamento con N₂ ed il trattamento a basse temperature per 24 h abbiano portato ad un temporaneo effetto inibitorio sulla maturazione a partire dal secondo giorno, ma questo effetto spariva con il proseguire della shelf-life. Questi risultati sono verosimilmente legati all'effetto del basso tenore di O₂ (<0.1%) e della bassa temperatura (1±1 °C) sul rallentamento del metabolismo del frutto e l'alterazione del normale processo di ammorbidimento dei tessuti. Un effetto temporaneo del genere, era stato osservato anche da Liu *et al.*, (1976 a, b) su banane sottoposte al trattamento con etilene e quindi conservate in un'atmosfera a basso tenore di O₂ (1%), le quali, una volta interrotto il trattamento, e riportate in condizioni ambientali, manifestavano l'instaurarsi della fase di ripenio. Questo è in accordo con Klieber *et al.* (2002), il quale non riscontrò differenze, in termini di shelf-life, tra banane (già sottoposte al trattamento con etilene) conservate in atmosfera di azoto (per 6/12/24 h) e in condizioni ambientali. Inoltre, Klieber *et al.* (2002) e Wills *et al.* (1990) riscontrarono una certa irregolarità di sverdimento della buccia, rispettivamente nei frutti sottoposti ad atmosfera di azoto ed in frutti esposti a basse temperature, soprattutto dopo lunghe esposizioni. Questo effetto non è stato osservato nei nostri esperimenti per il differente stadio di maturazione dei frutti (Klieber *et al.*, 2002) e per la minore durata dei trattamenti in anaerobiosi (Wills *et al.*, 1990).

Tra le sostanze volatili prodotte dai frutti, è ben risaputo che acetaldeide ed etanolo possono avere sia effetti positivi che dannosi sulla qualità della frutta (Pesis, 2005). Tra i frutti è stata osservata una differente produzione di composti volatili, ma nessuna differenza significativa nella produzione di etanolo ed acetaldeide è stata notata tra le banane trattate con 1-MCP con segni di ingrigimento della buccia e i frutti non trattati. Questi risultati confermano le osservazioni di Hewage *et al.* (1995), secondo i quali l'applicazione di etanolo prima o dopo l'iniziazione del ripenio con l'etilene, non aveva nessun effetto inibitorio sulla maturazione della banana. Inoltre, il trattamento con vapori di etanolo non ha avuto effetto sulla produzione di etilene o su gli altri parametri, dato che sverdimento e perdita di consistenza della polpa erano simili agli altri trattamenti. Per esaminarne l'effetto, Klieber *et al.* (2003), infiltrarono etanolo nella polpa di banana ma senza ottenere nessun effetto in termini di qualità o conservazione dei frutti. Questi risultati porterebbero a pensare che l'etanolo non abbia nessun effetto né a livello della buccia né della polpa, anche se gli autori sostennero la mancanza di effetti a causa del mancato raggiungimento dei tessuti della polpa da parte dell'etanolo.

La comparsa dei sintomi di imbrunimento/ingrigimento sui frutti del trattamento con 1-MCP è avvenuta dopo una settimana di shelf-life a 20 °C. questi sintomi possono essere descritti come una generale opacizzazione del colore della buccia, con imbrunimenti diffusi all'interno delle parti verdi che mostravano ancora una chiara ritenzione di clorofilla. Con il proseguire della conservazione nel tempo, questo colore opaco interessava sempre più aree, portando quindi ad un generale quanto irregolare grigiore della buccia. Inoltre, da questo momento in poi, la natura irregolare dello sverdimento diventava sempre più evidente con zone gialle ed altre ancora verdi diffuse sulla buccia dei frutti (Fig. 6.33).

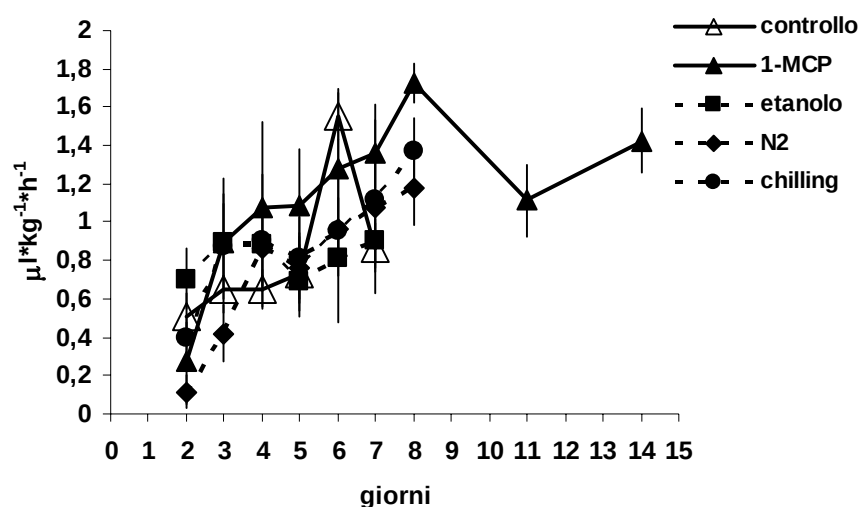


Fig. 6.28 Produzione di etilene di banane trattate solamente con 300 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 ore a 20°C oppure trattate dapprima con 300 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 ore a 20°C ed in seguito con 200 nl l^{-1} di 1-MCP per 24 ore a 20°C oppure trattate con 0,3 ml l^{-1} di etanolo per 24 ore a 20°C oppure mantenute in atmosfera di azoto ($\text{O}_2 < 0,1\%$) per 24 ore a 20°C oppure mantenute a $1\pm 1^\circ\text{C}$ per 24 ore. Le barre indicano la deviazione standard ($n = 10$).

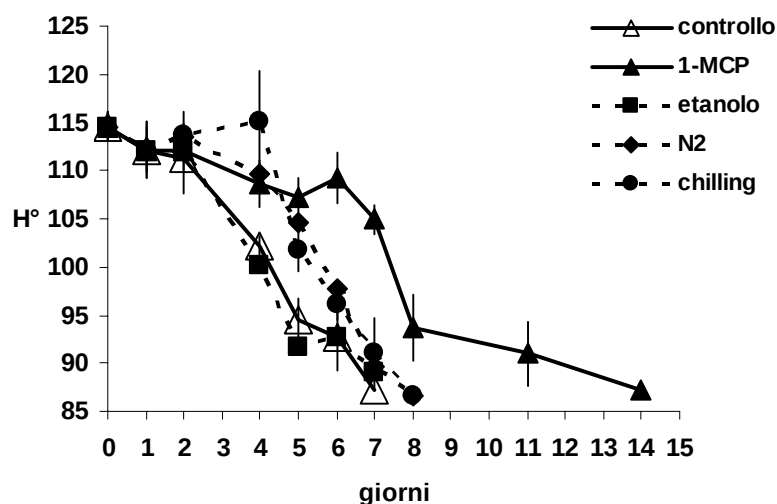


Fig. 6.29 Colore della buccia (Hue angle) di banane trattate solamente con 300 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 ore a 20°C oppure trattate dapprima con 300 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 ore a 20°C ed in seguito con 200 nl l^{-1} di 1-MCP per 24 ore a 20°C oppure trattate con 0,3 ml l^{-1} di etanolo per 24 ore a 20°C oppure mantenute in atmosfera di azoto ($\text{O}_2 < 0,1\%$) per 24 ore a 20°C oppure mantenute a $1\pm 1^\circ\text{C}$ per 24 ore. Le barre indicano la deviazione standard ($n = 10$).

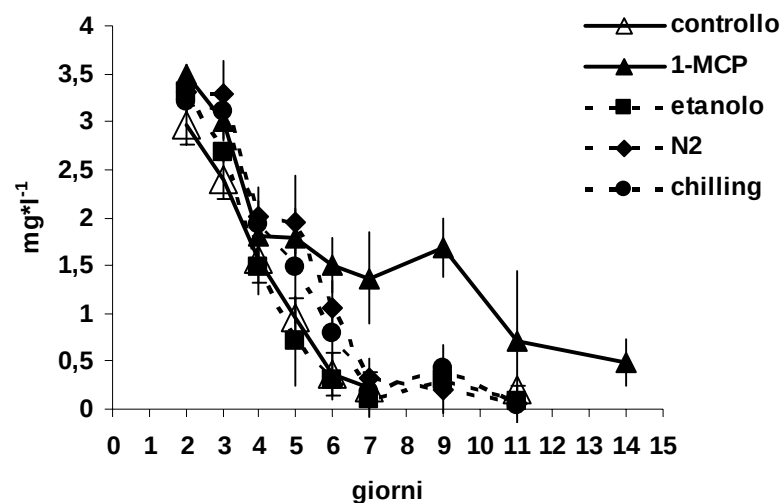


Fig. 6.30 Contenuto in clorofilla della buccia di banane trattate solamente con 300 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 ore a 20°C oppure trattate dapprima con 300 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 ore a 20°C ed in seguito con 200 nl l^{-1} di 1-MCP per 24 ore a 20°C oppure trattate con 0,3 ml l^{-1} di etanolo per 24 ore a 20°C oppure mantenute in atmosfera di azoto ($\text{O}_2 < 0,1 \%$) per 24 ore a 20°C oppure mantenute a $1\pm 1^\circ\text{C}$ per 24 ore. Le barre indicano la deviazione standard ($n = 10$).

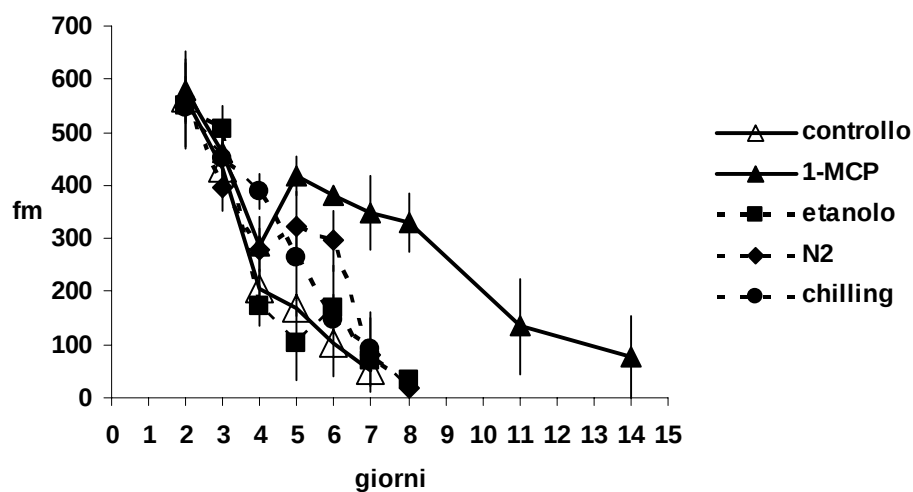


Fig. 6.31 Fluorescenza della clorofilla della buccia di banane trattate solamente con 300 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 ore a 20°C oppure trattate dapprima con 300 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 ore a 20°C ed in seguito con 200 nl l^{-1} di 1-MCP per 24 ore a 20°C oppure trattate con 0,3 ml l^{-1} di etanolo per 24 ore a 20°C oppure mantenute in atmosfera di azoto ($\text{O}_2 < 0,1 \%$) per 24 ore a 20°C oppure mantenute a $1\pm 1^\circ\text{C}$ per 24 ore. Le barre indicano la deviazione standard ($n = 10$).

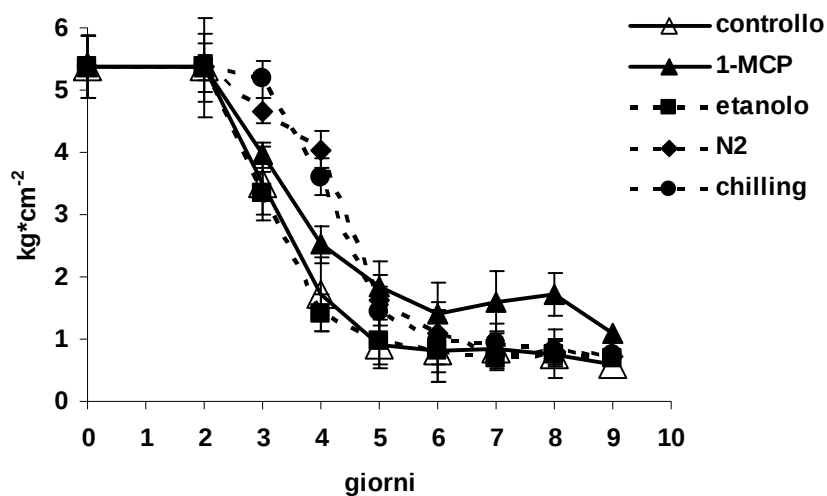


Fig. 6.32 Consistenza della polpa di banane trattate solamente con 300 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 ore a 20°C oppure trattate dapprima con 300 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 ore a 20°C ed in seguito con 200 nl l^{-1} di 1-MCP per 24 ore a 20°C oppure trattate con 0,3 ml l^{-1} di etanolo per 24 ore a 20°C oppure mantenute in atmosfera di azoto ($\text{O}_2 < 0,1 \%$) per 24 ore a 20°C oppure mantenute a $1\pm 1^\circ\text{C}$ per 24 ore. Le barre indicano la deviazione standard ($n = 10$).



Fig. 6.33 Irregolare evoluzione del colore della buccia su banane trattate con 1-MCP. Sono evidenti ampie zone gialle con presenza di *spotting* ed altre ancora verdi (sinistra) ed un generale grigiore della buccia stessa (destra).

6.7 Effetto dell'umidità relativa dell'ambiente di conservazione sull'evoluzione del colore della buccia in seguito al trattamento con 1-MCP

6.7.1 Preparazione dell'esperimento

Cinque caschi di banane (*Musa* sp., gruppo AAA, sottogruppo Cavendish, cultivar Williams) sono stati raccolti in una coltivazione a Coff Harbour (New South Wales, Australia) e trasportati nottetempo nei laboratori del Gosford Horticultural Institute, sede della sperimentazione. Le singole banane ottenute dai caschi sono state numerate e quindi immerse per 1 minuto in una soluzione contenente 200 mg l⁻¹ di fungicida tiabendazolo (Tecto 90, Merck, Sharp and Dohme, Granville, NSW, Australia) e lasciate asciugare a 20 °C prima di essere avviati al trattamento con etilene. I frutti sono stati quindi posizionati in un contenitore da 60 l ed il ripenio è stato indotto con un trattamento di 300 µl l⁻¹ di etilene per 24 h a 20 °C ad elevata umidità relativa (UR) (quasi al punto di saturazione). Nel contenitore è stata inoltre posizionata della calce per evitare un eccessivo accumulo di CO₂.

Dopo il trattamento con etilene, le banane sono state allocate in diversi trattamenti che differivano per le condizioni di temperatura ed umidità relativa dell'ambiente di conservazione:

- Controllo non trattato. I frutti sono stati conservati:
 - a 20 °C con elevata umidità relativa (95%) (controllo A) e bassa umidità relativa (55%) (controllo B)
 - a 14 °C con elevata umidità relativa (95%) (controllo A) e bassa umidità relativa (55%) (controllo B)
- Trattamento con 1-MCP. I frutti sono stati trattati con 200 nl l⁻¹ di 1-MCP per 24 ore a 20 °C ed elevata UR. Dopo il trattamento, i contenitori sono stati aperti ed i frutti sono stati conservati:
 - a 20 °C con elevata umidità relativa (95%) (controllo A) e bassa umidità relativa (55%) (controllo B)

- a 14 °C con elevata umidità relativa (95%) (controllo A) e bassa umidità relativa (55%) (controllo B)

6.7.2 *Discussione dei risultati*

Nelle Figure 6.34 e 6.35 sono riportati i risultati dei rilievi colorimetrici. Dai grafici si evince che, a parità di temperatura, l'evoluzione del colore della buccia dal verde al giallo, nei frutti del controllo procedeva più velocemente. Considerando i lotti conservati a 20 °C, ad 8 giorni dal trattamento con etilene, quando i frutti del controllo erano alla fine della loro shelf-life, quelli del trattamento con 1-MCP presentavano valori di $H^{\circ}=100-105$ (più verde che giallo). Anche durante la conservazione a 14 °C si osservava un andamento simile ma più prolungato nel tempo, effetto dovuto alla più bassa temperatura di conservazione. Questo "effetto temperatura" era riscontrabile anche dall'analisi dei dati relativi alla fluorescenza della buccia ed al contenuto in clorofilla (Figure 6.36-6.39): differenze nette in termini di attività fotochimica erano evidenti dopo 4 giorni a 20 °C e dopo una settimana a 14 °C. Dall'analisi dei solidi solubili (Fig. 5.40, 5.41) era evidente che durante la conservazione a 20 °C il contenuto zuccherino aumentava in maniera più consistente nei frutti del controllo, mentre, considerando la conservazione a 14 °C, si notava una evoluzione del contenuto zuccherino più lenta per i frutti non trattati rispetto al trattamento con 1-MCP, fenomeno questo che tendeva a scemare dopo circa 8 giorni di conservazione. L'analisi della consistenza (Fig. 5.42, 5.43) mostrava come a 20 °C le differenze fossero consistenza dei frutti mostrava come a 20 °C le differenze tra i trattamenti fossero più marcate rispetto alla conservazione a più bassa temperatura. Questo andamento rispecchiava la tendenza generale dell'esperimento, dove il *gap* tra frutti trattati e non trattati veniva in un certo qual modo compensato dall'effetto della bassa temperatura.

6.7.3 Conclusioni relative all'effetto dell'umidità relativa dell'ambiente di conservazione sull'evoluzione del colore della buccia in seguito al trattamento con 1-MCP

Che polpa e buccia avessero un comportamento diverso in riferimento alla biosintesi di etilene era già noto da tempo grazie agli studi di Ke e Tsai (1988) che riprendevano i precedenti lavori di Vendrell e McGlasson (1971). Ke e Tsai (1988) osservarono che durante il ripening della banana il contenuto in ACC della polpa era più elevato e l'attività dell'ACO più bassa se comparata alla buccia, e che la produzione di etilene veniva principalmente dalla polpa. In assenza di polpa, infatti, la buccia non perdeva completamente e con regolarità il colore verde salvo che non venisse fornito etilene esogeno. Questi autori conclusero che lo sverdimento della buccia dipendeva dalla diffusione dell'etilene dalla polpa alla buccia stessa.

È noto, inoltre, che il contenuto in acqua della buccia e dell'ambiente di conservazione giocano un ruolo importante durante la fase di ripening dei frutti. È stato dimostrato che c'è un aumento del rapporto in peso tra polpa e buccia durante il ripening della banana (John e Marchal, 1995): questo si pensa sia dovuto alla migrazione dell'acqua dalla buccia verso la polpa a causa dell'aumentato contenuto zuccherino della polpa stessa. Questi eventi possono influenzare sia l'aspetto che il comportamento di buccia e polpa nei frutti conservati, così, nel nostro esperimento abbiamo voluto testare il ruolo dell'umidità relativa sul comportamento della buccia a diverse temperature in seguito a trattamento con 1-MCP. I risultati di questo esperimento hanno mostrato che l'evoluzione del colore (H°) era principalmente influenzata dalla temperatura e dal trattamento effettuato sui frutti (controllo non trattato o applicazione dell'1-MCP) più che dall'umidità relativa. Comunque, nelle ultime fasi della shelf-life, indipendentemente dalla temperatura di conservazione, i frutti conservati in elevata umidità relativa presentavano un migliore aspetto esteriore rispetto agli altri: la buccia delle banane stoccate in bassa umidità era più disidratata e l'ingrigimento osservato durante i precedenti esperimenti nei frutti trattati con 1-MCP era più evidente. Inoltre, sui

frutti stoccati a bassa umidità, erano decisamente più accentuati gli imbrunimenti dovuti a urti e sfregamenti tra i caschi nella fase di *handling* post-raccolta, a prescindere dal trattamento subito. Nel nostro esperimento, inoltre, consistenza della polpa e contenuto zuccherino non erano influenzati dalle differenti condizioni di umidità relativa. Lavorando con banane pre-climateriche, recentemente Ullah *et al.* (2006), hanno riscontrato un moderato incremento nella conservazione dei frutti tenuti in elevata umidità (100%) rispetto ai frutti conservati ad un umidità minore (80%), in riferimento alle caratteristiche qualitative. Questi autori hanno rilevato un più intenso colore della buccia nelle banane conservate ad elevata umidità ma nessuna particolare differenza traspariva in termini di consistenza e contenuto in zuccheri, come da noi rilevato. Anche i panel test hanno dato risultati statisticamente simili in termini di sapore, dolcezza e astringenza.

Dai nostri risultati, quindi, si evince che indipendentemente dal livello di umidità durante il ripening, i frutti possono comunque portare avanti i processi fisiologici tipici di questa fase. Era comunque osservabile un'ingrigimento della buccia dei frutti trattati con 1-MCP ma questo fenomeno era minore, in termini di magnitudo, nelle banane conservate ad elevata umidità: questo fatto è imputabile alla maggiore perdita di acqua e al successivo indebolimento dei tessuti della buccia dei frutti conservati con bassi livelli di umidità. L'anormale andamento della maturazione talvolta riscontrato nel corso delle prove nei frutti trattati con 1-MCP, era ancora più evidente in alcuni frutti che manifestavano una decisa asincronia di maturazione tra buccia (ancora verde ma disidratata) e polpa (sovrāmatura) (Fig. 6.44).

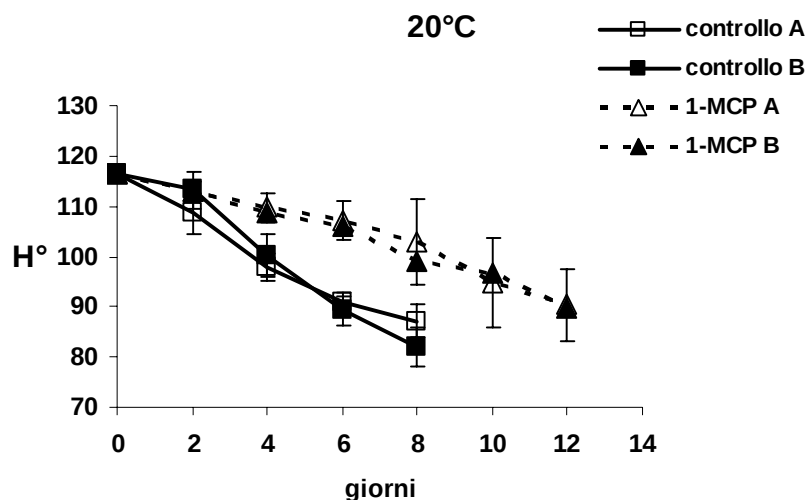


Fig. 6.34 Colore della buccia (Hue angle) della buccia di banane trattate solamente con 300 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 ore a 20°C e mantenute a 20°C con alta (A) o bassa (B) umidità relativa oppure trattate dapprima con 300 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 ore a 20°C ed in seguito con 200 nl l^{-1} di 1-MCP per 24 ore a 20°C e mantenute a 20°C con alta (A) o bassa (B) umidità relativa. Le barre indicano l'errore standard (ES; $n = 10$). Se assenti, le barre dell'ES ricadono all'interno delle dimensioni del simbolo.

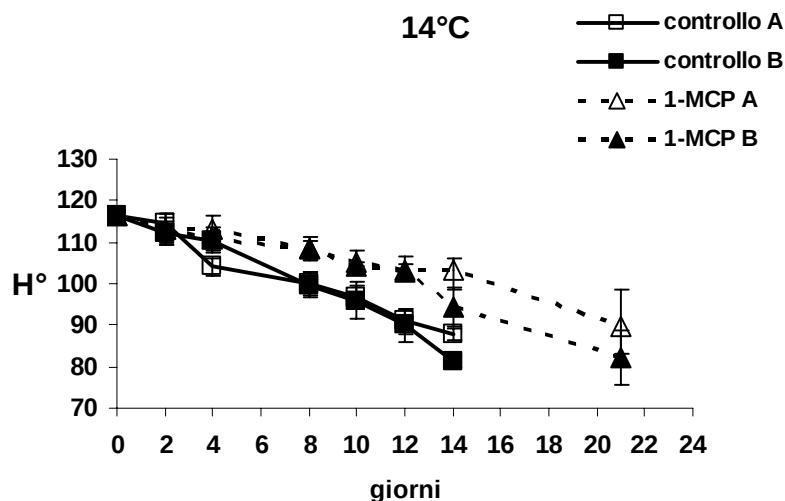


Fig. 6.35 Colore della buccia (Hue angle) della buccia di banane trattate solamente con 300 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 ore a 20°C e mantenute a 14°C con alta (A) o bassa (B) umidità relativa oppure trattate dapprima con 300 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 ore a 20°C ed in seguito con 200 nl l^{-1} di 1-MCP per 24 ore a 20°C e mantenute a 14°C con alta (A) o bassa (B) umidità relativa. Le barre indicano l'errore standard (ES; $n = 10$). Se assenti, le barre dell'ES ricadono all'interno delle dimensioni del simbolo.

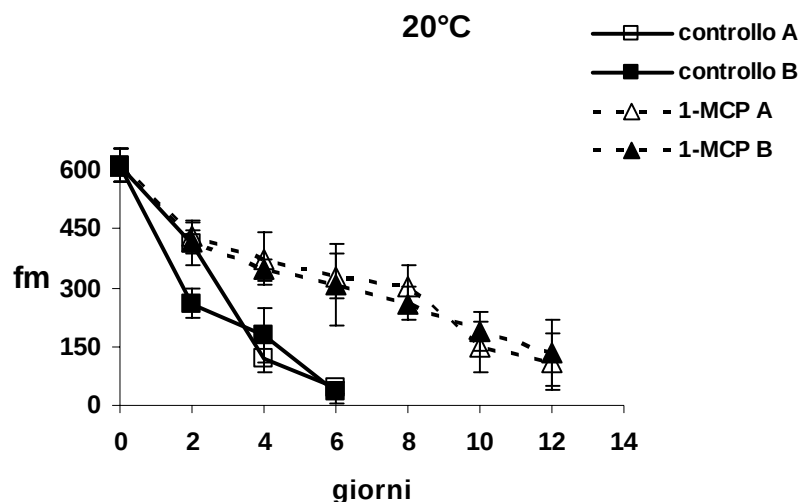


Fig. 6.36 Fluorescenza della clorofilla (fm) della buccia di banane trattate solamente con 300 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 ore a 20°C e mantenute a 20°C con alta (A) o bassa (B) umidità relativa oppure trattate dapprima con 300 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 ore a 20°C ed in seguito con 200 nl l^{-1} di 1-MCP per 24 ore a 20°C e mantenute a 20°C con alta (A) o bassa (B) umidità relativa. Le barre indicano l'errore standard (ES; $n = 10$). Se assenti, le barre dell'ES ricadono all'interno delle dimensioni del simbolo.

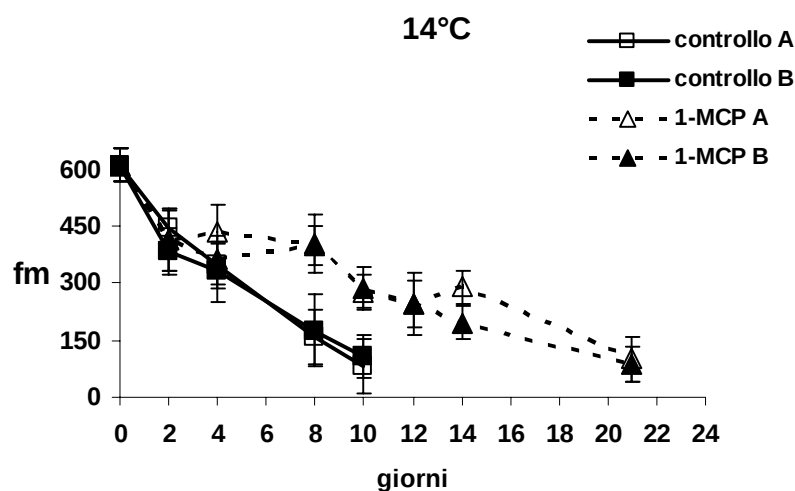


Fig. 6.37 Fluorescenza della clorofilla (fm) della buccia di banane trattate solamente con 300 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 ore a 20°C e mantenute a 14°C con alta (A) o bassa (B) umidità relativa oppure trattate dapprima con 300 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 ore a 20°C ed in seguito con 200 nl l^{-1} di 1-MCP per 24 ore a 20°C e mantenute a 14°C con alta (A) o bassa (B) umidità relativa. Le barre indicano l'errore standard (ES; $n = 10$). Se assenti, le barre dell'ES ricadono all'interno delle dimensioni del simbolo.

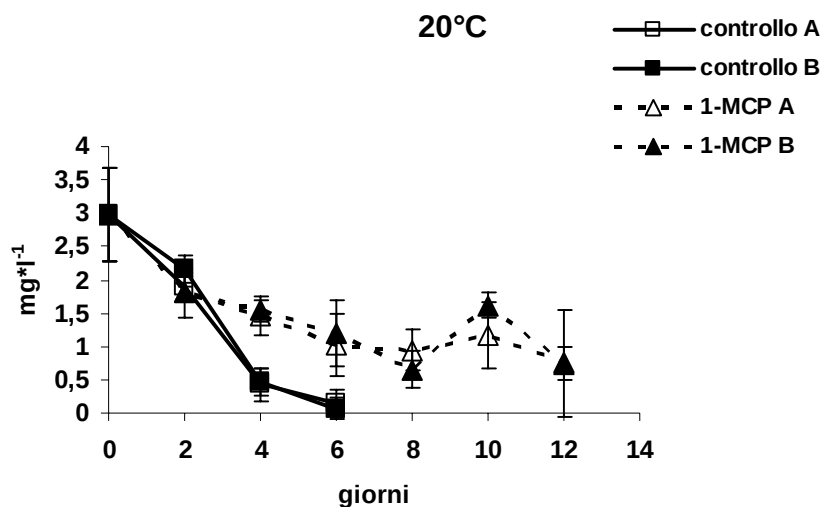


Fig. 6.38 Contenuto in clorofilla della buccia di banane trattate solamente con 300 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 ore a 20°C e mantenute a 20°C con alta (A) o bassa (B) umidità relativa oppure trattate dapprima con 300 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 ore a 20°C ed in seguito con 200 nl l^{-1} di 1-MCP per 24 ore a 20°C e mantenute a 20°C con alta (A) o bassa (B) umidità relativa. Le barre indicano l'errore standard (ES; $n = 10$). Se assenti, le barre dell'ES ricadono all'interno delle dimensioni del simbolo.

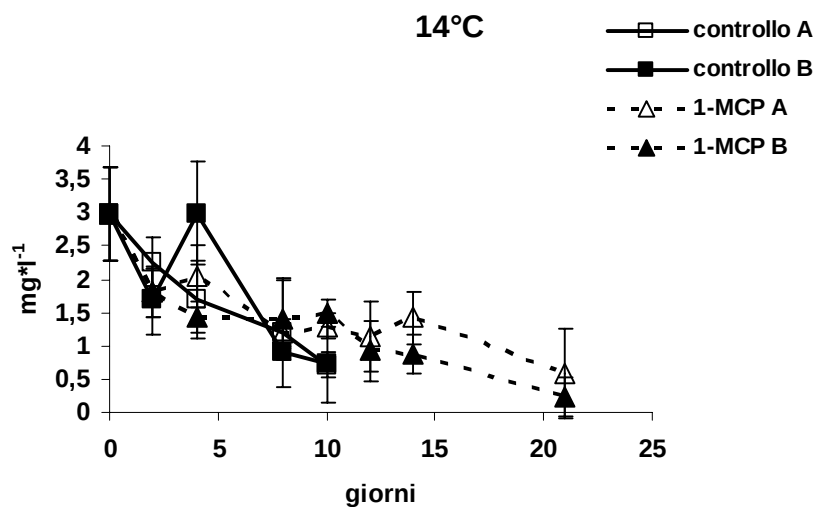


Fig. 6.39 Contenuto in clorofilla della buccia di banane trattate solamente con 300 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 ore a 20°C e mantenute a 14°C con alta (A) o bassa (B) umidità relativa oppure trattate dapprima con 300 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 ore a 20°C ed in seguito con 200 nl l^{-1} di 1-MCP per 24 ore a 20°C e mantenute a 14°C con alta (A) o bassa (B) umidità relativa. Le barre indicano l'errore standard (ES; $n = 10$). Se assenti, le barre dell'ES ricadono all'interno delle dimensioni del simbolo.

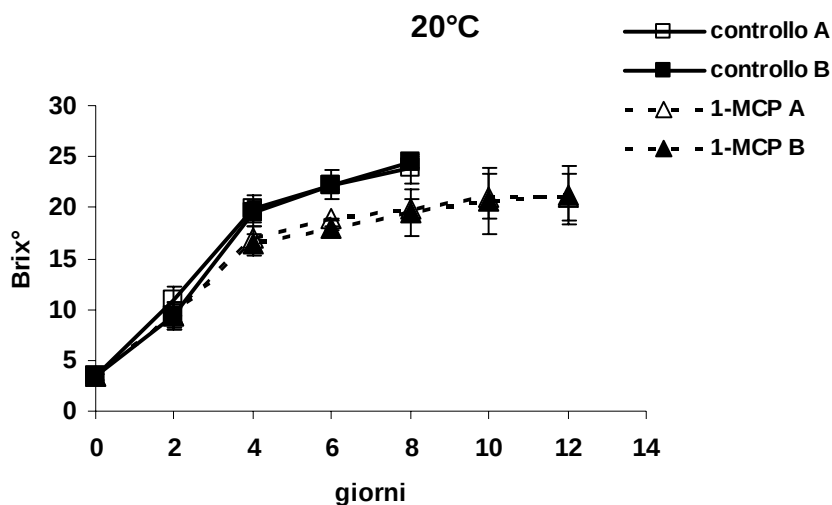


Fig. 6.40 Contenuto in solidi solubili (SSC) di banane trattate solamente con 300 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 ore a 20°C e mantenute a 20°C con alta (A) o bassa (B) umidità relativa oppure trattate dapprima con 300 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 ore a 20°C ed in seguito con 200 nl l^{-1} di 1-MCP per 24 ore a 20°C e mantenute a 20°C con alta (A) o bassa (B) umidità relativa. Le barre indicano l'errore standard (ES; $n = 10$). Se assenti, le barre dell'ES ricadono all'interno delle dimensioni del simbolo.

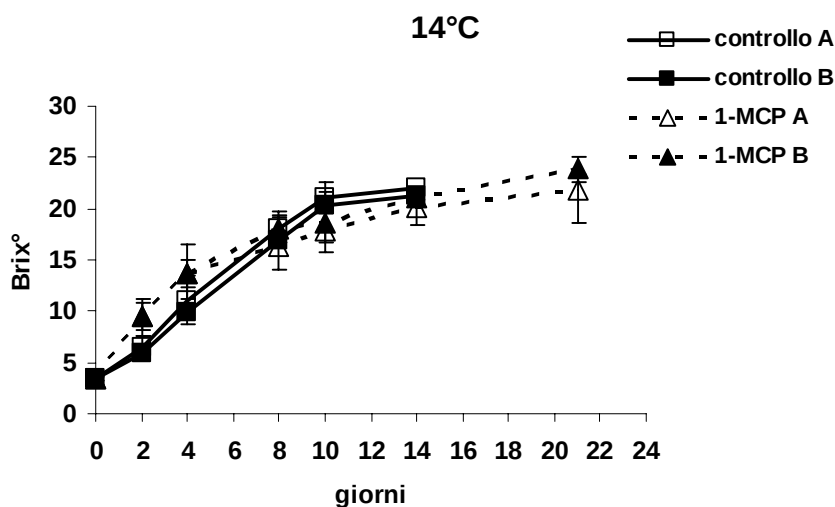


Fig. 6.41 Contenuto in solidi solubili (SSC) di banane trattate solamente con 300 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 ore a 20°C e mantenute a 14°C con alta (A) o bassa (B) umidità relativa oppure trattate dapprima con 300 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 ore a 20°C ed in seguito con 200 nl l^{-1} di 1-MCP per 24 ore a 20°C e mantenute a 14°C con alta (A) o bassa (B) umidità relativa. Le barre indicano l'errore standard (ES; $n = 10$). Se assenti, le barre dell'ES ricadono all'interno delle dimensioni del simbolo.

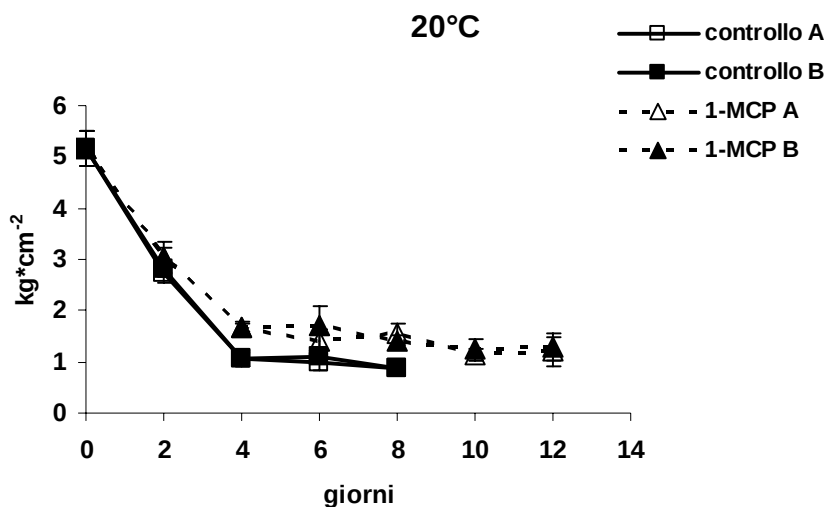


Fig. 6.42 Consistenza della polpa di banane trattate solamente con 300 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 ore a 20°C e mantenute a 20°C con alta (A) o bassa (B) umidità relativa oppure trattate dapprima con 300 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 ore a 20°C ed in seguito con 200 nl l^{-1} di 1-MCP per 24 ore a 20°C e mantenute a 20°C con alta (A) o bassa (B) umidità relativa. Le barre indicano l'errore standard (ES; $n = 10$). Se assenti, le barre dell'ES ricadono all'interno delle dimensioni del simbolo.

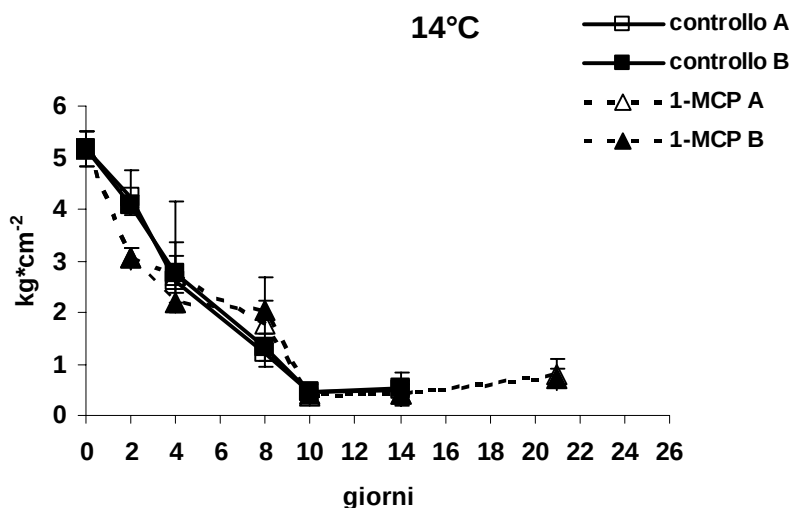


Fig. 6.43 Consistenza della polpa di banane trattate solamente con 300 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 ore a 20°C e mantenute a 14°C con alta (A) o bassa (B) umidità relativa oppure trattate dapprima con 300 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene per 24 ore a 20°C ed in seguito con 200 nl l^{-1} di 1-MCP per 24 ore a 20°C e mantenute a 14°C con alta (A) o bassa (B) umidità relativa. Le barre indicano l'errore standard (ES; $n = 10$). Se assenti, le barre dell'ES ricadono all'interno delle dimensioni del simbolo.



Fig. 6.44 Asincronia di maturazione tra polpa e buccia su frutti trattati con 1-MCP.

7. Discussioni finali

Sebbene fossero disponibili diverse pubblicazioni scientifiche riguardo all'applicazione dell'1-MCP nella fase di green life (fase pre-climaterica) (Golding *et al.*, 1998; Jiang *et al.*, 1999a; Harris *et al.*, 2000), al momento dell'inizio del presente Progetto non erano state ancora ben definite le potenzialità relative all'applicazione del composto nelle fasi subito successive all'avvio del climaterio, quando i processi metabolici legati alle variazioni di colore, consistenza e contenuto zuccherino sono nel pieno dello svolgimento. Nel corso dei nostri primi esperimenti l'applicazione di 1-MCP prima della maturazione con etilene ha mostrato una grande efficacia nel controllo della risposta maturativa in termini di ritardato viraggio del colore e della perdita di consistenza, così come in termini di ridotto incremento del contenuto zuccherino. Tutto ciò si traduceva in un prolungamento della fase preclimaterica a causa del “bloccaggio” della risposta maturativa.

In merito all'applicazione dell'1-MCP nella fase post-climaterica (cioè nelle 24-48 h successive al trattamento commerciale con etilene), attraverso lo studio dei parametri che potevano essere coinvolti nell'evoluzione della risposta all'1-MCP, quali la durata dei trattamenti, lo stadio di maturazione al momento dell'applicazione e le condizioni termoisometriche dell'ambiente di conservazione, i nostri dati hanno mostrato che concentrazioni attive di 200 nl l⁻¹ di 1-MCP nelle prime fasi climateriche, associate ad una durata del trattamento di 24 ore, possono effettivamente portare ad un prolungamento della shelf life, in termini di ritardata evoluzione del colore, del contenuto in zuccheri e della perdita di consistenza, quantificabile in 4 giorni.

I nostri risultati trovano riscontro negli esperimenti di Jiang *et al.* (1999b), i quali osservarono che l'1-MCP ritardava la maturazione delle banane se applicato 24 ore dopo il trattamento commerciale con etilene, ma risultava inefficace se applicato a 3 o 5 giorni di distanza e questo effetto veniva notato anche con concentrazioni decisamente elevate rispetto alla comune pratica di utilizzo (10000

nl l⁻¹ di 1-MCP). Pelayo *et al.* (2003) hanno riscontrato che in alcuni esperimenti banane trattate con 1000 nl l⁻¹ di 1-MCP per 6 o 24 ore ad uno stadio 3 o 4, mostravano una più elevata produzione di etilene ma i tassi respiratori erano decisamente ridotti ed i cambiamenti nel colore della buccia e la perdita di consistenza della polpa risultavano rallentati senza alcun impatto sulla componente aromatica del frutto. Questi dati risultano in disaccordo con le nostre esperienze. Comunque, questi stessi autori, testando le medesime concentrazioni in esperimenti successivi hanno notato un minore effetto dell'1-MCP nel controllare i cambiamenti etilene-indotti (Pelayo *et al.*, 2003).

L'inconsistenza negli effetti dell'1-MCP da noi riscontrata era legata, oltre che al momento di applicazione nella fase postclimaterica, alla lunghezza del trattamento maturativo con etilene (24 o 48 ore). In riferimento a quest'ultima variabile, abbiamo notato che l'induzione della fase climaterica con 200 ml l⁻¹ di etilene per 48 ore a 20°C accelerava i processi maturativi. Prendendo in considerazione i campioni dei due controlli dei trattamenti da 24 e 48 ore (controllo 24, controllo 48) durante il mantenimento a 20°C, il trattamento prolungato con etilene stimolava la perdita di consistenza, con differenze significative tra il terzo ed il sesto giorno di conservazione. è possibile notare che nel mantenimento a 20°C il trattamento prolungato con 200 µl l⁻¹ di etilene (48 h) stimolava il ripenio dei frutti, con differenze significative tra i due lotti tra il terzo ed il sesto giorno di conservazione. Anche tra i campioni trattati emergevano differenze simili, infatti i frutti esposti all'1-MCP dopo 48 ore di trattamento di etilene mostravano un ammorbidimento della polpa più rapido. In relazione allo sverdimento le differenze tra i lotti trattati per 24 o 48 ore erano molto più sottili, sia per il controllo che per i frutti trattati. Comunque, alla fine della conservazione, i frutti del lotto trattato con 1-MCP per 24 ore manifestavano una maggiore ritenzione di colore rispetto ai frutti del lotto trattato dopo 48 ore dall'induzione della fase climaterica.

Per contro, in un recente lavoro di Moradinezhad *et al.* (2006), è stato evidenziato un effetto opposto a quello da noi notato in seguito al trattamento con etilene per 48 ore. Questi autori hanno trattato le banane con 2, 20, 50 o 100 µl l⁻¹ di etilene

per 2 giorni consecutivi oppure con 100 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene il primo giorno e con 2 $\mu\text{l l}^{-1}$ durante il secondo giorno, prima dell'applicazione di 300 nl l^{-1} di 1-MCP per 24 ore a 22°C. I risultati della loro ricerca hanno evidenziato come l'1-MCP fosse più efficace nel prolungare la shelf life quando i frutti venivano trattati il primo giorno con 100 $\mu\text{l l}^{-1}$ di etilene ed il secondo con 2 $\mu\text{l l}^{-1}$. Questo effetto è stato spiegato tramite le osservazioni fatte da Wills *et al.* (2001) secondo le quali il periodo necessario al completamento della fase di ripenio nei frutti climaterici aumenta linearmente al decrescere logaritmico della concentrazione di etilene. Inoltre, questi ricercatori hanno notato un'interazione tra periodo dell'anno nel quale viene effettuata la raccolta ed efficacia del trattamento con 1-MCP. Sembrerebbe, di fatto, che l'efficacia dell'1-MCP nell'incrementare la shelf life dei frutti dipenda anche dall'interazione tra stagione della raccolta e concentrazioni utilizzate per il trattamento maturativo con etilene.

Pur avendo notato un effetto positivo dell'1-MCP sulla shelf-life dei frutti, una certa variabilità di risposta ai trattamenti è stata notata durante le prove in termini maturazione disforme della buccia che portava le banane ad assumere un colorazione anormale. Come riportato, questi sintomi possono essere descritti come un generale “pallore” grigiastro quando la buccia presenta ancora la tipica colorazione verde nella parte iniziale della fase climaterica: con il proseguire della maturazione col tempo, questa anormale colorazione si diffondeva irregolarmente su più parti della buccia portando ad un generale “grigiore” della buccia stessa. Spesso, associato a questo fenomeno e/o singolarmente, si osservava una maturazione “a chiazze”, con zone gialle e caratterizzate dal black spotting tipico della senescenza ed aree ancora verdi. Dobbiamo considerare che nella fase di ripenio, nelle banane si osserva un deciso aumento nella produzione di acetaldeide, di etanolo e nell'attività dell'ADH (alcol deidrogenasi), che probabilmente contribuisce sia alla rimozione dell'astringenza che allo sviluppo delle componenti volatili aromatiche (Hyodo *et al.*, 1983; Pesis *et al.*, 2001). Così, considerando anche il fatto che nei nostri esperimenti era stato notato un effetto deciso dell'1-MCP sulla soppressione del metabolismo respiratorio, abbiamo preso in considerazione l'ipotesi che l'irregolare maturazione della polpa in seguito al

trattamento potesse essere legata proprio a questo squilibrio, con accumulazione di composti volatili quali, appunto, acetaldeide ed etanolo. Questi composti influenzano in maniera diversa la maturazione a seconda del frutto e la risposta varia con la specie (Pesis, 2005) e nelle banana è stato visto che acetaldeide ed etanolo possono dare luogo a fenomeni di decolorazione della buccia (Hewage *et al.*, 1995). Quindi, allo scopo di verificare questa ipotesi, sono stati approntati altri trattamenti che avrebbero potuto portare ad un decorso maturativo del genere. Uno dei più noti disordini postraccolta della banana è il danno da freddo (chilling injury) che rende la buccia proprio di un colore “grigiastro” simile a quello da noi osservato nei frutti trattati con 1-MCP (Ratule *et al.*, 2006; Pantastico *et al.*, 1967). Anomale decolorazioni della buccia sono state riportate anche da Wills *et al.* (1990) e Klieber *et al.* (2002) in seguito a trattamenti con azoto.

Comunque, i risultati hanno mostrato che tutte le condizioni sperimentali testate non hanno generato alterazioni simili ai suddetti sintomi, portandoci a rivalutare l’ipotesi iniziale. Inoltre, in alcuni dei frutti trattati con 1-MCP era stata notata una decisa asincronia di maturazione tra polpa e buccia: alcuni frutti pur presentando una buccia ancora verde (ma disidratata), al loro interno la polpa mostrava caratteristiche di sovraturazione. Questa distruzione/soppressione della risposta maturativa, talvolta notata nei frutti trattati con 1-MCP nelle prime fasi dell’induzione climaterica (i.e. 24 ore dal trattamento con etilene) potrebbe trovare spiegazione nel fatto che l’espressione di siti recettori per l’etilene aumenta nel corso della fase climaterica portando ad una progressiva diminuzione della sensibilità dei tessuti all’etilene, come dimostrato da Klee e Tieman (2002). Quindi, nei nostri esperimenti con banane nelle primissime fasi climateriche (24 ore dal trattamento con etilene, *colour stage 2*), i frutti risultavano decisamente più sensibili all’azione dell’etilene e di conseguenza all’azione di inibitori quali l’1-MCP. Questa elevata sensibilità all’1-MCP potrebbe aver quindi portato ad un eccessivo blocco dei fenomeni maturativi con la conseguente asincronia di maturazione tra polpa e buccia da noi osservata.

Questa ipotesi spiegherebbe, inoltre, la mancanza di efficacia dei trattamenti tardivi con 1-MCP da noi osservata su banane trattate ad uno stadio di maturazione

più avanzato (*colour stage* 3-4): come precedentemente esposto, di fatto, col progredire dalla maturazione, a causa della ridotta sensibilità dei tessuti all'etilene, diminuisce anche la suscettibilità verso eventi inibenti quali il trattamento con 1-MCP.

Comunque, la dissociazione degli eventi maturativi dovuta alla somministrazione di 1-MCP è una problematica comune anche ad altri frutti. Ad esempio, nel caso di pere "Bartlett", i cambiamenti di colore della buccia risultavano alterati e non raggiungevano i requisiti di qualità richiesti dai grossisti del settore (Ekman, 2004). Inoltre, tentativi di "recupero" dei normali processi maturativi in avocado dopo il trattamento con 1-MCP attraverso l'applicazione di etilene esogeno non hanno dato risultati apprezzabili (Jeong e Huber, 2004).

In seguito è stata rivolta particolare attenzione all'importanza dell'umidità relativa (UR) sull'evoluzione del colore della buccia. Conservando i frutti a due diverse UR (55-60% e 95%) è stato osservato che soprattutto nelle ultime fasi della shelf-life le banane beneficiavano dell'ambiente ad elevata umidità. In altre parole, i frutti trattati con 1-MCP e conservati ad elevata UR, pur manifestando la comparsa di imbrunimenti, denotavano una minore incidenza degli stessi, in termini di magnitudo, rispetto a quelli conservati a bassa UR.

Dai nostri esperimenti sono inoltre sorti altri interessanti spunti di riflessione. Durante lo svolgimento delle prove è stata osservata una maggiore efficacia del trattamento con 1-MCP sui frutti più immaturi (i.e. minore arco di tempo tra fioritura e raccolta dei frutti stessi) deducibile dal fatto che le banane provenienti alcuni caschi presentavano un andamento maturativo più lento rispetto ad altri. Questa maggiore lentezza (quantificabile in 2-3 gg) era riscontrata sia nei frutti trattati che nel controllo non trattato a parità di casco di provenienza, a testimonianza del fatto che la maggiore incidenza del trattamento con 1-MCP ed il concomitante rallentamento nella maturazione dei frutti del controllo sia da attribuire alla minore maturità fisiologica alla raccolta per questi frutti, in accordo con le osservazioni di Harris *et al.* (2000).

Inoltre, da un recente lavoro di Moradinezhad *et al.* (in pubblicazione) sembra che alle variabili capaci di influenzare l'efficacia del trattamento con 1-MCP, vada

aggiunta la stagione di raccolta.

Prima di concludere la nostra discussione, ci sembra doveroso ricordare che durante le prove è stato notato che, in termini di mantenimento della consistenza, la bassa temperatura di conservazione (14°C) aveva sui frutti del controllo un'efficacia simile a quella dell'1-MCP sui frutti trattati e mantenuti a 20°C. Per contro, prendendo sempre in considerazione i suddetti lotti, l'effetto osservato sull'evoluzione del colore della buccia era più sottile. Comunque, paragonando i campioni del controllo mantenuto a 20°C e i campioni del controllo mantenuto a 14°C, questi ultimi incrementavano la shelf life di 2 giorni.

8. Conclusioni

Nel corso delle nostre sperimentazioni tese a valutare l'efficacia dell'1-MCP nel prolungare la shelf life delle banane, la durata dei trattamenti (3-6-12-24 ore) ed il momento dell'applicazione dell'1-MCP (durante le prime fasi climateriche o ad un *colour stage* più avanzato), la durata dei trattamenti con etilene (24 o 48 ore) e le condizioni termoigrometriche dell'ambiente di conservazione hanno influenzato in maniera più o meno decisa, a seconda del caso, la capacità di questo composto nel contrastare l'azione dell'etilene.

Nelle condizioni testate i nostri dati hanno mostrato che:

- L'utilizzo di concentrazioni attive di 200 nl l⁻¹ di 1-MCP al *colour stage* 2 erano sufficienti a provocare un incremento della shelf life dei frutti in termini di ritardata evoluzione del colore della buccia e di mantenimento della consistenza della polpa.
- La durata del trattamento con 1-MCP doveva essere superiore alle 12 h con un optimum di 24 h alla temperatura di 20°C per ottenere un effetto inibitorio sulla fase di ripenio.
- Trattamenti effettuati nella prime fasi post-climateriche (*colour stage* 2) risultavano più efficaci di quelli effettuati ad uno stadio più tardivo (*colour stage* 3-4).
- Evidenti alterazioni dei processi maturativi legate all'evoluzione del colore della buccia.
- L'elevata umidità relativa dell'ambiente di conservazione sembra favorire l'evoluzione del colore della buccia indipendentemente dal trattamento.

Nel caso delle banane, fattori quali lo stadio di maturazione, la cultivar, precedente esposizione all'etilene o condizioni di crescita sembrano influenzare decisamente i risultati dell'applicazione dell'1-MCP e la capacità dei frutti di maturare normalmente. Questo composto in certi casi ha distrutto la naturale ed armonica sequenza di eventi che caratterizza il ripening della banana. Sequenza di eventi che, paradossalmente, si cerca di uniformare proprio con il trattamento commerciale con etilene.

In conclusione, se da un lato abbiamo effettivamente riscontrato la capacità dell'1-MCP nel ritardare la maturazione delle banane, dall'altro, le anomalie nella risposta maturativa riscontrate durante gli esperimenti pongono un serio interrogativo riguardo ad una sicura ed affidabile applicazione commerciale di questo inibitore dell'azione etilenica.

9. Acknowledgements/Ringraziamenti

I would like to deeply thank Dr. John B. Golding for the effort spent in helping me and all staff of Gosford Horticultural Institute for supporting me during the period spent in Australia.

I am very grateful to all staff of the Ourimbah Campus of University of Newcastle for the wonderful reception I received.

I would like also to thank Professor Barry McGlasson and Dr. D.R. Harris for their advices and helpful comments.

Si ringrazia la Agrofresh Inc-Rohm&Haas Italia s.r.l. per la fornitura dell'1-MCP (SmartFresh®) durante la fase sperimentale.

Si ringrazia la Dole Italia ed in particolare lo staff del Centro di Distribuzione Dole di S. Palomba (Roma) per la gentile collaborazione e per la fornitura dei frutti.

10. Bibliografia

- Abeles FB, 1986. Role of ethylene in *Lactuca sativa* cv. "Grand Rapids" seed germination. *Plant Physiol.* 81, 780-787.
- Abeles FB, Wydoski SG, 1987. Inhibitors of ethylene synthesis and action: a comparison of their activities in a lettuce root growth model system. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 112, 122-125.
- Able AJ, Wong LS, Prasad A, O'Hare TJ, 2002. 1-MCP is more effective on a floral brassica (*Brassica oleracea* ver. *italica* L.) than a leafy brassica (*Brassica rapa* var. *chinensis*). *Postharvest Biol. Technol.* 26, 147-155.
- Alexander L, Grierson D, 2002. Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climacteric fruit ripening. *Journal of Experimental Botany* 53 (377), 2039-2055.
- Adams DO, Yang SF, 1979. Ethylene biosynthesis: identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76, 170-174.
- Amrhein N, Wenker D, 1979. Novel inhibitors of ethylene production in higher plants. *Plant Cell Physiology* 20, 1635-1642.
- Apelbaum A, Burgoon AC, Anderson JD, Solomos T and Lieberman M, 1981. Some characteristics of the system converting 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene. *Plant Physiology* 67, 80-84.
- Bagnato N, Barrett M, Sedgley M and Klieber A, 2003. The effect on the quality of Cavendish bananas, which have been treated with ethylene, of exposure to 1-methylcyclopropene. *International journal of Food Science and Technology* 38, 745-750.
- Barry CS, Blume B, Bouzayen M, Cooper W, Hamilton AJ, Grierson D, 1996. Differential expression of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene family of tomato. *The Plant Journal* 9, 525-535.
- Barry CS, Llop-Tous MI, Grierson D, 2000. The regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene expression during the transition from system-1 to system-2 ethylene synthesis in tomato. *Plant Physiology* 123, 979-986.
- Baur AH, Yang SF, Pratt HK, Biale JB, 1971. Ethylene biosynthesis in fruit tissues. *Plant Physiol.* 47, 696-699.

- Ben-Amor M, Flores B, Latché A, Bouzayen M, Pech JC and Romojaro F, 1999. Inhibition of ethylene biosynthesis by antisense ACC oxidase RNA prevents chilling injury in Charentais cantaloupe melons. *Plant Cell Environment* 22, 1579-1586.
- Beyer Jr EM, 1976. A potent inhibitor of ethylene action in plants, *Plant Physiology* 58, 268-271.
- Biale JB, Young RE and Olmstead AJ 1954. Fruit respiration and ethylene production. *Plant Physiology* 29, 168-174.
- Biale JB, Young RE, 1981. Respiration and Ripening in Fruits: Retrospect and prospect. In: J. Friend, M.J.C. Rhodes, eds., "Recent Advances in the Biochemistry of Fruits and Vegetables", Academic Press, London, 1-39.
- Blankenship SM, Sisler EC, 1989. 2,5-Norbornadiene retards apple softening. *HortScience* 24, 313-314.
- Blankenship SM, Dole JM, 2003. 1-Methylcyclopropene: a review. *Postharvest Biology and Biotechnology* 28, 1-25.
- Bleeker AB, Estelle MA, Somerville C and Kende H, 1988. Insensitivity to ethylene conferred by a dominant mutation in *Arabidopsis thaliana*. *Science* 241, 1086-1089.
- Botondi R, DeSantis D, Bellincontro A, Vizovitis K, Mencarelli F, 2003. Influence of ethylene inhibition by 1-MCP on apricot quality, volatiles evolution, and glycosidases activity of low and high aroma varieties of apricots. *J. Agric. Food Chem.* 51, 1189-1200.
- Brady CJ, O'Connell PBH, Smydzuk J and Wade NL, 1970. Permeability, sugar accumulation, and respiration rate in ripening banana fruits. *Australian Journal of Biological Sciences* 23, 1143-1152.
- Bufler G, 1986. Ethylene-promoted conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene in peel of apple at various stages of fruit development. *Plant Physiology* 80, 539-543.
- Burg SP, 1962. The physiology of ethylene formation. *Annual Review of Plant Physiology* 13, 265-302.
- Burg SP and Burg EA, 1962. Role of ethylene in fruit ripening. *Plant Physiology* 37, 179-189.
- Burg SP and Burg EA, 1964. Evidence for a naturally occurring inhibitor of fruit ripening. *Plant Physiology* 39, Suppl-X.

- Burg SP and Burg EA 1965a. Ethylene action and the ripening of fruits. *Science* 148, 1190-1196.
- Burg SP and Burg EA 1965b. Relationship between ethylene production and ripening in bananas. *Botanical Gazette* 126, 200-204.
- Burg SP, Burg EA, 1967. Molecular requirements for the biological activity of ethylene. *Plant Physiology* 42, 144-152
- Burg SP, 1973. Ethylene in plant growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 591-597.
- Burg SP, Clagett CO, 1967. Conversion of methionine to ethylene in vegetative tissue and fruits. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 27, 125-130.
- Celikel FG, Reid MS, 2001. An alternative model for the inhibition of ethylene action by 1-methylcyclopropene (1-MCP). *Tecniche postraccolta dei prodotti ortofrutticoli*, F.Mencarelli e G.Serra, Atti ARSIA.
- Cook EL, Van Staden J, 1987. Silver action in the cut carnation flower. *Plant Physiology* 25, 485-492.
- Cousins HH, 1910. Citato in Burg, 1962. *Jamacia Department Agriculture Annual Report* 7.
- DeEll JR, Murr DP, Porteous MD, Rupasinghe HPV, 2002. Influence of temperature and duration of 1-methylcyclopropene (1-MCP) treatment on apple quality. *Postharvest Biol. Technol.* 24, 349-353.
- De Martino G, Mincini M, Forniti R, Botondi R, Mencarelli F, 2004. Ethylene Depending and Non-Depending Metabolisms during Postharvest Banana Ripening. In: *Proceedings of the 3rd International Symposium on Tropical and Subtropical Fruits*, Fortaleza, Brasil (in press).
- De Martino G, Vizovitis K, Botondi R, Bellincontro A, Mencarelli F, 2006. 1-MCP controls ripening induced by impact injury on apricots by affecting SOD and POX activities. *Postharvest Biology and Technology* 39, 38-47.
- Denny FE, 1924. Effect of ethylene upon respiration of lemons. *Bot. Gaz.* 77, pp. 322-329.
- Domínguez M and Vendrell M, 1993. Ethylene biosynthesis in banana fruit: evolution of EFE activity and ACC levels in peel and pulp during ripening. *Journal of Horticultural Science* 68, 63-70.
- Dong JG, Fernandezmaculet JC, Yang SF, 1992. Purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase from apple fruit.

- Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 89:9789-9793.
- Environmental Protection Agency. Federal Register, July 26, 2002. Vol 67, Number 144, 48796-48800.
- Ekman JH, Clayton M, Biasi WM, Mitcham EJ, 2004. Interactions between 1-MCP concentration, treatment interval and storage time for “Bartlett” pears. *Postharvest Biology and Technology* 31, 127-136.
- FAO (2006) FAOSTAT Agriculture Data. www.fao.org
- Gamble R, Coonfield M, Schaller GE, 1998. Histidine kinase activity of the ETR1 ethylene receptor from Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 95:7825-7829.
- Gane R, 1934. Production of ethylene by some ripening fruits. *Nature* 134, 1008.
- Golding JB, Shearer D, Wyllie SG and McGlasson WB, 1998. Application of 1-MCP and propylene to identify ethylene-dependent ripening processes in mature banana fruit. *Postharvest Biology and Technology* 14, 87-98.
- Guzman P and Ecker JR, 1990. Exploiting the triple response of Arabidopsis to identify ethylene-related mutants. *Plant Cell* 2, 513-524.
- Halder-Doll H, Bangerth F, 1987. Inhibition of autocatalytic C₂H₄-biosynthesis by AVG applications and consequences on the physiological behaviour and quality of apple fruits in cool storage. *Scientia Horticulturae* 33, 87-96.
- Halevy AH and Mayak S, 1981. Senescence and postharvest physiology of cut carnation flowers. *Horticultural Reviews* 3, 59-143.
- Hewage KS, Wainwright H, Luo Y, 1995. Effect of ethanol and acetaldehyde on banana ripening. *Journal of Horticultural Science* 70, 51-55.
- Hoffman NE and Yang SF, 1982. Enhancement of wound-induced ethylene synthesis by ethylene in preclimacteric cantaloupe. *Plant Physiology* 69, 317-322.
- Hoffman NE, Yang SF, McKeon T, 1982. Identification of 1-(malonylamino) cyclopropane-1-carboxylic acid as a major conjugate of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, an ethylene precursor in higher plants. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 104, 765-770.
- Hord HHV and Spell DP, 1962. Temperature as a basis for forecasting banana production. *Tropical Agriculture* 39, 219-223.
- Hua J, Meyerowitz EM, 1998. Ethylene responses are negatively regulated by a

- receptor gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Cell* 94, 261-271.
- Hyodo H, Tanaka K, 1982. Inhibition of ethylene production by fatty acids in fruit and vegetable tissues. *Plant Cell Physiology* 23, 1237-1243.
- Hyodo H, Tanaka K, Watanabe K, 1983. Wound-induced ethylene production and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase in mesocarp tissue of winter squash fruit. *Plant Cell Physiol.* 24, 963–969.
- Inaba A and Nakamura R, 1988. Numerical expression for estimating the minimum ethylene exposure time necessary to induce ripening in banana fruit. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 113, 561-564.
- Inskeep WP, Bloom PR, 1985. Extinction coefficients of chlorophyll a and b in N,N-Dimethylformamide and 80% acetone. *Plant Physiology* 77, 483-485.
- Jayanty S, Song J, Rubinstein NM, Chong A, Beaudry RM, 2002. Temporal relationship between ester biosynthesis and ripening events in bananas. *Journal of American Society of Horticultural Science* 127(6), 998-1005.
- Jeong J e Huber DJ, 2004. Suppression of avocado (*Persea americana* Mill.) fruit softening and changes in cell wall matrix polysaccharides and enzymes activities: differential responses to 1-MCP and delayed ethylene application. *Journal of the American Society of Horticultural Science* 129, 752-759.
- Jiang Y, Joyce DC and Macnish AJ, 1999a. Extension of the shelf life of banana fruit by 1-methylcyclopropene in combination with polyethylene bags. *Postharvest Biology and Technology* 16, 187-193.
- Jiang Y, Joyce DC and Macnish AJ, 1999b. Responses of banana fruit to treatment with 1-methylcyclopropene. *Plant Growth Regulation* 28, 77-82.
- Jiang Y and Joyce DC, 2000. Effects of 1-methylcyclopropene alone and in combination with polyethylene bags on the postharvest life of mango fruit. *Annals of Applied Biology* 137, 321-327.
- John P and Marchal J, 1995. Ripening and biochemistry of the fruit. In: Gowen S, (Ed.) *Bananas and Plantains*, 434-467. London: Chapman & Hall.
- Ke LS and Tsai PL, 1988. Changes of ACC content and EFE activity in peel and pulp of banana fruit during ripening in relation to ethylene production. *J. Agri. Assoc. China. New Series* 143, 48-60.
- Kidd F, West C, 1933. The effects of ethylene and apple vapours on the ripening of fruits. *Gt. Brit. Dept. Sci. Ind. Res., Food Invest. Bd. Rept.* 1925, 37-41.

- Kidd F, West C, 1934. The influence of the composition of the atmosphere upon the incidence of the climacteric in apples. *Gt. Brit. Dept. Sci. Ind. Res., Food Invest. Bd. Rept.* 1933, 51-57.
- Klee HJ, 2002. Control of ethylene-mediated processes in tomato at the level of receptors. *Journal of Experimental Botany*, 53 (377), 2057-2063.
- Klee H and Tieman D, 2002. The tomato ethylene receptor gene family: Form and function. *Physiologia Plantarum* 115, 336–341.
- Klieber A, Bagnato N, Barrett R, Sedgley M 2002. Effect of post-ripening nitrogen atmosphere storage on banana shelf life, visual appearance and aroma. *Postharvest Biology and Technology* 25, 15-24.
- Klieber A, Bagnato N, Sedgley M, Barrett R 2003. Banana ripening: supporting the art with science. *Acta Hort (ISHS)* 628, 475-480.
- Ku VVV and Wills RBH, 1999. Effect of 1-methylcyclopropene on the storage life of broccoli. *Postharvest Biology and Technology* 17, 127-132.
- Ku VVV, Wills RBH and Ben-Yehoshua S, 1999. 1-methylcyclopropene can differentially affect the postharvest life of strawberries exposed to ethylene. *HortScience* 34, 119-120.
- Kushad MM, Richardson DG, Ferro AJ, 1983. Intermediates in the recycling of 5-methylthioribose to methionine in fruits. *Plant Physiology* 73, 257-261.
- Leslie C.A., Romani R.J., 1988, Inhibition of ethylene biosynthesis by salicylic acid, *Plant Physiology* 88:833-837.
- Li N, Mattoo AK, 1994. Deletion of the carboxyl-terminal region of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase, a key protein in the biosynthesis of ethylene, results in catalytically hyperactive, monomeric enzyme. *Journal of Biological Chemistry* 269, 6908-6917.
- Li N, Huxtable S, Yang SF, Kung SD, 1996. Effects of N-terminal deletions on 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase activity, *FEBS Letters* 378, 286-290.
- Lieberman M, 1977. Biosynthesis and bioregulation of ethylene in fruit ripening, *Proc. of International Society of Citriculture* 3, 722-727.
- Lieberman M, 1979. Biosynthesis and action of ethylene. *Annual Review of Plant Physiology* 30, 533-591.

- Liu FW, 1976a. Correlation between banana storage life and minimum treatment time required for ethylene response. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 101, 63-65.
- Liu FW, 1976b. Storing ethylene-pretreated bananas in controlled atmosphere and hypobaric air. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 101, 198-201.
- Liu FW, 1976c. Banana response to low concentrations of ethylene. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 101, 222-224.
- Liu FW, 1978. Synergistic effects of high temperature and low concentration ethylene on ripening of 'Dwarf Cavendish' bananas. *HortScience* 13, 690-692.
- Liu Y, Hoffman NE and Yang SF, 1985. Promotion by ethylene of the capability to convert 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene in preclimacteric tomato and canteloupe fruits. *Plant Physiology* 77, 407-411.
- Lohani S, Trivedi PK, Nath P, 2004. Changes in activities of cell wall hydrolases during ethylene-induced ripening in banana: effect of 1-MCP, ABA and IAA. *Postharvest Biology and Technology* 31, 119-126.
- Mattoo AK, Suttle JC, 1991. *The Plant Hormone Ethylene*, CRC Publ. Inc., Boca Raton, Florida.
- Macnish AJ, Joyce DC, Hofman PJ 1997. 1-Methylcyclopropene delays ripening of 'Cavendish' banana fruit. In: *Proceedings of the Australasian Postharvest Conference*, University of Western Sydney, Australia. Pp. 282-284.
- Macnish AJ, Joyce DC, Hofman PJ, Simons DH 2000. 1-MCP gas can be used to control banana ripening. *Good Fruit and Vegetables* 10, 56.
- Marriott J, New S, Dixon EA and Martin KJ (1979) Factors affecting the preclimacteric period of banana fruit bunches. *Annals of Applied Biology* 93, 91-100.
- McGlasson WB, 1985. Ethylene and fruit ripening. *HortScience* 20, 51-54.
- McKeon TA, Fernandez-Maculet JC, Yang SF, 1995. Biosynthesis and metabolism of ethylene. In, *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*, 2nd ed., P.J. Davies, ed., Kluwer, Dordrecht,

Netherlands, 118-139.

- McMurchie EJ, McGlasson WB and Eaks IL, 1972. Treatment of fruit with propylene gives information about the biogenesis of ethylene. *Nature* 237, 235-236.
- Miyazaki JH, Yang SF, 1987. Metabolism of 5-methylthioribose to methionine. *Plant Physiology* 84, 277-281.
- Moradinezhad F, Able AJ, Sedgley M, Klieber A, 2006. Concentration and Duration of Ethylene Treatment Influences the Response of Banana to 1-Methylcyclopropene. *Proc. IVth IC on MQUIC Eds. A.C. Purvis et al. Acta Hort.* 712, ISHS.
- Murr DP and Yang SF, 1975. Conversion of 5-methylthioadenosine to methionine by apple tissue. *Phytochemistry* 14, 1291-1292.
- Neljubow DN, 1901. Über die horizontale Nutation der Stengel von *Pisum sativum* und einiger anderen Pflanzen, *Beih. Bot. Centralbl.* 10, 128-139.
- Oeller PW, Wong LM, Taylor LP, Pike DA, Theologis A, 1991. Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA. *Science* 254, 437-439.
- Oetiker JH, Olson DC, Shiu OY, Yang SF, 1997. Differential induction of seven 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase genes by elicitor in suspension cultures of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Molecular Biology* 34, 275-286.
- Ortiz R, 1995. Musa genetics. In: Gowen S, (Ed.) *Bananas and Plantains*, 84-109. London: Chapman & Hall.
- Owens LD, Lieberman M, Kunishi A, 1971. Inhibition of ethylene production by rhizobitoxin, *Plant Physiology* 48, 1-4.
- Pantastico EB, Grierson W, Soule J, 1967. Chilling injury in tropical fruits: I. Bananas (*Musa paradisiaca* var. *Sapientum* cv. *Lacatan*). *Proc Amer Soc Hort Sci* 11, 83-91.
- Paull RE, 1996. Ethylene, storage and ripening temperatures affect Dwarf Brazilian banana finger drop. *Postharvest Biology and Technology* 8, 65-74.
- Pelayo C, Vilas-Boas EV de B, Benichou M and Kader AA 2003. Variability in responses of partially ripe bananas to 1-methylcyclopropene. *Postharvest Biology and Technology* 28, 75-85.

- Peacock BC, 1972. Role of ethylene in the initiation of fruit ripening. *Queensland Journal of Agricultural and Animal Sciences* 29, 137-145.
- Peacock BC, 1975. 'Mixed ripe' a problem for the banana industry. *Queensland Agricultural Journal* 101, 201-204.
- Peacock BC and Blake JR, 1970. Some effects of non-damaging temperatures on the life and respiratory behaviour of bananas. *Queensland Journal of Agricultural and Animal Sciences* 27, 147-168.
- Pesis E, Copel A, Ben-Arie R, Feygenberg O, Aharoni Y, 2001. Low oxygen treatment for inhibition of decay and ripening in organic banana. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 76, 648–652.
- Pesis E, 2005. The role of anaerobic metabolites, acetaldehyde and ethanol, in fruit ripening, enhancement of fruit quality and fruit deterioration. *Postharvest Biology and Technology* 37, 1–19.
- Porat R, Weiss B, Cohen L, Daus A, Goren R and Droby S, 1999. Effects of ethylene and 1-methylcyclopropene on the postharvest qualities of 'Shamouti' oranges. *Postharvest Biology and Technology* 15, 155-163.
- Ratule MT, Osman A, Ahmad SH, Saari N, 2006. Development of chilling injury of 'Berangan' banana (*Musa* cv. Berangan (AAA)) during storage at low temperature. *Journal of Food, Agriculture and Environment* 4, 128-134.
- Rocklin AM, Tierney DL, Kofman V, Brunhuber NMW, Hoffman BM, Christoffersen RE, Reich NO, Lipscomb JD, Que L, 1999. Role of the nonheme Fe(II) center in the biosynthesis of the plant hormone ethylene. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 96, 7905-7909.
- Rottmann WH, Peter GF, Oeller PW, Keller JA, Shen NF, Nagy BP, Taylor LP, Campbell AD, Theologis A, 1991. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in tomato is encoded by a multigene family whose transcription is induced during fruit and floral senescence. *Journal of Molecular Biology* 222, 937-961.
- Saftner RA, 1989. Effects of organic amines on α -aminoisobutyric acid uptake into the vacuole and on ethylene production by tomato pericarp slices. *Physiologia Plantarum* 75, 485-491.
- Sanders IO, Ishizawa K, Smith AR, Hall MA, 1990. Ethylene binding and action in rice seedlings. *Plant Cell Physiology* 31, 1091-1099.

- Salminen SO and Young RE, 1975. The control properties of phosphofructokinase in relation to the respiratory climacteric in banana fruit. *Plant Physiology* 55, 45-50.
- Saltveit Jr ME, Larson RA, 1983. Effect of mechanical stress and inhibitors of protein synthesis on leaf epinasty in mechanically stressed poinsettia plants. *Journal of American Society of Horticultural Science* 108, 253-257.
- Satoh S, Esashi Y, 1983. Ethylene production, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid content and its conversion to ethylene in axial segments of dormant and nondormant cocklebur seeds. *Plant Cell Physiology* 24, 883-887.
- Selvarajah S, Bauchot AD and John P, 2001. Internal browning in cold-stored pineapples is suppressed by a postharvest application of 1-methylcyclopropene. *Postharvest Biology and Technology* 23, 167-170.
- Serek M, Sisler EC and Reid MS, 1995. 1-Methylcyclopropene, a novel gaseous inhibitor of ethylene action, improves the life of fruits, cut flowers and potted plants. *Acta Horticulturae* 394, 337-345.
- Schaller GE, Bleecker AB, 1995. Ethylene binding sites generated in yeast expressing the Arabidopsis ETR1 gene. *Science* 270, 1809-1811.
- Shiu OY, Oetiker JH, Yip WK, Yang SF, 1998. The promoter of LE-ACS7, an early flooding-induced 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene of the tomato, is tagged by a Sol3 transposon, *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 95, 10334-10339.
- Sievers AF and True RH, (1912). Cited in Burg, 1962. *USDA Bureau Plant Industry Bulletin* 232, 1-38.
- Simmonds NW, 1966. *Bananas* (2nd edn.). London: Longman.
- Sisler EC and Yang SF (1984). Anti-ethylene effects of cis-2-butene and cyclic olefins. *Phytochemistry* 23, 2765-2768.
- Sisler EC, Dupille E and Serek M, 1996a. Effect of 1-methylcyclopropene and methylenecyclopropane on ethylene binding and ethylene action on cut carnations. *Plant Growth Regulation* 18, 79-86.
- Sisler EC, Serek M and Dupille E, 1996b. Comparison of cyclopropene, 1-methylcyclopropene, and 3,3-dimethylcyclopropene as ethylene antagonists in plants. *Plant Growth Regulation* 18, 169-174.
- Sisler EC and Serek M, 1997. Inhibitors of ethylene responses in plants at the receptor level: recent developments. *Physiologia Plantarum* 100, 577-582.

- Sisler EC and Serek M, 1999. Compounds controlling the ethylene receptors. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 40, 1-7.
- Sisler EC, Serek M, Dupille E, Goren R, 1999. Inhibition of ethylene response by 1-methylcyclopropene and 3-methylcyclopropene. *Plant Growth Regul.* 27, 105-111.
- Smith JJ, John P, 1993. Activation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase by bicarbonate carbon-dioxide. *Phytochemistry* 32, 1381-1386.
- Spanu P, Grosskopf DG, Felix G, Boller T, 1994. The apparent turnover of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in tomato cells is regulated by protein-phosphorylation and dephosphorylation. *Plant Physiology* 106, 529-535.
- Speirs J and Brady CJ, 1992. Modification of gene expression in ripening fruit. *Australian J. Plant Physiol.* 28, 519-532.
- Stock AM, Robinson VL, Goudreau PN, 2000. Two-component signal transduction, *Annual Review of Biochemistry* 69, 183-215.
- Tarun AS, Theologis A, 1998. Complementation analysis of mutants of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase reveals the enzyme is a dimer with shared active sites. *Journal of Biological Chemistry* 273, 12509-12514.
- Tatsuki M, Mori H, 2001. Phosphorylation of tomato 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase, LE-ACS2, at the C-terminal region, *Journal of Biological Chemistry* 276, 28051-28057.
- Thompson and Seymour, 1982. Comparative effects of acetylene and ethylene gas on initiation of banana ripening. *Ann. Appl. Biol.* 101, 407-410.
- Thompson AK and Burden OJ, 1995. Harvesting and fruit care. In: Gowen S, (Ed.) *Bananas and Plantains*, 403-433. London: Chapman & Hall.
- Toppan A, Roby D, Esquerre-Tugaye MT, 1982. Cell surfaces in plant-microorganism interactions. III. In vivo effect of ethylene on hydroxyproline-rice glycoprotein accumulation in the cell wall of diseased plants. *Plant Physiology* 70, 82-86.
- Turner DW, 1997. Bananas and plantains. In: Mitra SK, (Ed.) *Postharvest Physiology and Storage of Tropical and Subtropical Fruits*, 47-83. New York: CAB International.
- Turner DW and Rippon LE, 1973. Effect of bunch covers on fruit growth and maturity in bananas. *Tropical Agriculture* 50, 235-240.

- Ullah H, Ahmad S, Anwar R, Thompson AK, 2005. Effect of high humidity and water on storage life and quality of bananas. *Int. J. Agri. Biol.* Vol. 8, No. 6, 828-831.
- Veen H, 1987. Use of inhibitors of ethylene action. In, *Manipulation of Ethylene Responses in Horticulture*, Reid M. S. (Ed). *Acta Hort.* 201, 213-222.
- Vendrell M, 1969. Reversion of senescence: effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and indoleacetic acid on respiration, ethylene production, and ripening of banana fruit slices. *Australian Journal of Biological Sciences* 22, 601-610.
- Vendrell M and McGlasson WB, 1971. Inhibition of ethylene production in banana fruit tissue by ethylene treatment. *Australian Journal of Biological Sciences* 24, 885-895.
- Wang CY, Adams DO, 1982. Chilling-induced ethylene production in cucumbers (*Cucumis sativus* L.). *Plant Physiology* 69, 424-427.
- Watkins CB, Nock JF and Whitaker BD, 2000. Responses of early, mid and late season apple cultivars to postharvest application of 1-methylcyclopropene (1-MCP) under air and controlled atmosphere storage conditions. *Postharvest Biology and Technology* 19, 17-32.
- Wills RBH, Klieber A, David R, Siridhata M, 1990. Effect of brief pre-marketing holding of bananas in nitrogen on time to ripen. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 30, 579-581.
- Wills RBH, McGlasson WB, Graham D and Joyce DC, 1998. *Postharvest: An Introduction to the Physiology and Handling of Fruit, Vegetables and Ornamentals* (4th ed.). Sydney: UNSW Press Ltd.
- Wills RBH, Warton MA, Mussa DMDN and Chew LP, 2001. Ripening of climacteric fruits initiated at low ethylene levels. *Aust. J. Exp. Agric.* 41, 89-92.
- Wills RBH and Ku VVV, 2002. Use of 1-MCP to extend the time to ripen of green tomatoes and postharvest life of ripe tomatoes. *Postharvest Biology and Technology* 26, 85-90.
- Yang SF and Hoffman NE, 1984. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology* 35, 155-189.
- Zarembinski TI, Theologis A, 1994. Ethylene biosynthesis and action: a case of conservation. *Plant Molecular Biology* 26, 1579-1597.

Zhang ZH, Barlow JN, Baldwin JE, Schofield CJ, 1997. Metalcatalyzed oxidation and mutagenesis studies on the iron(II) binding site of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase. *Biochemistry* 36, 15999-16007.

APPENDICE

1-methylcyclopropene

SANCO/2005/1094 - rev. 6

23 September 2005

**COMMISSION WORKING DOCUMENT - DOES NOT NECESSARILY REPRESENT THE
VIEWS OF THE COMMISSION SERVICES**

Review report for the active substance **1-methylcyclopropene**

Finalised in the Standing Committee on the Food Chain and Animal Health at its meeting on 23 September 2005 in view of the inclusion of 1-methylcyclopropene in Annex I of Directive 91/414/EEC.

1. Procedure followed for the evaluation process

This review report has been established as a result of the evaluation of the new active substance 1-methylcyclopropene, made in the context of the work provided for in Articles 5 and 6 of Directive 91/414/EEC concerning the placing of plant protection products on the market, with a view to the possible inclusion of this substance in Annex I to the Directive.

In accordance with the provisions of Article 6(2) of Directive 91/414/EEC, the British authorities received on 28 February 2002 an application from Rohm and Haas France S.A.S., hereafter referred to as the applicant, for the inclusion of the active substance 1-methylcyclopropene in Annex I to the Directive. The British authorities indicated to the Commission on 17 May 2002 the results of a first examination of the completeness of the dossier, with regard to the data and information requirements provided for in Annex II and, for at least one plant protection product containing the active substance concerned, in Annex III to the Directive. Subsequently, and in accordance with the requirements of Article 6(2), a dossier on 1-methylcyclopropene was distributed to the Member States and the Commission.

The Commission referred the dossier to the Standing Committee on the Food Chain and Animal Health in the meeting of the working group 'legislation' thereof on 11 June 2002, during which the Member States confirmed the receipt of the dossier.

In accordance with the provisions of Article 6(3), which requires the confirmation at Community level that the dossier is to be considered as satisfying, in principle, the data and information requirements provided for in Annex II and, for at least one plant protection product containing the active substance concerned, in Annex III to the Directive and in accordance with the procedure laid down in Article 20 of the Directive, the Commission confirmed in its Decision 2003/35/EC1 of 10 January 2003 that these requirements were satisfied.

Following an agreement between the Commission and the European Food Safety Authority (EFSA), the latter organised a peer review for those active substances for which the decision on completeness has been published after June 2002.

Within the framework of that decision and with a view to the further organisation of the works related to the detailed examination of the dossier provided for in Article 6(2) and (4) of Directive 91/414/EEC, it was agreed between the Member States and the Commission that the United Kingdom would, as rapporteur Member State, carry out the detailed examination of the dossier and report the conclusions of its examination accompanied by any recommendations on the inclusion or non-inclusion and any conditions relating thereto, to the EFSA as soon as possible and at the latest within a period of one year.

In analogy with the provisions of Article 8(1) of Regulation (EC) No 451/2000² for existing active substances, the United Kingdom submitted on 30 May 2003 to the EFSA the report of their examination, hereafter referred to as the draft assessment report, including, as required, a recommendation concerning the possible inclusion of 1-methylcyclopropene in Annex I to the Directive.

In analogy with the provisions of Article 8 of Regulation (EC) No 451/2000 for existing active substances, the EFSA organised the consultation on the draft assessment report by all the Member States as well as by Rohm and Haas France S.A.S. being the main data submitters, on 14 August 2003 by making it available.

The EFSA organised an intensive consultation of technical experts from a certain number of Member States, to review the draft assessment report and the comments received thereon (peer review).

In analogy with the provisions of Article 8 (7) of Regulation 451/2000 for existing active substances the EFSA sent to the Commission its conclusion on the risk assessment (Ref D(2005) HK/nb/482)³. This conclusion refers to background document A (draft assessment report) and background document B (EFSA peer review report).

In analogy with the provisions of Article 8 (7) of Regulation (EC) No 451/2000 for existing active substances, the Commission referred on 15 July 2005 a draft review report to the Standing Committee on the Food Chain and Animal Health, for final examination. The draft review report was finalised in the meeting of the Standing Committee on 23 September 2005.

The present review report contains the conclusions of the final examination by the Standing Committee. Given the importance of the conclusion of the EFSA, and the comments and clarifications submitted after the conclusion of the EFSA (background document C), these documents are also considered to be part of this review report.

2. Purposes of this review report

This review report, including the background documents and appendices thereto, have been developed and finalised in support of the Directive **2006/19/EC**⁴ concerning the inclusion of 1-methylcyclopropene in Annex I to Directive 91/414/EEC, and to assist the Member States in decisions on individual plant protection products containing 1-methylcyclopropene they have to take in accordance with the provisions of that Directive, and in particular the provisions of article 4(1) and the uniform principles laid down in Annex VI.

This review report provides also for the evaluation required under Section A.2.(b) of the above mentioned uniform principles, as well as under several specific sections of part B of these principles. In these sections it is provided that Member States, in evaluating applications and granting authorisations, shall take into account the information concerning the active substance in Annex II of the directive, submitted for the purpose of inclusion of the active substance in Annex I, as well as the result of the evaluation of those data.

In analogy with the provisions of Article 8(9) of Regulation 451/2000 for existing active substances, Member States will keep available or make available this review report for consultation by any interested parties or will make it available to them on their specific request.

The information in this review report is, at least partly, based on information which is confidential and/or protected under the provisions of Directive 91/414/EEC. It is therefore recommended that this review report would not be accepted to support any registration outside the context of Directive 91/414/EEC, e.g. in third countries, for which the applicant has not demonstrated possession of regulatory access to the information on which this review report is based.

3. Overall conclusion in the context of Directive 91/414/EEC

The overall conclusion from the evaluation is that it may be expected that plant protection products containing 1-methylcyclopropene will fulfil the safety requirements laid down in Article 5(1)(a) and (b) of Directive 91/414/EEC. This conclusion is however subject to compliance with the particular requirements in sections 4, 5, 6 and 7 of this report, as well as to the implementation of the provisions of Article 4(1) and the uniform principles laid down in Annex VI of Directive 91/414/EEC, for each 1-methylcyclopropene containing plant protection product for which Member States will grant or review the authorisation.

Furthermore, these conclusions were reached within the framework of the following uses which were proposed and supported by the sole submitter and mentioned in the list of uses supported by available data (attached as Appendix II to this review report).

Extension of the use pattern beyond those described above will require an evaluation at Member State level in order to establish whether the proposed extensions of use can satisfy the requirements of Article 4(1) and of the uniform principles laid down in Annex VI of Directive 91/414/EEC.

The following reference values have been finalised as part of this re-evaluation:

ADI: 0.0009 mg/kg bw/day

ArfD: 0.07 mg/kg bw/day

AOEL: 0.009 mg/kg bw/day

With particular regard to residues, the review has established that the residues arising from the proposed uses, consequent on application consistent with good plant protection practice, have no harmful effects on human or animal health. The Theoretical Maximum Daily Intake (TMDI; excluding water and products of animal origin) for a 60 kg adult is $\leq 1\%$ of the Acceptable Daily Intake (ADI), based on the FAO/WHO European Diet (August 1994).

Additional intake from water and products of animal origin are not expected to give rise to intake problems.

Estimates of acute dietary exposure of adults and toddlers revealed that the Acute Reference Dose (ARfD) would not be exceeded (European diet $< 1\%$ for all considered population subgroups).

The review has identified several acceptable exposure scenarios for operators, workers and bystanders, which require however to be confirmed for each plant protection product in accordance with the relevant sections of the above mentioned uniform principles.

The review has also concluded that under the proposed and supported conditions of use there are no unacceptable effects on the environment, as provided for in Article 4 (1) (b) (iv) and (v) of Directive 91/414/EEC, provided that certain conditions are taken into account as detailed in section 6 of this report.

4. Identity and Physical/chemical properties

The main identity and the physical/chemical properties of 1-methylcyclopropene are given in Appendix I.

The active substance shall have a minimum purity of 960g/kg technical product.

As 1-methylcyclopropene is a gas, the manufacturing process produces it in an encapsulated form as a cyclodextrin complex containing 3.3% active substance. This was the representative formulation in the review.

The review has established that for the active substance notified by the main data submitter the manufacturing impurities 1-chloro-2-methylpropene and 3-chloro-2-methylpropene are of toxicological concern and each of them must not exceed 0.5 g/kg in the technical material. None of the other impurities considered are, on the basis of information currently available, of toxicological or environmental concern.

5. Endpoints and related information

In order to facilitate Member States, in granting or reviewing authorisations, to apply adequately the provisions of Article 4(1) of Directive 91/414/EEC and the uniform principles laid down in Annex VI of that Directive, the most important endpoints were identified during the re-evaluation process. These endpoints are listed in the conclusion of the EFSA, and at section 3 of this report.

6. Particular conditions to be taken into account on short term basis by Member States in relation to the granting of authorisations of plant protection products containing 1-methylcyclopropene

On the basis of the proposed and supported uses, no particular issues have been identified as requiring short term attention from the Member States.

7. List of studies to be generated

No further studies were identified which were considered at this stage, and under the current inclusion conditions necessary in relation to the inclusion of 1-methylcyclopropene in Annex I.

8. Information on studies with claimed data protection

For information of any interested parties, the rapporteur Member State will keep available a document which gives information about the studies for which the main data submitter has claimed data protection and which during the re-evaluation process were considered as essential with a view to annex I inclusion. This information is only given to facilitate the operation of the provisions of Article 13 of Directive 91/414/EEC in the Member States. It is based on the best information available but it does not prejudice any rights or obligations of Member States or operators with regard to its uses in the implementation of the provisions of Article 13 of the Directive 91/414/EEC and neither does it commit the Commission.

9. Updating of this review report

The information in this report may require to be updated from time to time in order to take account of technical and scientific developments as well as of the results of the examination of any information referred to the Commission in the framework of Articles 7, 10 or 11 of Directive 91/414/EEC. Any such adaptation will be finalised in the Standing Committee on the Food Chain and Animal Health, in connection with any amendment of the inclusion conditions for 1-methylcyclopropene in Annex I of the Directive.

APPENDIX I
Identity, physical and chemical properties
1-METHYLCYCLOPROPENE

Common name (ISO)	1-methylcyclopropene (an ISO Common Name will not be considered for this active substance)
Chemical name (IUPAC)	1-methylcyclopropene
Chemical name (CA)	1-methylcyclopropene
CIPAC No	Not allocated
CAS No	3100-04-7
EEC No	Not allocated
FAO SPECIFICATION	Not allocated
Minimum purity	960 g/kg
Molecular formula	C ₄ H ₆
Molecular mass	54

APPENDIX II
List of uses supported by available data
1-METHYLCYCLOPROPENE

Crop and/or situation (a)	Member State or Country	Product name	F G or I (b)	Pests or Group of pests controlled (c)	Formulation	Application		Application rate per treatment			PHI (days) (l)		Remarks: (m)		
Type (d-f)	Conc. of as (i)		method kind (f-h)		growth stage & season (j)	number min max (k)		interval between applications (min)	kg as/hl min max		water l/ha min max		kg as/ha min max		
Apples	Belgium France Germany Italy Spain The Netherlands United Kingdom <i>Austria</i> <i>Ireland</i> <i>Greece</i> <i>Portugal</i>	Smart-Fresh	I	N/A (Plant growth regulator)	Vapour releasing product (VP)	3.3%	Proprietary generator	After harvest (not later than 7 days after harvest)	One per stored batch of apples	N/A	N/A (see Remarks)	N/A (see Remarks)	518-1000	0	(See Nota Bene below) Critical GAP considered for risk assessment = 1000 ppb as in the air = 2.24 mg as / m3 = 0.009 mg as./ kg apples

¹ OJ L11, 16. 1.2003, p.52.

² OJ L 55, 29.2.2000, p. 25. Regulation as last amended by Regulation (EC) No 1490/2002 (OJ L 224, 21.8.2002, p. 23).

³ EFSA Scientific Report (2005) 30, 1-46

⁴ OJ No L 44, 15.02.2006, p. 15-17

