

IDENTIFICATION OF VARIABLES CORRELATED WITH CHILLING INJURY IN PITAHAYA (*Hylocereus undatus* Haworth)

IDENTIFICACIÓN DE VARIABLES CORRELACIONADAS CON EL DAÑO POR FRÍO EN PITAHAYA (*Hylocereus undatus* Haworth)

Beatriz Quiroz-González¹, J. Joel E. Corrales-García^{1*}, M. T. Beryl Colinas-León², M. Carmen Ybarra-Moncada¹

¹Agroindustrial. ²Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. 56230. Chapingo, Estado de México. (joelcorrales@hotmail.com.).

ABSTRACT

The pitahaya (*Hylocereus undatus*) is highly perishable and susceptible to chilling injury (CI). The objective of this study was to measure a set of biochemical, physiological, physical-chemical and physical variables in gradually chilling injured pitahaya fruits and assess the degree of correlation of each one with this damage. Pitahayas were stored at 2 or 7±1 °C and 90±6 % RH for up to 30 d, and then held at 22±4 °C and 60±8 % RH for up to 7 d. A visual evaluation of CI was conducted using a five point hedonic scale after storage and transferred to 22 °C. Titratable acidity (TA), total soluble solids, TSS/TA ratio, superoxide dismutase activity (SOD), glutathione activity (GR), pyruvate decarboxylase (PDC), alcohol dehydrogenase activity (ADH), weight loss, ethanol content, electrolyte leakage (EL), translucency, hue, chroma, and firmness were analysed in fruit samples. Of which, TA, SOD, ethanol content, EL, and translucency were positively correlated with CI ($r_s=0.61, 0.65, 0.53, 0.83, \text{ and } 0.68$).

Key words: Stress, pitahaya, postharvest, refrigerated storage, chilling injury.

INTRODUCTION

The pitahaya (*Hylocereus undatus*) is a round oval shaped fruit, 10 to 12 cm in diameter, with numerous small, chewable, black seeds dispersed throughout the soft white pulp. The peel varies from red to purplish red and is covered by triangular shaped bracts oriented helically. The pulp is sweet, sometimes acidic, with a delicate aroma. It is considered one of the most beautiful fruits in the world because of its attractive and unique external

RESUMEN

La pitahaya (*Hylocereus undatus*) es altamente perecedera y susceptible a daños por frío (DF). El objetivo del presente trabajo fue medir un conjunto de variables bioquímicas, fisiológicas, físico-químicas y físicas en frutos de pitahaya gradualmente dañadas por frío y medir el grado de correlación que tiene cada una con este tipo de daño. Las pitahayas se almacenaron hasta 30 d a 2 ó 7±1 °C HR de 90±6 %, y después se mantuvieron hasta 7 d a 22±4 °C y HR 60±8 %. La evaluación visual de DF se realizó mediante una escala hedónica de cinco puntos después del almacenamiento refrigerado y la transferencia de los frutos a 22±4 °C. En muestras de los frutos se determinó acidez titulable (AT), sólidos solubles totales (SST), relación SST/AT, actividad de superóxido dismutasa (SOD), glutatión reductasa (GR), piruvato descarboxilasa (PDC), alcohol deshidrogenasa (ADH), pérdida de peso, contenido de liberación, fuga de electrolitos (LE), translucidez, ángulo de tono, índice de saturación de color y firmeza. De estas variables AT, SOD, contenido de etanol, FE y translucidez tuvieron correlación positiva con el DF ($r_s=0.61, 0.65, 0.53, 0.83 \text{ y } 0.68$).

Palabras clave: Estrés, pitahaya, postcosecha, almacenamiento refrigerado, daños por frío.

INTRODUCCIÓN

La pitahaya (*Hylocereus undatus*) es un fruto globoso, con forma elipsoidal a ovalada, 10 a 12 cm de diámetro, pulpa blanca y numerosas semillas pequeñas, masticables, color negro y dispersas en la pulpa; la cáscara varía del rojo a rojo púrpura y está cubierta por brácteas salientes de forma triangular, dispuestas más o menos helicoidalmente. La pulpa es dulce, a veces un poco ácida, de aroma suave y fragancia delicada. Por su atractiva apariencia

* Author for correspondence ♦ Autor responsable.

Received: October, 2015. Approved: September, 2016.

Published as ARTICLE in *Agrociencia* 51: 153-172. 2017.

appearance (Centurión *et al.*, 1999). This product has considerable economic importance, prices have reached up to 5 USD kg⁻¹ in the international market (Viet Thanh, 2014; Osuna-Enciso *et al.*, 2016), but is highly perishable. According to Osuna *et al.* (2011) the storage life of pitahaya fruit is 6 to 10 d when stored between 20 and 26 °C and up to 20 d at 5 °C (Freitas and Mitcham, 2013). Therefore, it is necessary to evaluate practices to optimize postharvest quality (Nerd *et al.*, 1999).

Cold storage is the main method used to slow the deterioration of fresh produce and to maintain nutritional value (Cantín *et al.*, 2010). Nevertheless, cold storage of products of species from tropical and subtropical origin can cause physiological alterations known as chilling injury (CI), negatively affecting product quality and rendering the fruit unmarketable due to tissue deterioration (Wismer, 2003; Soleimani and Bodbodak, 2014). According to Morris (1982), among the symptoms of CI is the alternation of metabolic activity, which causes an increase in anaerobic respiratory intermediaries and other metabolic alterations, resulting in the development of undesirable flavors. Kader (2007) point out that common signs of CI include changes in internal and external color (discoloration, darkening), sunken areas on the exocarp, watery areas, nonuniform or inability to ripen, development of off flavors, and conditions that favor accelerated growth of fungi and other decay-causing organisms. This disorder was studied especially in economically important products such as citrus, avocado and mango (Ramaswamy, 2015). However, research of this physiological disorder in other less important fruit is minor. In pitahaya, studies report assessments CI from subjective variables (whose distribution is discrete) using hedonic scales and tests of nonparametric statistics. There are techniques that were applied in various fruits with some success to reduce or mitigate CI, such as intermittent warming (Wang, 2010; Soleimani and Bodbodak, 2014) or controlled or modified atmosphere (Thompson, 2010; Wang, 2010; Bill *et al.*, 2014). In our research we identify the variables that reflect accurately and reliably the degree of damage. The selection criteria to conform the set of measured variables was to choose those that were related with CI in other studies (Mittler, 2002; Corrales-García and Canché-Canché, 2008; Balois-Morales *et al.*, 2013). Other variables were selected because they can explain

externa se considera uno de los frutos más bellos del mundo (Centurión *et al.*, 1999). Este producto tiene gran importancia económica y sus precios en el mercado internacional llegan a 5 USD kg⁻¹ (Viet y Thanh, 2014; Osuna-Enciso *et al.*, 2016), pero es altamente perecedero. Según Osuna *et al.* (2011) la vida de anaquel de la pitahaya es de 6 a 10 d si se almacena entre 20 y 26 °C y hasta 20 d a 5 °C (Freitas and Mitcham, 2013), por lo que es necesario evaluar prácticas para optimizar su calidad poscosecha (Nerd *et al.*, 1999).

El almacenamiento en frío es el principal método para frenar el deterioro de los productos y mantener el valor nutricional (Cantín *et al.*, 2010). Sin embargo, el almacenamiento refrigerado de especies vegetales de origen tropical o subtropical causan alteraciones fisiológicas conocidas como daños por frío (DF), que afectan negativamente la calidad de estos frutos, e impide su comercialización, debido al deterioro de tejidos (Soleimani y Bodbodak, 2014; Wismer, 2003). Según Morris (1982) entre los síntomas de DF está la alteración de la actividad metabólica, que aumenta los intermediarios respiratorios anaeróbicos y otras alteraciones que causan la aparición de sabores desagradables. Kader (2002) menciona que los signos comunes de DF incluyen cambios de color interno y externo (decoloración, oscurecimiento), hundimientos en la cáscara, áreas acuosas, maduración heterogénea o incapacidad para adquirirla, desarrollo de sabores extraños y condiciones que favorecen la incidencia acelerada de hongos organismos que causan y pudriciones. Este desorden se estudió en especial en productos con importancia económica, como cítricos, aguacate y mango (Ramaswamy, 2015). Sin embargo, la investigación de este desorden fisiológico en otros frutos menos importantes es menor. En la pitahaya, los estudios reportan mediciones de DF a partir de variables subjetivas (cuya distribución es discreta) que usan escalas hedónicas y pruebas de estadística no paramétrica. Hay ciertas técnicas aplicadas en varios frutos con algún éxito para reducir o mitigar DF, como el calentamiento intermitente (Wang, 2010; Soleimani y Bodbodak, 2014) o la atmósfera modificada o controlada (Thompson, 2010; Wang, 2010; Bill *et al.*, 2014). En nuestro estudio se identificaron variables que reflejan de manera muy precisa y confiable el grado del daño. El criterio de selección para conformar el conjunto de variables fue escoger aquellas relacionadas al DF en otros estudios (Mittler, 2002; Corrales-García y Canché-Canché,

this disorder because of their own nature. Within the set of all variables proposed, if any of them is significantly correlated with CI, when increasing the severity of the damage, there will be proportionally greater change in that variable.

MATERIALS AND METHODS

Harvest and fruit storage

Pitahaya fruits were harvested at commercial maturity in Santa Clara Huiziltepec, Puebla (Mexico). Fruits were transported to the laboratory at ambient temperature (22 ± 4 °C), where they were disinfected for 6 min with running water (pH: 7.72) that was ozonated ($690 \text{ mL ozone min}^{-1}$) with an ozone bubbler (FAGON®, model biozo³n 2000). Fruits to be refrigerated (in sanitized plastic crates, with expanded polypropylene and vent openings) were maintained 24 h at 10 ± 2 °C with 90 ± 6 % RH to remove field heat. Afterwards, fruits were stored at 2 or 7 ± 1 °C with 90 ± 6 % RH for 15 or 30 d. After cold storage, fruits were transferred to ambient temperature (22 ± 4 °C with 60 ± 8 % RH) for 7 or 3 d for the fruit stored during 15 or 30 d, respectively. Non-refrigerated fruits (control) were evaluated initially and after 15 d of storage at ambient temperature (22 ± 4 °C). Therefore, eight treatments and two controls were evaluated, and each of them had 4 replications, whose experimental unit was one fruit.

Chilling injury (CI) as reference variable

This evaluation consisted of visual inspection for symptoms of CI in refrigerated and nonrefrigerated fruit. Chilling injury was evaluated on a five points hedonic scale, where 0 = fruit with no injury (0 % injury), 1 = presence of very small and disperse sunken spots on less than 25 % of the fruit surface, 2 = presence of small sunken spots in more than 50 % of the fruit, 3 = presence of sunken spots that coalesced, forming beige-colored areas of considerable size on more than 75 % of the fruit surface, and 4 = presence of large coalesced areas of dark spots on more than 75 % of the fruit surface. Fruits with a score of 2 would be considered unmarketable.

Variables

Biochemical variables

Soluble solids were determined on the fruit juice pulp with a digital refractometer (ATAGO®, pocket) with a 0 to 32 % scale at 20 °C, results were reported as % TSS. TA was determined on 10 g of pulp blended in 50 mL distilled water, and titrated with 0.01 N NaOH, the results were reported as g of malic acid

(2008; Balois-Morales *et al.*, 2013). Otras variables se escogieron porque pueden explicar este desorden debido a su propia naturaleza. Si dentro del conjunto de todas las variables propuestas alguna de ellas se correlaciona significativamente con el DF, entonces, al aumentar la severidad del daño habrá un cambio proporcionalmente mayor en tal variable.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cosecha y almacenamiento de frutos

Frutos de pitahaya en madurez comercial se cosecharon en Santa Clara Huiziltepec, Puebla (México). Los frutos se transportaron al laboratorio a temperatura ambiente (22 ± 4 °C), donde se desinfectaron con agua corriente (pH: 7.72) ozonificada 6 min ($690 \text{ mL ozono min}^{-1}$), con un burbujeador de ozono (FAGON®, modelo biozo³n 2000). Los frutos a refrigerar se colocaron en cajas de plástico con polipropileno expandido (desinfectado) con perforaciones y se almacenaron 24 h a 10 ± 2 °C (90 ± 6 % HR), para eliminar el calor de campo. Después los frutos se almacenaron a 2 o 7 ± 1 °C (90 ± 6 % HR) por 15 o 30 d. Después de la frigoconservación, los frutos se transfirieron a temperatura ambiente (22 ± 4 °C y 60 ± 8 % HR) por 8 o 3 d para los frutos refrigerados durante 15 ó 30 d, respectivamente. Los frutos no refrigerados (testigo) se evaluaron al inicio y al final de su almacenamiento por 15 d a temperatura ambiente (22 ± 4 °C). Entonces se evaluaron ocho tratamientos y dos testigos, cada uno tuvo cuatro repeticiones y la unidad experimental fue un fruto.

Daño por frío (DF) como variable de referencia

Esta evaluación consistió en la inspección visual de los síntomas de DF, en los frutos refrigerados y en los no refrigerados. El DF se evaluó con una escala hedónica de cinco puntos, donde 0 = fruto sin daño (0 % daño), 1 = presencia de hundimientos muy pequeños y dispersos en menos del 25 % de la superficie del fruto, 2 = presencia de hundimientos evidentes en más del 50 % del fruto, 3 = presencia de hundimientos unidos entre ellos, formando áreas de tamaño considerable, de color *beige* y en más del 75 % de la superficie del fruto y, 4 = presencia de hundimientos de grandes áreas de color marrón en más del 75 % de la superficie del fruto. Los frutos con registro de 2 serían considerados no comercializables.

Variables

Variables bioquímicas

El contenido de sólidos solubles totales se determinó en el jugo del fruto, con un refractómetro electrónico (ATAGO®,

100 g⁻¹ tissue. The TSS/TA ratio was calculated. SOD activity was determined by the method of Balois-Morales *et al.* (2008), glutathione reductase (GR) by the method of Hodges *et al.* (1997) and the activity of pyruvate decarboxylase (PDC) and alcohol dehydrogenase (ADH) was determined by methods used by Botondi *et al.* (2012). SOD was extracted from 0.5 g of frozen pulp homogenized (IKA LABORTECHNIK, T-25, USA) with 5 mL of extraction solution (phosphate buffer, 1M pH 7.8). The mixture was centrifuged in a Sorvall (RC-5B) at 4 °C for 30 min at 22617 G. Absorbance of the supernatant was determined at 560 nm in a digital spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Genesys 10-S, USA). To 3 mL of phosphate buffer (J. T. Baker) 0.1 M pH 7.8 [with 0.01 mM EDTA, 3.66 mL L-methionine, 2.44 mL NBT and 1.83 mL Triton X-100 (Sigma)] in a final volume of 66 mL, 0.5 mL of supernatant and 0.03 mL of riboflavine (Sigma) were added, and the mixture was illuminated at 21±2 °C for 7 min under a 20 watts Grolux fluorescent lamp and the absorbance was determined. Enzyme activity was calculated as international units per g fresh weight (U g⁻¹). Each unit of SOD is equal to the quantity of supernatant that photoinhibits 50 % formation of formazan from nitro blue tetrazolium. For GR activity, 0.2 g of frozen pulp was homogenized with 5 mL of extraction solution [phosphate buffer, 1M pH 7.8, polyvinylpyrrolidone 1 % (Sigma®)]. The mixture was centrifuged at 4 °C for 30 min at 22617 G. For activity determination, 0.730 mL phosphate buffer (100 mM pH 7.8), 0.1 mL 100 mM glutathione oxide, 0.1 mL 15 mM EDTA, 0.02 mL 10 mM NADPH (Sigma) and 0.05 mL supernatant enzyme extract were placed in a 1 mL quartz cell. Absorbance was measured at 340 nm and GR activity is reported as mM NADPH oxidized g⁻¹ tissue. For analysis of PDC activity, oxidation of NADH was measured as the decrease in absorbance at 340 nm on the spectrophotometer. The opposite reduction reaction was measured for ADH. To obtain enzyme extract, pulp (5) was homogenized with KH₂PO₄ buffer (10 mL) pH 7.5 containing 2 mM thiamine pyrophosphate (TPP), 2 mM MgCl₂ (J.T. Baker) and 1 mM 2-mercaptoethanol. The homogenate was centrifuged at 4 °C for 20 min at 22617 G and the supernatant was used to measure PDC and ADH activities. PDC was measured by coupling the decarboxylation of pyruvate with the oxidation of NADH by ADH. The assay consisted of 0.4 mL of the 100 mM mixture pH 7.5, 0.1 mL 10 mM TPP, 0.1 mL 10 mM MgCl₂, 0.1 mL 2.6 mM NADH, 0.1 mL ADH (with 2 U mL⁻¹), 0.1 mL enzyme extract and finally addition of 0.1 mL 200 mM sodium pyruvate (J.T. Baker). ADH activity was determined by the reduction of NAD⁺ at 340 nm, with 0.680 mL buffer with KOH-100 mM glycine (pH 9.0), 0.07 mL 11.4 mM NAD⁺, 0.150 mL 2M ethanol (Sigma) and 0.1 mL of enzyme extract. Enzyme activities were reported as

pocket), con una escala de 0 a 32 %, a 20 °C. Los resultados se reportaron como % de SST. La AT se cuantificó en 10 g de pulpa macerada en 50 mL de agua destilada y titulada con 0.01 N de NaOH, los resultados fueron reportados como g de ácido málico 100 g⁻¹ de tejido. La relación SST/AT se calculó. La actividad de la enzima SOD se determinó de acuerdo con el método aplicado por Balois-Morales *et al.* (2008), la actividad de la glutatión reductasa (GR) con el método propuesto por Hodges *et al.* (1997) y la actividad de la enzima piruvato descarboxilasa (PDC) y alcohol deshidrogenasa (ADH) se determinó con el método empleado por Botondi *et al.* (2012). SOD se extrajo a partir de 0.5 g de pulpa congelada y homogenizada (IKA LABORTECHNIK, T-25, EUA), con 5 mL de solución extractora (amortiguadora de fosfatos 1 M pH 7.8), la mezcla se centrifugó con una centrífuga marca Sorvall (RC-5B) durante 30 min a 22617 G a 4 °C. La absorbancia del sobrenadante se determinó a 560 nm en un espectrofotómetro digital (Thermo Fisher Scientific, Genesys 10-S, USA). A 3 mL de solución amortiguadora de fosfatos (J.T. Baker, México) 0.1 M pH 7.8 [con EDTA 0.01 mM, 3.66 mL de L-metionina, 2.44 mL de NBT y 1.83 mL de Triton X-100 (Sigma®)] en un volumen final de 66 mL se adicionó 0.5 mL del sobrenadante y 0.03 mL de riboflavina (Sigma), esta mezcla de reacción se iluminó 7 min a 21±2 °C con una lámpara con luz fluorescente de 20 watts Grolux y se determinó la absorbancia. La actividad enzimática se calculó en unidades internacionales por gramo de peso fresco (U g⁻¹). Cada unidad de SOD es igual a la cantidad del sobrenadante que fotoinhibe la formación de 50 % de formazán a partir de azul de nitro tetrazolium. Para la actividad de la GR se extrajeron 0.2 g de pulpa congelada con 5 mL de solución extractora [solución amortiguadora de fosfato, 1M pH 7.8 con polivinilpirrolidona al 1 % (Sigma)]. La mezcla se centrifugó 30 min a 22617 G a 4 °C. Para determinar la actividad de la GR, 0.2 g de pulpa congelada fueron homogenizados con 5 mL de solución extractora [solución amortiguadora de fosfato 1M pH 7.8, con 1 % polivinilpirrolidona al 1 % (Sigma®)]. La mezcla fue centrifugada a 4 °C por 30 min a 22 617 g. Para determinar la actividad, 0.730 mL de solución amortiguadora de fosfato (100 mM pH 7.8), 0.1 mL de glutatión oxidado 100 mM, 0.1 mL de EDTA 15 mM, 0.02 mL 10 mM NADPH (Sigma) y 0.05 mL del sobrenadante del extracto enzimático se colocaron en una celda de cuarzo de 1 mL. La absorbancia se midió a 340 nm y la actividad de GR se reportó como mM de NADPH oxidado g⁻¹ de tejido. Para el análisis de la actividad de la PDC, la oxidación del NADH fue evaluada como el decremento de la absorbancia a 340 nm con un espectrofotómetro. La reacción opuesta (reducción) se midió para la ADH. Para obtener el extracto enzimático se homogeneizaron 5 g de pulpa con 10 mL de KH₂PO₄ (amortiguador) pH 7.5 con la adición de 2 mM de tiamina pirofosfato (TPP), 2 mM de MgCl₂ (J.T. Baker) y 1 mM

μM PDC or ADH mg^{-1} protein, and they determined by the method Bradford (1976), using bovine albumen (Sigma) for the standard curve; 100 μL of extract in 5 mL of Bradford solution [100 mg of coomassie (Sigma), 50 mL 95 % ethanol (J.T. Baker), and 100 mL of phosphoric acid (J.T. Baker), this solution was diluted to a final volume of 1 L of distilled water], and after 12 min this solution were measured in a digital spectrophotometer at 595 nm.

Physiological variables

Weight loss (the cumulative loss) per fruit was determined (four fruits per treatment) from the initial and final weights on an electronic scale with a precisión of 0.1 g. Ethanol was determined by gas chromatography in headspace samples as described by Davis and Chase (1969). A sample of 5 g pulp was placed in a 25 mL glass vial and this was immediately sealed, frozen with liquid N_2 and stored at -20°C until analysis. For quantification, the frozen samples were incubated in a water bath at 60°C for 10 min. The sample was stirred for 1 min (inside the sealed tube) and a 1 mL gaseous aliquot of the headspace was taken with a syringe and injected into a GC (Varian Star 3400, USA) SS column packed with Poropak N, 2 m x 3 mm external and 2 mm internal diameter, equipped with TCD (thermal conductivity detector) and FID (flame ionization detector). Column, injector, auxiliary and detector temperatures were 160, 170, 170 and 170°C , respectively, using He as carrier gas. Calibration curve was prepared with comercial standards (J.T. Baker) and results were reported as $\text{mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$.

Physical-chemical variable

Electrolyte leakage (EL). This variable was measured with the method of Perez *et al.* (2004) with modifications. Four circular pieces of exocarp 2 cm in diameter and approximately 1 mm thick were obtained with a copper cork borer and stainless steel razor, placed in 30 mL distilled water for 24 h in an 80 mL test tube, and electrical conductivity (EC, μS) was measured with a conductivity meter (OAKTON, CON 400 series, Singapore). The tubes were placed in a water bath at 80°C for 30 min, cooled at 21°C and EC was measured again. The EC data were used to calculate EL according to the following equation:

$$EL(\%) = \frac{(EC_2 - EC_1)}{EC_2} \times 100; \text{ where } EC_1 \text{ is initial conductivity and } EC_2 \text{ is the total conductivity.}$$

EL was reported as % and it reflects damage membrane (Sharom *et al.*, 1994).

de 2-mercaptoetanol; el homogeneizado se centrifugó a 22617 G durante 20 min a 4°C y el sobrenadante se usó como extracto enzimático para medir las actividades de PDC y ADH. La PDC fue medida por acoplamiento de la descarboxilación del piruvato con la oxidación de NADH por la ADH. La prueba se realizó con 0.4 mL de la mezcla pH 7.5 100 mM, 0.1 mL de TPP 10 mM, 0.1 mL de MgCl_2 10 mM, 0.1 mL de NADH 2.6 mM, 0.1 mL de ADH (con 2 U mL^{-1}), 0.1 mL del extracto enzimático y la subsecuente adición de 0.1 mL de piruvato de sodio (J.T. Baker) 200 mM. La actividad de ADH se evaluó por la reducción del NAD^+ a 340 nm, con 0.680 mL de solución amortiguadora con KOH-glicina 100 mM (pH 9.0), 0.07 mL de NAD^+ 11.4 mM, 0.150 mL de etanol 2 M (Sigma) y 0.1 mL del extracto enzimático. Las actividades enzimáticas se reportaron como μM de PDC o ADH mg^{-1} proteína, se determinaron por el método de Bradford (1976), usando albúmina de bovino (Sigma) para la curva estándar; 100 μL de extracto en 5 mL de solución de Bradford [100 mg de coomassie (Sigma), 50 mL 95 % etanol (J.T. Baker), y 100 mL de ácido fosfórico (J.T. Baker), esta solución se diluyó a un volumen final de 1 L de agua destilada], y después de 12 min estas soluciones se midieron en un espectrofotómetro a 595 nm.

Variables fisiológicas

La pérdida de peso (la pérdida acumulada) por fruto se determinó (cuatro frutos por tratamiento) con los pesos inicial y final, en una balanza electrónica con una precisión de 0.1 g. El etanol se midió mediante cromatografía de gases en muestras del espacio de cabeza, como lo describe Davis y Chase (1969). La muestra de pulpa (5 g) se puso en un vial de vidrio de 25 mL, se selló de inmediato, se congeló con N_2 líquido, y se mantuvo congelado a -20°C hasta su análisis. Para la cuantificación, las muestras congeladas se incubaron 10 min en baño maría a 60°C , se homogeneizaron por 1 min (dentro del tubo sellado) y se tomó una muestra gaseosa del espacio de cabeza de cada vial con una jeringa (1 mL) y se inyectó a un cromatógrafo de gases Varian Star 3400® (USA), columna SS empacada Poropak N, 2 m x 3 mm de diámetro externo y 2 mm de diámetro interno, equipado con un detector TCD (detector de conductividad térmica) y FID (detector de ionización de flama). Las temperaturas del cromatógrafo fueron 160, 170, 170 y 170°C en columna, inyector, auxiliar y detector, respectivamente; el gas de arrastre fue He. Una curva de calibración se preparó con estándares comerciales (J. T. Baker) y los resultados se reportaron en $\text{mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$.

Variable fisicoquímica

Liberación de electrolitos (LE). Esta variable se midió con el método de Perez *et al.* (2004) con modificaciones. Cuatro

Physical variables

Translucency is a change from the characteristic white color of the pitahaya pulp to a watery or translucent appearance upon cutting a transverse section of the fruit at the equator. Translucency was expressed as the percent of pulp that had a translucent appearance. Hue and chroma were evaluated on the exocarp, according to the methodology of McGuire (1992) using a colorimeter (Hunter Lab, modelo MiniScan™ XE Plus No. 45/O-L, series 5348, USA). The equations used to calculate hue and chroma were the following:

$$\text{Hue} = \text{Arc tan} \left(\frac{b^*}{a^*} \right), \quad \text{Chroma} = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}}.$$

Exocarp firmness was determined on a texture analyzer (Stable Micro Systems, TA-XT2I, UK) with a 5 kg load cell and, a puncture test was conducted at 20 °C with 2 mm diameter probe (Batch No. 3426) on the fruit surface (at the equatorial section) at a rate of 1 mm·s⁻¹ and to a depth of 5 mm. The results represent the force (N) necessary to penetrate the exocarp.

Statistical analysis

The experimental design was a completely randomized, results were analyzed by ANOVA with mean comparison by Tukey's test at ($p \leq 0.05$) and Spearman correlation between CI and the biochemical, physiological, physico-chemical and physical variables using SAS version 9.1 (SAS, 2006) for Windows. Treatments were: 1) fruits stored 15 d in refrigeration at 2±1 °C; 2) fruits stored 15 d in refrigeration at 2±1 °C and then 7 d at 22±4 °C; 3) fruits stored 15 d in refrigeration at 7±1 °C; 4) fruits stored 15 d in refrigeration at 7±1 °C and then 7 d at 22±4 °C; 5) fruits stored 30 d in refrigeration at 2±1 °C; 6) fruits stored 30 d in refrigeration at 2±1 °C and then 3 d at 22±4 °C; 7) fruits stored 30 d in refrigeration at 7±1 °C; 8) fruits stored 30 d in refrigeration at 7±1 °C and then 3 d at 22±4 °C; as controls, 9) recently harvested fruits; and 10) fruits stored 15 d at 22±4 °C.

RESULTS AND DISCUSSION

Chilling injury

No CI symptoms were observed on any of the refrigerated fruit after 15 d of storage, but after holding at ambient temperature (22±4 °C) for 7 d, the fruits previously stored at 2±1 °C showed CI symptoms significantly more severe than those stored at 7±1 °C (Figure 1). After the longer storage period (30 d), fruits at the higher storage temperature

porciones circulares o rodajas se obtuvieron de cáscara de 2 cm de diámetro y aproximadamente 1 mm de grosor con un sacabocados de cobre y una navaja de acero inoxidable, se mantuvieron en 30 mL de agua destilada por 24 h en un tubo de ensayo de 80 mL, y la conductividad eléctrica (CE, μS) se midió con un conductivímetro (OAKTON, CON 400 series, Singapur). Los tubos se colocaron en baño maría a 80 °C por 30 min, se enfriaron hasta 21 °C y la CE se midió de nuevo. Los datos de CE se usaron para calcular la FE con la siguiente ecuación:

$$\text{FE}(\%) = \frac{(CE_2 - CE_1)}{CE_2} \times 100; \text{ donde } CE_1: \text{ conductividad inicial y } CE_2: \text{ conductividad total.}$$

La FE se reportó como % y refleja el daño en membrana (Sharom *et al.*, 1994).

Variables físicas

La translucidez es un cambio del color blanco característico de la pulpa de la pitahaya a una apariencia acuosa o translúcida en la pulpa al cortar el fruto transversalmente por la parte ecuatorial. La translucidez se expresó como porcentaje de pulpa que tuvo apariencia translúcida. El matiz (hue) e intensidad (chroma) se evaluaron en el exocarpio, de acuerdo con la metodología de McGuire (1992) usando un colorímetro (Hunter Lab, modelo MiniScan™ XE Plus No. 45/O-L, EUA, serie 5348). Las ecuaciones usadas para calcular hue y chroma fueron las siguientes:

$$\text{Hue} = \text{Arc tan} \left(\frac{b^*}{a^*} \right), \quad \text{Chroma} = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}}$$

La firmeza del exocarpio se determinó en un texturómetro (Stable Micro Systems, TA-XT2I, Reino Unido) con una celda de carga de 5 kg, y una medición de punción se aplicó a 20 °C (con una sonda de aguja Batch No. 3426 de 2 mm de diámetro) en la superficie del fruto (de la sección ecuatorial) a una tasa de 1 mm·s⁻¹ y a una profundidad de 5 mm. Los resultados representan la fuerza (N) necesaria para penetrar el exocarpio.

Análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente al azar, los resultados se analizaron con ANDEVA, las medias se compararon con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) y una correlación de Spearman entre el DF y las variables bioquímicas, fisiológicas, fisicoquímicas y físicas, usando SAS 9.1 (SAS/STAT™ 2002) para Windows. Los tratamientos fueron: 1) frutos almacenados 15 d en refrigeración a 2±1 °C; 2) frutos almacenados 15 d en refrigeración a 2±1 °C y luego 7 d a 22±4 °C; 3) frutos almacenados 15 d en refrigeración a 7±1 °C; 4) frutos almacenados 15 d en

still showed no visual CI symptoms, while those refrigerated at 2 ± 1 °C showed maximum CI; this damage did not increase after transfer at ambiente temperature. Fruits previously stored at 7 ± 1 °C had an increase in CI severity, but the injury was still much less than that observed on the fruits stored at 2 °C.

While the fruits were maintained in refrigerated storage during 15 d, the development of those deteriorative processes was avoided. However, after transfer 7 d to ambiente conditions, these deteriorative processes were clearly activated and CI symptoms were readily observed. These results are similar to those of Balois-Morales *et al.* (2013) and Freitas and Mitcham (2013) in which the symptoms of CI were not expressed until after the transfer of the pitahaya fruits from the chilling temperature to a warmer temperature (-20 °C).

Deteriorative processes were also impeded in fruits stored 15 and 30 d at 7 ± 1 °C, but the severity of CI symptoms after transfer to ambiente temperature was significantly higher for the longer storage period. The increased period of storage at this moderately low temperature increased the severity of CI. The fruits stored at 2 ± 1 °C for 30 d already had severe

refrigeración a 7 ± 1 °C y luego 7 d a 22 ± 4 °C; 5) frutos almacenados 30 d en refrigeración a 2 ± 1 °C; 6) frutos almacenados 30 d en refrigeración a 2 ± 1 °C y luego 3 d a 22 ± 4 °C; 7) frutos almacenados 30 d en refrigeración a 7 ± 1 °C; 8) frutos almacenados 30 d en refrigeración a 7 ± 1 °C y luego 3 d a 22 ± 4 °C; como testigos, 9) frutos recién cosechados, y 10) frutos almacenados 15 d a 22 ± 4 °C.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Daños por frío

En ninguno de los frutos refrigerados se observaron síntomas de DF al término de (15 d) de almacenamiento, pero después de 7 d de permanecer a temperatura ambiente (22 ± 4 °C) los frutos previamente almacenados a 2 °C presentaron un DF significativamente más severo que los almacenados a 7 ± 1 °C (Figura 1). Al término del periodo largo de almacenamiento (30 d) los frutos a la temperatura mayor aún no mostraban síntomas visibles de DF, en cambio, los refrigerados a 2 ± 1 °C mostraban el máximo DF; este daño no aumentó después de transferir a la temperatura ambiente. Los frutos previamente refrigerados a 7 ± 1 °C tuvieron un aumento en la severidad de DF, pero el daño fue significativamente menor al observado en los frutos almacenados a 2 °C.

Mientras los frutos permanecieron refrigerados durante 15 d, el desarrollo de estos procesos de deterioro se evitaron. Sin embargo, después de transferencia 7 d a condiciones ambientales, estos procesos de deterioro y se manifestaron los síntomas de DF. Estos resultados son similares a los de García *et al.* (2005) y Balois-Morales *et al.* (2013), en los cuales los síntomas de DF no se expresan hasta después de transferir los frutos de pitahaya de la temperatura muy fría a una más calurosa (-20 °C).

Los procesos de deterioro también se detuvieron en los frutos 15 y 30 d a 7 ± 1 °C, pero la severidad de los síntomas de DF después de transferirse a temperatura ambiente fue significativamente mayor para el periodo de refrigeración más largo. El aumento del periodo de almacenamiento a esta temperatura moderadamente baja, aumentó la severidad del DF. Los frutos almacenados a 2 ± 1 °C por 30 d ya tenían síntomas severos de DF esta condición y, por lo tanto, no hubo más desarrollo de síntomas después de transferir la temperatura ambiente.

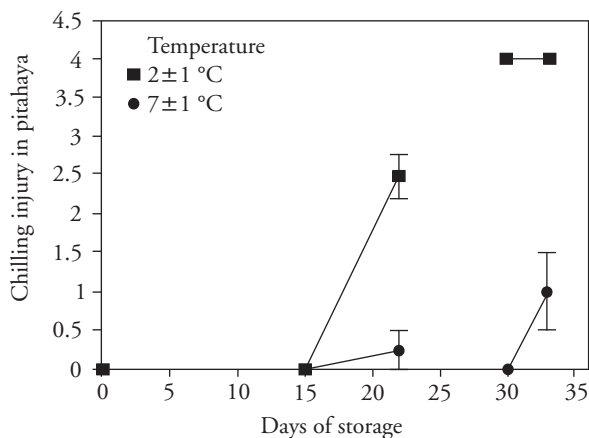


Figure 1. Chilling injury (\pm standard deviation) in pitahaya fruits (*Hylocereus undatus* H.) stored 15 d in refrigeration and then 7 d at room temperature or 30 d in refrigeration and then during 3 d at room temperature.

Figura 1. Daño por frío (\pm desviación estándar) en frutos de pitahaya (*Hylocereus undatus* H.) almacenados 15 d en refrigeración y después 7 d a temperatura ambiente, o 30 d en refrigeración y después 3 d a temperatura ambiente.

symptoms in this condition and, therefore, there was no further symptom development after transfer to ambient temperature.

These results showed that with more stressful conditions (lower temperature or longer exposure to low temperature), the more severe the CI symptoms. Rodríguez-Rodríguez *et al.* (2005) report increases in CI of *Selenicereus megalanthus* as storage time increased at 8 °C (until day 23); similarly, Corrales-García and Canché-Canché (2008) point out that CI was more severe in *Hylocereus undatus* fruit stored at 4 °C for 21 d than in fruits stored for 5, 10 or 16 d.

Titrateable acidity (TA)

As expected in stored unrefrigerated fruits, there was a significant decrease in the acidity of pitahaya, consistent with observations of Osuna *et al.* (2011), Magaña *et al.* (2013). According to Žnidarčič and Požrl (2006) and Álvarez-Herrera *et al.* (2009) this decrease in acidity is due to utilization of organic acids in respiratory metabolism or conversion to sugars. Refrigerated storage for 15 d did not change this metabolism (Figure 2), but the decrease was less than that observed in unrefrigerated fruit, suggesting that refrigeration reduced loss of acidity by reducing metabolism (Wismer, 2003). Additionally, it was found that upon transfer of fruits to ambient temperature, acidity was increased.

Although TA decreased after 15 d, there was an important increase in acidity in fruits stored under refrigeration for 30 d. The increase in TA was far greater in fruits stored at $2 \pm 1^\circ\text{C}$ than $7 \pm 1^\circ\text{C}$. When fruits were transferred to ambient conditions, acidity decreased in both groups.

During refrigerated storage and associated with reduced respiratory metabolism, the pitahaya accumulated organic acids. Then, with the transfer to ambient conditions, there was a further accumulation of organic acids in some cases (15 d at $7 \pm 1^\circ\text{C}$), perhaps due to inhibition of malate dehydrogenase enzyme (in Krebs cycle), which is susceptible to removal from mitochondria of chilled fruits, as sweet potato (Kozukue and Ogata, 1972; Famiani *et al.*, 2015).

Based on the results presented here and that reported by Wang (1994), an increase in TA during refrigerated storage could be interpreted as a clear symptom of CI. A similar result was reported by

Estos resultados mostraron que a mayor estrés (menor temperatura o mayor exposición a temperatura baja), severidad mayor del DF. Rodríguez-Rodríguez *et al.* (2005) reportan aumentos de DF en *Selenicereus megalanthus* al aumentar el periodo de almacenamiento a 8 °C, (hasta el día 23); asimismo, Corrales-García y Canché-Canché (2008) señalan que en *Hylocereus undatus* el DF fue más severo en los frutos almacenados a 4 °C durante 21 d que en los almacenados 5, 10 o 16 d.

Acidez titulable

Como se esperaba, en los frutos no refrigerados hubo un descenso significativo en la acidez de las pitahayas, lo que coincide con lo observado por Osuna *et al.* (2011) y Magaña *et al.* (2013). Según Žnidarčič y Požrl (2006) y Álvarez *et al.* (2009), este descenso de acidez se debe a que los ácidos orgánicos se usan en el metabolismo respiratorio o convertidos en azúcares. La refrigeración durante 15 d no cambio este metabolismo (Figura 2), pero la disminución fue menor que la observada en los frutos no refrigerados; esto sugiere que la refrigeración redujo la pérdida de acidez al disminuir el metabolismo (Wismer, 2003). Además se encontró que al transferir los frutos a temperatura ambiente la acidez aumentó.

Aunque TA se redujo después de 15 d, hubo un aumento importante en refrigeración por 30 d. El aumento en TA fue mayor en los frutos almacenados a $2 \pm 1^\circ\text{C}$ que a 7°C . Cuando los frutos se transfirieron a condiciones ambientales la acidez descendió en ambos grupos.

Durante la frigoconservación y asociado con el metabolismo respiratorio reducido, la pitahaya acumuló ácidos orgánicos. Luego, con la transferencia a condiciones ambientales hubo acumulación de ácidos orgánicos en algunos casos (15 d a $7 \pm 1^\circ\text{C}$), debido talvez a la inhibición de la enzima malato deshidrogenasa (en el ciclo de Krebs), la cual es susceptible de remoción desde la mitocondria de frutos enfriados, como en camote (Kozukue y Ogata, 1972; Famiani *et al.*, 2015).

Con base en los resultados aquí presentados y lo reportado por Wang (1994), el aumento de la AT durante la refrigeración podría interpretarse como un síntoma claro de DF. Thorne y Efiuvwevwere (1988) reportaron un efecto similar en frutos de *Lycopersicon esculentum* Mill, en los que AT se aumentó con

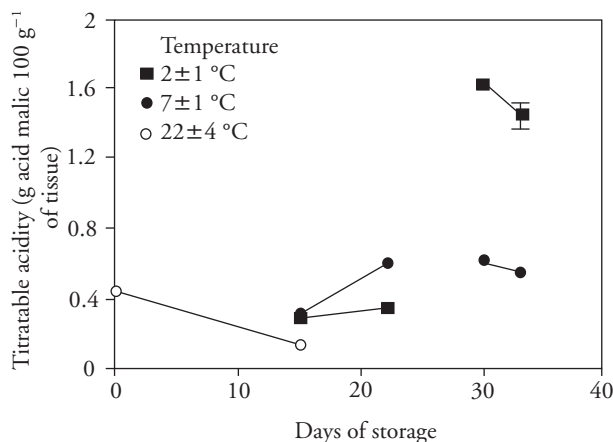


Figure 2. Titratable acidity (\pm standard deviation) in fruits of pitahaya (*Hylocereus undatus* H.) stored 15 d at room temperature (o) or stored 15 d in refrigeration and then 7 d at room temperature; 30 d in refrigeration and then 3 d at room temperature.

Figure 2. Acidez titulable (\pm desviación estándar) en frutos de pitahaya (*Hylocereus undatus* H.) almacenados 15 d a temperatura ambiente, 15 d en refrigeración y después 7 d a temperatura ambiente, ó 30 d en refrigeración y después 3 d a temperatura ambiente.

Thorne and Efiuvwevwere (1988), who found an increase in TA in fruits of *Lycopersicon esculentum* Mill during storage at chilling temperatures (lower than 13 °C). Navarro-López *et al.* (2012) found that TA of tomatoes increased more in fruits stored 30 d at 4 °C than at 10 °C. In our study, a positive correlation ($r_s=0.61$) was obtained between TA and CI for pitahaya, and this variable can be a useful indicator to measure CI in pitahaya (Table 1).

Total soluble solids

Higher values of TSS (above the initials ones) were obtained at the lower temperature (2 °C, Table 2). This may be related to hydrolysis of mucilage of the fruit, which causes the soluble solids increase, like it occurs in cactus pear (Lakshminarayana *et al.*, 1979). Similar increases (20 % in fruits stored 15 d at 8 °C) one reported by Rodriguez- Rodriguez *et al.* (2005) in fruits of *Selenicereus megalanthus*. In addition, fruits of *Hylocereus undatus* stored at 4 °C showed higher

el almacenamiento a temperaturas bajas (menores a 13 °C), en tomate refrigerados 30 d. Navarro-López *et al.* (2012) encontraron que los almacenados a 4 °C incrementaron su AT más que los almacenados a 10 °C. En nuestro estudio se obtuvo una correlación positiva ($r_s=0.61$) TA y el DF en pitahaya, por lo que esta variable puede ser un indicador útil para medir el DF en pitahaya (Cuadro 1).

Sólidos solubles totales

Valores mayores de SST (superiores a los iniciales) se obtuvieron con la temperatura menor (2 °C, Cuadro 2). Esto podría relacionarse a la hidrólisis del mucílago del fruto, lo que causa aumento de los sólidos solubles, como ocurre en tuna (Lakshminarayana *et al.*, 1979). Incrementos similares (20 % en frutos almacenados 15 d a 8 °C) están reportados por Rodriguez- Rodriguez *et al.* (2005) en frutos de *Selenicereus megalanthus*. Además, frutos de *Hylocereus undatus* almacenados a 4 °C mostraron valores mayores de SST que en frutos almacenados a 13 °C (Centurión *et al.*, 1999); estos autores mencionan una posible relación de los SST con los DF. Sin embargo, en nuestro estudio no se encontró correlación significativa entre estas variables.

Relación SST/AT

Las pitahayas testigo (antes del almacenamiento en frío) mostraron un valor promedio de la relación SST/AT de 33.49 y después de 15 d de almacenamiento, este valor aumentó significativamente, independiente de la temperatura. Sin embargo, cuando el período de almacenamiento aumentó (30 d), hubo una fuerte disminución de los valores de esta variable (menor a los valores de referencia), lo que se consideró un efecto negativo, dado que la relación SST/AT se propuso como indicador de buen sabor y de la calidad de la pitahaya, en particular cuando esta variable tiene un valor de 40 (Nerd *et al.* 1999, To *et al.*, 2002). En nuestro estudio es notable que al aumentar el período de almacenamiento (30 d), particular a 2 °C, se obtuvo una menor relación SST/AT, lo cual sugiere que estas condiciones estaban relacionadas con la severidad del DF ($r_s=0.61$).

Table 1. Correlation between chilling injury (CI) symptoms and response variables (biochemical, physiological, physical-chemical, and physical) in pitahaya fruits held in refrigerated (15 or 30 d at 2 or 7±1 °C, with 90±6 % RH) and unrefrigerated (0 or 15 d at 22±4 °C, with 60±8 % RH) storage.**Cuadro 1. Correlación entre síntomas del daño por frío (DF) y variables de respuesta (bioquímicas, fisiológicas, fisicoquímicas y físicas) en frutos de pitahaya frigoconservados (15 o 30 d a 2 o 7±1 °C, con 90±6 % HR) y no refrigerados (0 o 15 d a 22±4 °C, con 60±8 % HR).**

Variables	r_s (CI- X_i) [†]	p-value
Biochemical		
Titrateable acidity (TA)	0.61485	<0.0001
Total soluble solids (TSS)	0.31305	0.0492
TSS/TA ratio	-0.61218	<0.0001
Superoxide dismutase (SOD)	0.64972	<0.0001
Glutathione reductase (GR)	0.22840	0.1563
Pyruvate decarboxylase (PDC)	-0.08127	0.6181
Alcohol dehydrogenase (ADH)	-0.28545	0.0742
Physiological		
Weight loss	0.32068	0.0436
Ethanol content	0.53208	0.0004
Physical chemical		
Electrolyte leakage (EL)	0.83086	<0.0001
Physical		
Translucency	0.67765	<0.0001
Hue	0.65255	<0.0001
Chroma	-0.54096	0.0003
Firmness	0.30355	0.0569

[†] r_s : Spearman correlation; CI: chilling injury; X_i : variable response ♦ [†] r_s : Correlación Spearman; CI: daño por frío, and X_i : variable de respuesta.

values of TSS than those in fruits stored at 13 °C (Centurion *et al.*, 1999); these authors point out the possible relationship of the SST with CI. However, in our study no significant correlation was found between these variables.

TSS/TA ratio

The control pitahaya fruits (before cold storage) showed an average value of TSS / TA ratio of 33.49 and after 15 d of storage this value was significantly increased, independent of temperature. However, when the storage period was increased (30 d) a large decline in the values of this variable was observed (below the reference values), which it was considered as a negative effect, since the TSS/TA ratio was proposed as an indicator of good taste and quality of pitahaya, particularly when this variable has a value of 40 (Nerd *et al.* 1999; To *et al.*, 2002). In our study it is remarkable that as the storage period increased (30d), particularly at 2 °C, lower TSS/TA ratio was obtained, which suggest that these conditions were related with CI ($r_s = 0.61$).

Actividad de la superóxido dismutasa

La actividad de SOD aumentó en los frutos refrigerados y no refrigerados durante 15 d (Figura 3), aunque, el aumento de la actividad en los frutos refrigerados no fue tan marcado. Hubo un aumento marcado en la actividad de SOD cuando los frutos se transfirieron de refrigerados a temperatura ambiente.

Con el almacenamiento prolongado a 30 d a 2±1 °C hubo un aumento importante de la actividad de esta enzima, mientras que la actividad fue más estable en los frutos almacenados a 7±1 °C. Después del periodo de ambientación la actividad de esta enzima aumentó en los frutos almacenados en ambas temperaturas, con mayor actividad en frutos transferidos desde 2±1 °C una a temperatura ambiente. La actividad de esta enzima pudo ser estimulada por la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS) como radicales superóxido, peróxido de hidrógeno, radicales hidroxilo y simple oxígeno (Mittler, 2002). Esto se observó en frutos de origen tropical y subtropical durante el almacenamiento en frío (Aquino-Bolaños y Mercado-Silva, 2004).

Table 2. Response of total soluble solid (TSS), TSS/TA ratio; enzyme activity glutathione reductase (GR), piruvate decarboxylase (PDC), and alcohol deshydrogenase (ADH); weightloss, hue, chroma and firmness in pitahaya fruits stored during 15 and 30 d (at 2 and 7 °C) or stored at these temperatures plus a period of 7 and 3, d respectively, at room temperature (22 °C). Two controls were included (initial and 15 d at 22 °C).

Cuadro 2. Cuadro 2. Respuesta de sólidos solubles totales (SST), relación SST/AT; actividad enzimática de glutatión reductasa (GR), piruvato descarboxilasa (PDC), y alcohol deshidrogenasa (ADH); pérdida de peso, hue chroma y firmeza en frutos de pitahaya almacenados durante 15 y 30 d (a 2 y 7 °C) o almacenados a estas temperaturas más un periodo de 7 y 3 d, respectivamente, a temperatura ambiente (22 °C). Dos testigos se incluyeron (inicial y 15 d a 22 °C).

Variable	Initial	15 d			15 + 7 d		30 d		30 + 3 d	
		2 °C	7 °C	22 °C	2 °C	7 °C	2 °C	7 °C	2 °C	7 °C
TSS (%)	14.85f	19.33a	18.45ab	16.45de	18.6ab	14.85f	18.93ab	17.15cd	18.08bc	15.43ef
TSS/TA ratio	33.49e	67.65b	59.92c	117.52a	53.99d	24.55f	11.53g	27.89f	12.59g	28.53ef
GR (mM of oxidized NADPH cm ⁻¹ g ⁻¹ of tissue)	2.07bc	1.80cde	1.98bc	1.12f	1.44def	1.42ef	1.84cd	2.06bc	2.32b	2.95a
PDC (μM cm ⁻¹ mg ⁻¹ protein)	1.03cd	1.18ab	1.11abcd	1.12abc	1.2a	1.08bcd	1.06cd	0.88e	1.00d	0.87e
ADH (μM cm ⁻¹ mg ⁻¹ protein)	0.43abc	0.48a	0.38cd	0.44ab	0.48a	0.45a	0.39bcd	0.37d	0.34d	0.37d
Weight loss (%)	0g	1.33f	2.7e	9.45a	6.68c	6.38cd	3.43e	5.73d	7.77b	9.05a
Hue	17.16bcd	14.94cd	12.80def	12.30def	21.57b	9.40ef	17.98bc	8.10f	29.10a	13.95cde
Chroma	17.07abc	16.78bcd	17.20ab	17.60ab	15.80e	17.36ab	15.98de	17.95a	16.25cde	17.91a
Firmness (N)	1.87ef	1.92ef	1.68f	2.06de	1.90ef	2.97ab	2.05de	2.38cd	3.09a	2.70bc

Each value is the average of four replicates; treatments with different letters in a row are statistically different ($p \leq 0.05$) ♦ Cada valor es promedio de cuatro repeticiones y tratamientos con letras diferentes en un renglón son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$).

Superoxide dismutase activity

The SOD activity increased over 15 d in the unrefrigerated as well as the refrigerated fruits (Figure 3), although the increase in activity in the latter fruits was not as notable. There was a further marked increase in SOD activity when fruits were transferred from refrigeration to ambient conditions.

With prolonged storage for 30 d at 2 ± 1 °C, there was an important increase in SOD activity, whereas activity was stable in fruits stored at 7 ± 1 °C. After the transfer period, there was increased SOD activity in fruits stored at both temperatures, with greater activity in fruits transferred from 2 ± 1 °C to ambient temperature. The activity of this enzyme could be stimulated by the presence of toxic reactive oxygen species (ROS), such as superoxide radicals, hydrogen peroxide, hydroxyl radicals and simple oxygen (Mittler, 2002). This was observed in other products of tropical and subtropical origin stored in refrigeration (Aquino-Bolaños and Mercado-Silva, 2004).

An increase in SOD activity was reported in rambutan stored at 10 °C (Shao *et al.*, 2013) and in

El incremento de la actividad de la SOD se reportó en rambután almacenado a 10 °C (Shao *et al.*, 2013) y en pitahayas almacenadas 21 d a 3 °C y luego mantenidas 4 d a 22 °C (Balois-Morales *et al.*, 2007). Con estos antecedentes y la correlación positiva entre DF y actividad de SOD ($r_s=0.65$), se puede proponer la alta actividad de la SOD como un índice de estrés por frío y que es una variable útil para medir DF.

Glutatión reductasa

Aunque la actividad de GR está relacionada con la tolerancia al DF, por la eliminación de ROS (Soleimani y Bodbodak, 2014), los resultados de nuestro estudio muestran que la actividad de GR no tiene correlación significativa con DF (Cuadro 2), ya que los frutos (30 d a 7 °C más 3 d a 22 ± 4 °C) con la mayor actividad de la GR no fueron los más dañados, y aquellos con mayor daño mantuvieron una actividad de GR similar a la de frutos recién cosechados. Estos resultados son contrarios a los reportados en mangos (Wang *et al.*, 2008) y en duraznos (Wang *et al.*, 2006), debido porque estos mostraron baja actividad de la GR en condiciones de DF.

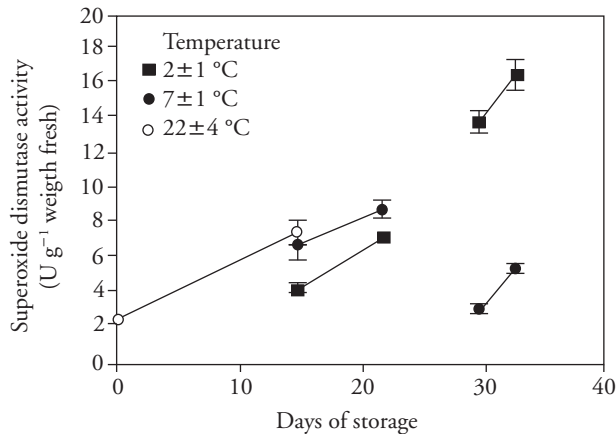


Figure 3. Superoxide dismutase enzyme activity (\pm standard deviation) in fruits of pitahaya (*Hylocereus undatus* H.) stored during 15 d at room temperature (o) or stored during 15 d in refrigeration and then during 7 d at room temperature; 30 d in refrigeration and then 3 d at room temperature.

Figura 3. Actividad enzimática de superóxido dismutasa (\pm desviación estándar) en frutos de pitahaya (*Hylocereus undatus* H.) almacenados durante 15 d a temperatura ambiente, 15 d en refrigeración y después durante 7 d a temperatura ambiente; 30 d en refrigeración y después durante 3 d a temperatura ambiente.

pitahayas stored for 21 d at 3 °C and then held 4 d at 22 °C (Balois-Morales *et al.*, 2007). With these antecedents and the positive correlation between CI and SOD activity ($r_s=0.65$), high SOD activity can be proposed as a chilling stress index and is a variable useful to measure CI.

Glutathione reductase

Although GR activity is related to the CI tolerance, by eliminating of ROS (Soleimani and Bodbodak, 2014), the results of our research show that GR activity is not significantly correlated with CI (Table 2), since the fruits (30 d of storage at 7 °C plus 3 d at 22 ± 4 °C) with the highest GR activity were not the most damaged, and those with highest damage maintained an GR activity similar to that in freshly harvested fruits. These results are contrary to those reported in mangoes (Wang *et al.*, 2008) and peaches (Wang *et al.*, 2006), because these have showed low activity of the GR under conditions of CI.

Piruvato descarboxilasa

La actividad enzimática de la PDC no mostró correlación significativa con DF, ya que la fruta con mayor DF mostró actividad similar (baja) a la inicial (Cuadro 2). Sin embargo, hubo un aumento después de 15 d de almacenamiento refrigerado, incluso a temperatura ambiente. De hecho, el aumento de la actividad PDC es el comportamiento natural en la maduración de la naranja (Bruemmer y Roe, 1985) y fresa (Moyano *et al.*, 2004). Estos resultados permiten concluir que aunque el PDC promueve la vía de fermentación en respuesta al estrés biótico y abiótico (Tadega *et al.*, 1999), no es una variable consistente para medir el DF en pitahaya.

Alcohol deshidrogenasa

Dado que la ADH es responsable de la reducción de acetaldehído a etanol (Botondi *et al.*, 2012) también se esperaba una correlación de la actividad de ADH con DF; sin embargo, esta correlación no se observó. Es notable que el período de almacenamiento mostró mayor efecto, ya que los frutos almacenados un período más prolongado (30 d) mostraron la menor actividad (Cuadro 2). Aparentemente, en los primeros días de almacenamiento (después de 15 d) el sistema antioxidante estuvo activo; sin embargo, cuando el almacenamiento en frío se prolongó (después de 30 días), esto pudo haber detenido la actividad de la ADH (Botondi *et al.*, 2012). De acuerdo con lo anterior, la inducción de la expresión génica para ADH principalmente después del inicio de la maduración en tomates y en bayas de uva, es un regulador potencial de la producción de etanol en respuesta a una señal del proceso de maduración (Or *et al.*, 2000).

Pérdida de peso

La pérdida de peso aumento cuando el período de almacenamiento se prolongó y cuando los frutos refrigerados se transfirieron a temperatura ambiente ésta fue aún mayor (Cuadro 2). Esto se debió más a un mayor déficit de presión de vapor a temperatura ambiente que en refrigeración (Muy *et al.*, 2004), y no por DF. Estos resultados son consistentes con los reportados por Magaña *et al.* (2004), quienes encontraron que la pérdida de peso fue aumentando con el

Pyruvate decarboxylase

The PDC enzyme activity showed no significant correlation with CI, because the fruit with the most CI showed similar activity (low) to the initial (Table 2). However, an increase after 15 d of refrigerated storage was observed, even at room temperature. In fact, the increase in PDC activity is natural behavior in ripening of orange (Bruemmer and Roe, 1985) and strawberry (Moyano *et al.*, 2004). These results allow to conclude that although the PDC promotes fermentation pathway in response to biotic and abiotic stress (Tadege *et al.*, 1999), not with a consistent variable to measure the DF in the pitahaya.

Alcohol deshydrogenase

Since ADH is the responsible of reduction of acetaldehyde to ethanol (Botondi *et al.*, 2012), it was also expected a correlation of ADH activity with CI; however, this correlation was not observed. It was notable that the storage period showed a greater effect, since the fruits stored a period longer than (30 d) showed lower activity (Table 2). Apparently, in the early days of storage (after 15 d) the antioxidant system was active; however, when the cold storage was prolonged (after 30 d), this could have stopped the ADH activity (Botondi *et al.*, 2012). In accordance with the above, the induction of ADH gene expression mainly after the onset of ripening in both tomatoes and grape berries is a potential regulator of ethanol production in response to a ripening-related cue (Or *et al.*, 2000).

Weight loss

Weight loss increased when the storage period was prolonged, and when the fruits were transferred to room temperature the weight loss was even greater (Table 2). This was caused by the higher vapor pressure deficit in room temperature than in cold storage (Muy *et al.*, 2004), and not by the DF. These results are consistent with those reported by Magaña *et al.* (2004), who found that weight loss was increasing with time cold storage (up to 24 % weight loss at 8 °C) and with time of the storage period post-cooling (3 and 6 d at 26 ± 2 °C: 9.43 and 13.8 %, respectively).

tiempo de almacenamiento refrigerado (hasta 24 % de pérdida de peso a 8 °C) y con el tiempo del período de ambientación posterior al periodo de refrigeración después (3 y 6 d a 26 ± 2 °C: 9.43 y 13.8 %, respectivamente).

Concentración de etanol

Durante el almacenamiento refrigerado los contenidos de etanol no aumentaron con respecto a los frutos no refrigerados (Figura 4). Tampoco aumentó cuando los frutos se transfirieron a temperatura ambiente después de 15 d de refrigeración. Sin embargo, al transferir después de 30 d de refrigeración hubo un gran aumento del contenido de etanol en los frutos en las dos temperaturas.

Los cambios en las concentraciones de etanol indican que las bajas temperaturas no fueron estresantes durante un período corto, pero si lo fueron para el período prolongado de 30 d.

Cuando los frutos se transfirieron de una temperatura baja a una mayor, posiblemente se activó el metabolismo anaerobio (reactivación de PDC y ADH), porque el contenido de etanol fue significativamente mayor en los frutos a 3 d después de ser transferidos, especialmente en los frutos previamente refrigerados a 2 ± 1 °C. Esto sugiere que la mayor producción de este metabolito se debió a la combinación del mayor periodo de refrigeración y la baja temperatura. García *et al.* (2005) en *Cucumis melo*, Corrales-García y Canché-Canché (2008) en *Hylocereus undatus* y Tietel *et al.* (2010) en *Citrus reticulata* también reportan aumentos en el contenido de etanol al prolongar el almacenamiento a bajas temperaturas.

El aumento de etanol sólo se produjo bajo condiciones ambientales después de 30 d de refrigeración, lo cual indica que la producción se inhibió bajo refrigeración y se favoreció a temperatura ambiente. Esto fue reportado en pitahaya (Corrales-García y Canché-Canché, 2008).

El etanol y el acetaldehído se estudio como productos del metabolismo anaerobio, ya que se producen cuando los frutos se mantienen en condiciones de bajo oxígeno (Kennedy *et al.*, 1992; Geigenberger, 2003). Sin embargo, Kimmerer y Koslowski (1982) determinaron que la producción de acetaldehído y etanol no sólo ocurre en respuesta a la restricción de oxígeno, sino que puede ser activada cuando

Ethanol concentration

During refrigerated storage, ethanol concentrations did not increase relative to those of nonrefrigerated fruits (Figure 4). There was no increase either when fruits were transferred to room temperature after 15 d refrigeration. However, transfer after 30 d of storage resulted in large increases in ethanol concentrations in fruits at both storage temperatures. Changes in ethanol concentrations indicate that the low temperatures were not stressful for a short period, but they were stressful for the prolonged 30 d period.

When fruits were transferred from low to warmer temperature, anaerobic metabolism was possibly activated (reactivation of PDC and ADH), because the ethanol concentrations were significantly higher 3 d after transfer, especially in the fruits previously stored at 2 ± 1 °C. This suggests that higher production of this metabolite was due to the combination of the longer storage period and the low temperature. Increased ethanol concentrations in fruits stored for long periods at low temperatures were reported by García *et al.* (2005) en *Cucumis melo*, Corrales-

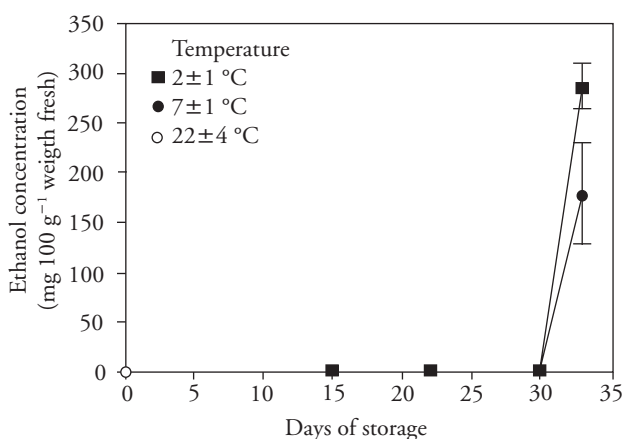


Figure 4. Ethanol concentration (\pm standard deviation) in fruits of pitahaya (*Hylocereus undatus* H.) stored 15 d at room temperature (o) or stored 15 d in refrigeration and then 7 d at room temperature; 30 d in refrigeration and then 3 d at room temperature.

Figura 4. Concentración de etanol (\pm desviación estándar) en frutos de pitahaya (*Hylocereus undatus* H.) almacenados 15 d a temperatura ambiente, 15 d en refrigeración y después 7 d a temperatura ambiente; 30 d en refrigeración y después 3 d a temperatura ambiente.

los frutos se someten a otros tipos de estrés. La acumulación de estos metabolitos puede ser un posible indicador de DF (Forney y Jordan, 1996).

Con base en estos reportes y en la evidencia de la producción de etanol después de almacenamiento de pitahaya a bajas temperaturas, es probable que estos frutos sufrieran estrés y en consecuencia se dañaron por frío. La correlación de Spearman también sugiere una correlación positiva ($r_s=0.53$) entre DF y la producción de etanol.

Liberación de electrolitos

El aumento de LE fue significativo de FE en la cáscara de los frutos no refrigerados (Figura 5), y este cambio probablemente corresponda a un proceso natural y evidencia de la senescencia en los frutos. Los cambios en la LE implican un desorden fisiológico irreversible. Esta variable fue estable en los frutos refrigerados evitando el inicio aparente de la senescencia. Sin embargo, al transferir los frutos a 22 ± 4 °C la LE aumentó, lo cual sugiere que el cambio de una temperatura menor (2 o 7 ± 1 °C) a una mayor (22 ± 4 °C) causó la manifestación del daño a las membranas.

La LE en el exocarpo de los frutos almacenados a cualquiera de las bajas temperaturas por 15 d permaneció similar a la de los frutos recién cortados. Sin embargo, con el almacenamiento por 30 d a 2 ± 1 °C hubo un aumento significativo de ésta, mientras que la LE de los almacenados a 7 ± 1 °C permaneció baja, lo cual sugiere que ocurrió un daño en los frutos almacenados a la temperatura menor. En el periodo de ambientación, cuando la refrigeración fue a 2 ± 1 °C la LE se mantuvo elevada pero ya no aumentó, mientras que los frutos refrigerados a 7 ± 1 °C mostraron un aumento moderado. Esto sugiere que los frutos almacenados a 7 ± 1 °C no mostraron mucho estrés ya que la LE tuvo un nivel semejante al mostrado por los frutos no refrigerados, mientras que los frutos almacenados a 2 ± 1 °C no pudieron mantener la integridad de su membrana a esa baja temperatura.

La LE es muy importante porque cuando es suficientemente baja se asegura estabilidad metabólica; sin embargo, un aumento de la LE puede ser nocivo porque favorece el aumento de compuestos en el citoplasma que pueden inhibir las funciones celulares, probablemente como factores desacoplantes de la

García and Canché-Canché (2008) in *H. undatus* and Tietel *et al.* (2010) in *Citrus reticulata*.

Since the increase in ethanol occurred only under ambient conditions after 30 d of storage, it indicates that production was inhibited under refrigeration and favored at ambient temperature. This was reported to occur in pitahaya (Corrales-García and Canché-Canché, 2008).

Ethanol and acetaldehyde are studied as products of anaerobic metabolism, since they are produced when fruits are held under low oxygen conditions (Kennedy *et al.*, 1992; Geigenberger, 2003). Nevertheless, Kimmerer y Koslowski (1982) determined that the production of acetaldehyde and ethanol occurred not only in response to restricted oxygen availability, but also can be activated when fruits are subjected to other types of stress. Forney and Jordan (1996) proposed that the accumulation of these metabolites could be a possible indicator of CI.

Based on these reports and the evidence of ethanol production after prolonged storage of pitahaya at low temperatures, the fruits likely suffered stress and consequently were damaged by the cold. Spearman correlation also suggests a positive correlation ($r_s=0.53$) between CI and ethanol production in the pitahaya.

Electrolyte leakage

There was a significant increase in EL in exocarp in nonrefrigerated fruits (Figure 5), and this change likely corresponds to a natural process and evidence of senescence in the fruits. These changes in EL imply an irreversible physiological disorder. This variable was stable in the refrigerated fruits, avoiding the apparent onset of senescence. Nevertheless, upon transfer to 22 ± 4 °C, EL increased, suggesting that the change from low temperatures (2 or 7 ± 1 °C) to ambient conditions caused the manifestation of this membrane damage.

The EL of the exocarp of fruits stored at either low temperature, for 15 d remained similar to that of the recently harvested fruits. However with storage for 30 d, there was a significant increase in the fruits stored at 2 ± 1 °C, whereas EL of those stored at 7 ± 1 °C remained low; this suggests that damage occurred in the fruits stored at the lower temperature. During the transfer period of fruits previously stored

fosforilación oxidativa. Un aumento de la LE es indeseable y ese incremento se puede interpretar como indicador de DF, porque en nuestro estudio tuvo alta correlación ($r_s=0.83$) con DF.

Los resultados de nuestro estudio son consistentes con los de Pérez *et al.* (2004) y Dea *et al.* (2010), quienes reportan que el aumento de la FE, conductividad eléctrica o fugas de electrolitos fue un indicador de daño a la membrana (Sharom *et al.*, 1994). Esto posiblemente ocurrió a causa del DF, ya que la LE, conductividad eléctrica o fuga de electrolitos también aumentan significativamente en algunos frutos como la granada (Ramezani *et al.*, 2010) y el mango (Dea *et al.*, 2010) almacenados a temperaturas bajas o dañados. El aumento de la conductividad eléctrica en el exocarpo de la pitahaya puede ser una variable fiable para determinar si un fruto está dañado por frío y en cual grado.

Translucidez

La translucidez aumentó en los frutos almacenados 15 d a temperatura ambiente (22 ± 4 °C). Simi-

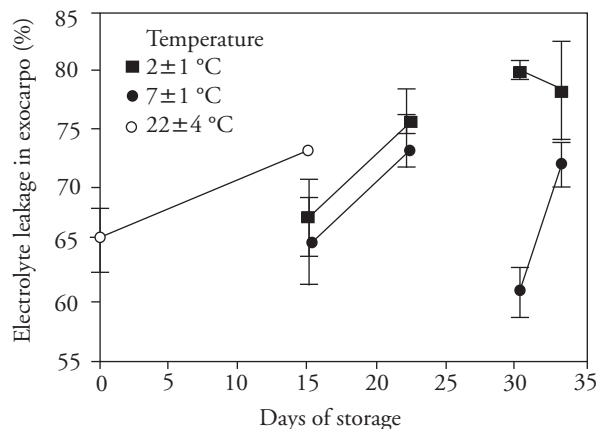


Figure 5. Electrolyte leakage (\pm standard deviation) in exocarp of fruits of pitahaya (*Hylocereus undatus* H.) stored 15 d at room temperature or stored 15 d in refrigeration and then 7 d at room temperature; 30 d in refrigeration and then 3 d at room temperature.

Figure 5. Liberación exocarpo de electrolitos (\pm desviación estándar) en frutos de pitahaya (*Hylocereus undatus* H.) almacenados 15 d a temperatura ambiente, 15 d en refrigeración y después 7 d a temperatura ambiente; 30 d en refrigeración y después 3 d a temperatura ambiente.

at 2 ± 1 °C, EL remained elevated but with no further increase, whereas there was a moderate increase in EL of fruits stored at 7 ± 1 °C. This suggests that the fruits stored at 7 ± 1 °C did not suffer much stress since EL was at a level similar to that shown by the nonrefrigerated fruit, whereas the fruit stored at 2 ± 1 °C were unable to maintain membrane integrity at that low temperature.

Electrolyte leakage is very important because when it is sufficiently low metabolic stability is assured. However, an increase in EL can be damaging because it favors an increase in constituents in the cytoplasm that can inhibit cellular functions, likely as uncoupling factors in oxidative phosphorylation. An increase in EL is undesirable and such increment can be interpreted as an indicator of CI since it was highly correlated with CI ($r_s=0.83$) in our study.

The results of our study are consistent with those of Pérez *et al.*, (2004) and Dea *et al.*, (2010), in which an increase in EL, electrical conductivity or loss of electrolytes was an indicator of the membrane damage (Sharom *et al.*, 1994). This possibly occurred as a result of CI, since EL, electrical conductivity or loss of electrolytes also increased significantly in other fruits stored at low temperature that suffered chilling injury such as pomegranate (Ramezani *et al.*, 2010) and mango (Dea *et al.*, 2010). The increase in conductivity of pitahaya exocarp can be a reliable variable to determine if the fruit is chill damaged and to what extent.

Translucency

Translucency increased in fruits stored 15 d at ambient temperature (22 ± 4 °C). Similarly, fruit stored under both conditions of refrigeration showed increment translucency, but the increase was less than that observed at ambient stored fruits (Figure 6). Refrigeration appeared to reduce this defect. Upon transfer to ambient conditions, only the fruit previously stored at 2 ± 1 °C had a further increase in translucency.

In fruits stored at 7 ± 1 °C for 30 d, there was a minor increase in translucency during storage and a further minor increase after transfer. With fruit stored at 2 ± 1 °C for 30 d, there was maximum development of translucency while still at storage conditions. This can be considered a stress response caused by the low storage temperature and can be related to the changes

larmente, los frutos refrigerados bajo ambas condiciones de temperatura mostraron aumento de translucidez, pero el aumento fue menor que el observado en los frutos almacenados a temperatura ambiente (Figura 6). Al parecer la refrigeración redujo este defecto. Al transferir los frutos a condiciones ambientales, sólo los previamente refrigerados a 2 ± 1 °C tuvieron un aumento ulterior en la translucidez.

En los frutos almacenados a 7 ± 1 °C por 30 d, hubo un aumento ligero en la translucidez durante la refrigeración y luego un aumento menor después de la transferencia. Con fruta almacenada 30 d a 2 ± 1 °C, hubo el desarrollo máximo de la translucidez, aún en condiciones de almacenamiento refrigerado. Esto se puede considerar una respuesta al estrés causado por las temperaturas bajas de almacenamiento, y puede estar relacionado con los cambios de la LE y sus consecuencias para el funcionamiento celular normal, como ya se discutió. Esto resultó en un cambio en el color blanco de la pulpa a una apariencia translúcida. Según Soler (1994), la translucidez es causada por desaparición de los espacios gaseosos intercelulares de la pulpa.

La translucidez elevada en frutos almacenados en refrigeración a 2 ± 1 °C, temperatura que causa síntomas de DF en pitahaya, indica que está asociada con la manifestación de este desorden. La translucidez tuvo correlación positiva ($r_s=0.68$) con el DF y es una variable que se puede usar para identificar el comienzo del DF en pitahaya.

Nerd *et al.* (1999) reportan que la translucidez fue un síntoma de DF además del ablandamiento, picado, oscurecimiento y pérdida de sabor. Estos autores también señalan que estos síntomas se desarrollan rápido cuando los frutos de *H. undatus* y *H. polybizus* se almacenan a 6 °C por 2 semanas y luego se conservan a 20 °C. To *et al.* (2002) reportan translucidez alta en frutos de pitahaya (almacenados a 4 y 6 °C) y en otros frutos susceptibles a DF (Raimbault *et al.*, 2011 y, Singh y Singh, 2013).

Ángulo hue (color sólido)

Frutas con el DF más alto mostraron el hue más alto (excepto los frutos almacenados 15 d a 7 °C y un período adicional de 7 d a 22 ± 4 °C) (Cuadro 2); esto sugiere una tendencia a colores anaranjados, en detrimento del color rojo. Esto es lógico, porque las bajas temperaturas causan maduración irregular

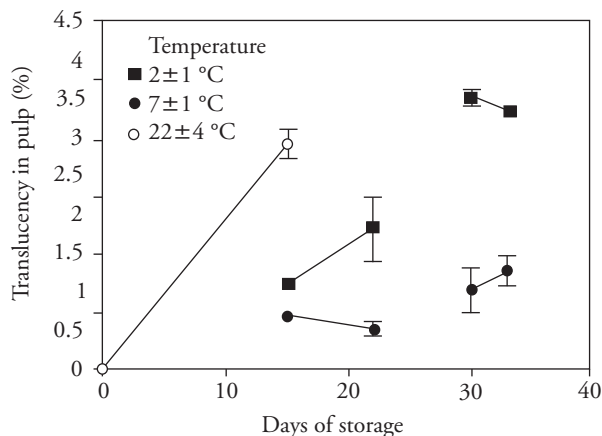


Figure 6. Translucency (\pm standard deviation) in fruits of pitahaya (*Hylocereus undatus* H.) stored during 15 d at room temperature (o) or stored during 15 d in refrigeration and then 7 d at room temperature; 30 d in refrigeration and then 3 d at room temperature.

Figure 6. Translucidez (\pm desviación estándar) en frutos de pitahaya (*Hylocereus undatus* H.) almacenados durante 15 d a temperatura ambiente, 15 d en refrigeración y después 7 d a temperatura ambiente; 30 d en refrigeración y después durante 3 d a temperatura ambiente.

in EL and its consequences for normal cellular functioning as discussed previously. This resulted in a change in the pulp from a characteristic white color to the translucent appearance. According to Soler (1994), translucency is caused by the disappearance of the gaseous intercellular spaces in the pulp.

The elevated level of translucency in fruits stored at 2 ± 1 °C, a temperature that causes symptoms of CI in pitahaya, indicates that it is associated with the manifestation of this disorder. Translucency was positively correlated ($r_s=0.68$) with CI and is a variable that can be used to identify the onset of CI in pitahaya.

Nerd *et al.* (1999) report that translucency was a symptom of chilling injury in pitahaya as well as softening, sunken areas, darkening and loss of flavor. These authors also point out that these symptoms develop rapidly when fruits of *H. undatus* and *H. polyhizus* were stored at 6 °C for 2 weeks and then held at 20 °C. Elevated translucency was described in pitahaya fruits stored at 4 y 6 °C (To *et al.*, 2002) and 5 °C (Freitas and Mitcham, 2013), and translucency was also reported in other fruits susceptible to CI (Raimbault *et al.*, 2011 and Singh and Singh, 2013).

(Kader, 2007) y, así, una alteración del color. Aunque se obtuvo una correlación positiva ($r_s=0.65$) entre el ángulo hue y DF, de acuerdo con información evaluada previamente en este estudio, se encontró que esta variable no es confiable para medir DF en pitahayas.

Chroma (intensidad)

Esta variable disminuyó cuando los frutos se almacenaron a 2 °C, independiente del período de almacenamiento (Cuadro 2). Esto sugiere que el color rojo perdió pureza, lo que afecta la calidad; sin embargo, no todos estos frutos mostraron DF. Aunque Corrales-García y Canché-Canche (2008) propusieron que la incapacidad de las pitahayas para aumentar la saturación de color podría interpretarse una manifestación de DF, como con la variable mencionada, no es posible confirmar su confiabilidad para evaluar la DF.

Firmeza

Los aumentos de la firmeza se relacionaron con el período de almacenamiento (Cuadro 2), lo que se podría deber a pérdida de humedad o la manera para determinar la firmeza. Estos resultados son contrarios a los reportados por Balois-Morales *et al.* (2013), quienes encontraron que la firmeza es una característica estable en pitahaya durante el almacenamiento refrigerado o a temperatura ambiente.

CONCLUSIONES

Las variables consistente y positivamente correlacionadas con DF fueron AT, SOD, contenido de etanol, FE y translucidez. Por lo tanto, al aumentar la gravedad del daño (temperatura más baja y período de almacenamiento más largo), hubo un cambio proporcionalmente mayor en estas variables. La expresión de variables correlacionadas se observó cuando los frutos fueron transferidos a temperatura ambiente después de los períodos de almacenamiento refrigerado (15 o 30 d).

—Fin de la versión en Español—

-----*

Hue angle (solid color)

Fruits with the highest CI showed the highest hue angle (except the fruit stored at 7 °C during 15 d and an additional period of 7 d at 22±4 °C) (Table 2); this suggests a tendency to orange colorations, in detriment of red color. This is logical, because low temperatures cause irregular ripening (Kader, 2007) and thus, an alteration of color. Although it was obtained a positive correlation ($r_s = 0.65$) between the hue angle and DF, according to information previously evaluated in this study, it was found this variable is not reliable for measuring CI in pitahayas.

Chroma

This variable decreased when the fruits were stored at 2 °C, independently of the storage period (Table 2). This suggests that the red color lost purity, which affects the quality; however, not all of these fruits showed CI. Although Corrales-García and Canché-Canche (2008) proposed that the inability of pitahayas to increase color saturation could be interpreted as a manifestation of CI, as the variable mentioned, it is not possible to confirm their reliability to assess CI.

Firmness

The increases in firmness were related to the storage period (Table 2), which could be due to moisture loss or the manner to determine firmness. These results are contrary to those reported by Balois-Morales *et al.* (2013), a who found that the firmness is feature stable in pitahaya during the cold and room temperature storage.

CONCLUSIONS

The variables consistently and positively correlated with CI were TA, SOD, ethanol content, EL, and translucency. Therefore, as severity of the damage (lower temperature and longer storage period), was increased there was a proportionally greater change in these variables. The expression of correlated variables was observed when fruits were transferred to ambient temperature after the refrigerated storage periods (15 or 30 d).

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Marita Cantwell for translation of a draft manuscript and constructive comments. We also thank the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) in Mexico for the scholarship granted to Beatriz Quiroz González.

LITERATURE CITED

- Álvarez-Herrera, J., G., A. Galvis J., and E. Balaguera-López H. 2009. Determinación de cambios físicos y químicos durante la maduración de frutos de champa (*Campomanesia lineatifolia* R. & P.). *Agron. Colomb.* 27: 253-259.
- Aquino-Bolaños E., N., and E. Mercado-Silva. 2004. Effects of polyphenol oxidase and peroxidase activity, phenolics and lignin content on the browning of cut jicama. *Postharvest Biol. Techn.* 33: 275-283.
- Balois-Morales R., M. T. Colinas-León, C. B. Peña-Valdivia, S. H. Chávez-Franco, y I. Alía-Tejagal. 2007. Sistema de estrés oxidativo, fenoles-polifenol oxidasa-peroxidasa, de frutos de pitahaya (*Hylocereus undatus*) almacenados con frío. *Rev. Chapingo Ser. Hortic.* 13: 115-120.
- Balois-Morales, R., M. T. Colinas L., C. B. Peña V., S. H. Chávez E., y I. Alía T. 2008. Sistema enzimático antisenescencia, catalasa-superóxido dismutasa, de frutos de pitahaya (*Hylocereus undatus*) almacenados con frío. *Rev. Chapingo Ser. Hortic.* 14: 295-299.
- Balois-Morales R., C. B. Peña-Valdivia, and V. B. Arroyo-Peña. 2013. Symptoms and sensitivity to chilling injury of pitahaya (*Hylocereus undatus* (Haw.) Britton & Rose) fruits during postharvest. *Agrociencia* 47: 795-813.
- Bill M., D. Sivakumar, K., Thompson A., and L. Korsten, 2014. Avocado fruit quality management during the postharvest supply chain. *Food Rev. Int.* 30: 169-202.
- Botondi, R., V. Russo, and F. Mencarelli. 2012. Anaerobic metabolism during short and long term storage of kiwifruit. *Postharvest Biol. Techn.* 64: 83-90.
- Bradford M., M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Bruemmer J., H. and B. Roe. 1985. Pyruvate dehydrogenase activity during ripening of Hamlin oranges. *Phytochemistry* 24: 2105-2106.
- Cantín C., M., H. Crisosto C., A. Ogundiwin E., T. Gradziel, J. Torrents, and A. Moreno M. 2010. Chilling injury susceptibility in an intra-specific peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] progeny. *Postharvest Biol. Techn.* 58: 79-87.
- Centurión Y., A., S. Solís P., E. Mercado S., R. Báez S., C. Saucedo V., y E. Sauri D. 1999. Variación de las principales características de la pitahaya (*Hylocereus undatus*) durante su maduración postcosecha. *Hort. Méx.* 7: 419-425.
- Corrales-García, J., and E. Canche-Canche. 2008. Physical and physiological changes in low-temperature-stored pitahaya fruit (*Hylocereus undatus*). *J. Prof. Assoc. Cactus Dev.* 8: 108-119.

- Davis P., L., and G. Chace Jr. W. 1969. Determination of alcohol in citrus juice by gas chromatographic analysis of headspace. *HortScience* 4: 117.
- Dea S., K. Brecht J., C. N. Nunes M., and A. Baldwin E. 2010. Occurrence of chilling injury in fresh-cut 'Kent' mangoes. *Postharvest Biol. Technol.* 57: 61-71.
- Famiani F., A. Battistelli, S. Moscatello, J. G. Cruz-Castillo, y R. Walker P. 2015. Ácidos orgánicos acumulados en la pulpa de los frutos: ocurrencia, metabolismo y factores que afectan sus contenidos-una revisión. *Rev. Chapingo Serie Hortic.* 21: 97-128.
- Forney C., F., and A. Jordan M. 1996. Stress-induced ethanol production in fresh fruit and vegetables. *HortScience* 31: 635-635.
- Freitas S., T., and E. J. Mitcham. 2013. Quality of pitaya fruit (*Hylocereus undatus*) as influenced by storage temperature and packaging. *Sci. Agric.* 70: 257-262.
- García S., M., L., I. Vargas-Arispuro, A. A. Gardea B., M. H. Tiznado, y M. A. Martínez-Téllez. 2005. Daño por frío en melón Cantaloupe en dos estados de madurez. *Rev. Fitotec. Mex.* 28: 161-170.
- Geigenberger P. 2003. Response of plant metabolism to too little oxygen. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6: 247-256.
- Hodges D., M., J. Andrews C., A. Johnson D., and I. Hamilton R. 1997. Antioxidant enzyme responses to chilling stress in differentially sensitive inbred maize lines. *J. Exp. Bot.* 48: 1105-1113.
- Kader, A. 2007. Postharvest biology and technology: An overview. *In: Kader A. A. (ed.). Postharvest Technology of Horticultural Crops. Div. Agr. Nat. Res., University of Calif., California, USA. pp: 39-47.*
- Kennedy R., A., E. Rumpho M., and C. Fox T. 1992. Anaerobic metabolism in plants. *Plant Physiol.* 100: 1-6.
- Kimmerer, T., and T. Kozlowski. 1982. Ethylene, ethane, acetaldehyde and ethanol production by plants under stress. *Plant Physiol.* 69: 840-847.
- Kozukue, N., and K. Ogata. 1972. Physiological and chemical studies of chilling injury in pepper fruits. *J. Food Sci.* 37: 708-711.
- Lakshminarayana S., L. Sosa A., and F. Barrientos-Pérez. 1979. The development and postharvest physiology of the fruit of prickly pear (*Opuntia amyoclaea* Tenore). *In: Inglet G., E., and G. Charalalambus (eds). Tropical Foods: Chemistry and Nutrition. Academic Press, New York. pp. 69-93.*
- Magaña B., W., E. Sauri D., J. García C., y C. Saucedo V. 2013. Variaciones bioquímicas-fisiológicas y físicas de las frutas de pitahaya (*Hylocereus undatus*) almacenadas en ambiente natural. *Rev. Iberoamer. Tec. Postcosecha* 14: 21-30.
- Magaña W., M. I. Balbín, J. Corrales, A. Rodríguez, C. Saucedo, E. Cañizares, y E. Sauri. 2004. Efecto de la frigoconservación en el comportamiento fisiológico de frutas de pitahaya (*Hylocereus undatus* Haworth). *Cul. Trop.* 25: 33-39.
- McGuire R., G. 1992. Reporting of objective color measurements. *HortScience* 27: 1254 - 1255.
- Mittler R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7: 405-410.
- Morris L., L. 1982. Chilling injury of horticultural crops: an overview. *HortScience* 17: 161-162.
- Moyano, E., S. Encinas-Villarejo, J. A. López-Ráez, J. Redondo-Navado, R. Blanco-Portales, M. L. Bellido C. Sanz, J. L. Caballero, and J. Muñoz-Blanco. 2004. Comparative study between two strawberry pyruvate decarboxylase genes along fruit development and ripening, post-harvest and stress conditions *Plant Sci.* 166: 835-845.
- Muy R., D., J. Siller C., J. Díaz P., y B. Valdéz T. 2004. Efecto de las condiciones de almacenamiento y el encerado en el estatus hídrico y la calidad poscosecha de pepino de mesa. *Rev. Fitotec. Mex.* 27: 157-165.
- Navarro-López E., R., R. Nieto-Ángel, J. Corrales-García, M. R. García-Mateos, y A. Ramírez-Arias. 2012. Calidad poscosecha en frutos de tomate hidropónico producidos con agua residual y de pozo. *Rev. Chapingo Ser. Hortic.* 18: 263-277.
- Nerd A., F. Gutman, and Y. Mizrahi. 1999. Ripening and postharvest behavior of fruits of two *Hylocereus* species (Cactaceae). *Postharvest Biol. Technol.* 17: 39-45.
- Osuna E., T., M. E. Ibarra Z., M. D. Muy R., J. B. Valdéz T., M. Villarreal R., y S. Hernández V. 2011. Calidad poscosecha de frutos de pitahaya (*Hylocereus undatus* Haw.) cosechados en tres estados de madurez. *Rev. Fitotec. Mex.* 34: 63-72.
- Osuna E., T., J. B. Valdéz-Torres, J. A. Sañudo-Barajas, Ma. D. Muy-Rangel, S. Hernández-Verdugo, M. Villarreal-Romero, J. M. Osuna-Rodríguez. 2016. Fenología reproductiva, rendimiento y calidad del fruto de pitahaya (*Hylocereus undatus* (How.) Britton y Rose) en el valle de Culiacán, Sinaloa, México. 50: 61-78.
- Or E., J. Baybik, A. Sadka, and A. Ogradovitch. 2000. Fermentative metabolism in grape berries: isolation and characterization of pyruvate decarboxylase cDNA and analysis of its expression throughout berry development. *Plant Sci.* 156: 151-158.
- Pérez L., A., C. Saucedo V., M. L. Arévalo G., y A. Muratalla L. 2004. Efecto del grado de madurez en la calidad y vida poscosecha de ciruela mexicana (*Spondias purpurea* L.). *Rev. Fitotec. Mex.* 27: 133-139.
- Raimbault A., K., P. A. Marie-Alphonsine, J. P. Horry, M. Francois-Haugrin, K. Romuald, and A. Soler. 2011. Polyphenol oxidase and peroxidase expression in four pineapple varieties (*Ananas comosus* L.) after chilling injury. *J. Agric. Food Chem.* 59: 342-348.
- Ramaswamy H., S. 2015. Post-harvest Technologies of Fruits & Vegetables. DEStech Publications, Inc. Pensilvania, USA. 364 p.
- Ramezani A., M. Rahemi, M. Maftoun, B. Kholdebarin, S. Eshghi, S. M. Reza and V. Tavallali. 2010. The ameliorative effects of spermidine and calcium chloride on chilling injury in pomegranate fruits after long-term storage. *Fruits* 65: 169-178.
- Rodríguez-Rodríguez D., A., M. P. Patiño-Gutiérrez, D. Miranda-Lasprilla, G. Fischer, and J. A. Galvis-Vanegas. 2005. Effect of two ripening stages and two storage temperatures on the postharvest behaviour of yellow pitahaya (*Selenicereus megalanthus* Haw.). *Rev. Fac. Nac. Agron, Medellín* 58: 2837-2857.
- Sharom M., C., Willemot, and J. Thompson E. 1994. Chilling injury induces lipid phase changes in membranes of tomato fruit. *Plant Physiol.* 105: 305-308.
- Shao Y., J. Xie, P. Chen, and W. Li. 2013. Changes in some chemical components and in the physiology of rambutan fruit (*Nephelium lappaceum* L.) as affected by storage temperature and packing material. *Fruits* 68: 15-24.

- Singh S., P., and Z. Singh. 2013. Controlled and modified atmospheres influence chilling injury, fruit quality and antioxidative system of Japanese plums (*Prunus salicina* Lindell). *Int. J. Food Sci. Tech.* 48: 363-374.
- Soler A. 1994. Déviation de la maturation chez l'ananas: le «jaune» ou translucidité. I: Caractéristiques physiques et chimiques du fruit translucide. *Fruits* 49: 5-15.
- Tadege M., I. Dupuis, and C. Kuhlemeier. 1999. Ethanolic fermentation: new functions for an old pathway. *Trends Plant Sci.* 4: 320-325.
- Tietel Z., E. Bar, E. Lewinsohn, E. Feldmesser, E. Fallik, and R. Porat. 2010. Effects of wax coatings and postharvest storage on sensory quality and aroma volatile composition of 'Mor' mandarins. *J. Sci. Food Agric.* 90: 995-1007.
- To L., V., N. Ngu, D. Duc N., and T. T. Huong H. 2002. Dragon fruit quality and storage life: Effect of harvest time, use of plant growth regulators and modified atmosphere packaging. *Acta Hort.* 575: 611-621.
- Thompson A., K. 2010. *Controlled Atmosphere Storage of Fruits and Vegetables*. CAB International: UK. 288 p.
- Thorne S., N., and J. O. Efiuvewewere B. 1988. Changes in organic acids in chilled tomato fruit (*Lycopersicon esculentum* Mill). *J. Sci. Food Agric.* 44: 309-319.
- Viet K., N., and L. T. Thanh T. 2014. Green trade barriers and vietnam's agricultural and fishery export. *J. Globalization Stud.* 5: 69-80.
- Wang C., Y. 1994. Chilling injury of tropical horticultural commodities. *HortScience* 29: 986-988.
- Wang C., Y. 2010. Alleviation of chilling injury in tropical and subtropical fruits. *Acta Hort.* 864: 267-273.
- Wisner W., V. 2003. Low temperature as a causative agent of oxidative stress in postharvest crops. *In: Hodges M. D. (ed). Postharvest Oxidative Stress in Horticultural Crops*. Food Products Press. New York, USA. pp: 55-68.
- SAS*. 2006. *SAS/STAT User's Guide*. Institute Inc. Statistical Analysis Systems Institute. Version 9.1th Ed. Cary, NC.: SAS Institute Inc.
- Soleimani A., M., and S. Bodbodak. 2014. Postharvest heat treatment for mitigation of chilling injury in fruits and vegetables. *Food Bioprocess Tech.* 7: 37-53.
- Žnidarčič D., and T. Požrl. 2006. Comparative study of quality changes in tomato cv. 'Malike' (*Lycopersicon esculentum* Mill) whilst stored at different temperatures. *Acta Agric. Slovenica* 87: 235-243.