

# Impact of two hot water treatments applied sequentially on oxidative metabolism related to chilling injury tolerance in mango fruit

## Impacto de dos tratamientos hidrotérmicos aplicados secuencialmente sobre el metabolismo oxidativo relacionado con la tolerancia al daño por frío en frutos de mango

Martha Edith López-López<sup>1</sup>; María Fernanda Ramírez-Perales<sup>1</sup>;  
Lidia Elena Ayón-Reyna<sup>1</sup>; Francisco Delgado-Vargas<sup>1</sup>;  
Abraham Cruz-Mendivil<sup>2</sup>; Misael Odín Vega-García<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Universidad Autónoma de Sinaloa. Av. de las Américas y Josefa Ortiz s/n, Culiacán, Sinaloa, C. P. 80010, MÉXICO.

<sup>2</sup>Cátedras CONACYT - Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR). Boulevard Juan de Dios Bátiz Paredes, núm. 250, col. San Joachin, Guasave, Sinaloa, C. P. 81049, MÉXICO.

\*Corresponding author: mvega6@yahoo.com, tel. 66 77 80 43 72.

### Abstract

Mango is susceptible to chilling injury (CI). Its short-term exposure to heat treatments can induce tolerance to this disorder; however, a short time is not enough to control the fruit fly. In this sense, the application of sequential heat treatments where the quarantine treatment is included can bring great benefits for mango marketing. The aim of this research was to evaluate the effect of two different sequentially-applied hot water treatments (HWT) on CI tolerance and changes in oxidative metabolism in mango. Mangoes were divided into four groups: control, HWT<sub>1</sub> (dipping in water at 46.1 °C for 75 min), HWT<sub>2</sub> (dipping in water at 55 °C for 5 min), and HWT<sub>1</sub> + HWT<sub>2</sub>. Fruits were stored at 5 °C/30 days to induce CI and thereafter at 21 °C for 8 days. Three replicates with five repetitions were used to evaluate CI index, electrolyte leakage (EL), malondialdehyde (MDA), weight loss (WL), color, firmness and enzymatic antioxidant activity. The use of HWT<sub>1</sub> reduced CI during low temperature storage, while HWT<sub>2</sub> and the HWT<sub>1</sub> + HWT<sub>2</sub> showed lower CI symptoms during ripening. The use of HWT<sub>1</sub> showed a similar EL % and higher MDA content ( $7.07 \times 10^4 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) than the control ( $6.68 \times 10^4 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ). HWT<sub>1</sub> + HWT<sub>2</sub> showed the lowest WL (2.98 %) and the highest enzymatic antioxidant activity during cold storage and during the first days at 21 °C, while HWT<sub>2</sub> showed the highest color and firmness retention. HWT applied sequentially can be considered an effective alternative to induce CI tolerance and to maintain the quality of mango.

**Keywords:** *Mangifera indica* L., quarantine treatment, short-term heating, cold stress, antioxidant enzymes.

### Resumen

El mango es susceptible a daño por frío (DF), aunque su exposición a tratamientos térmicos de corto plazo puede inducir tolerancia a esta alteración; sin embargo, un periodo corto no es suficiente para controlar la mosca de la fruta. En este sentido, la aplicación de tratamientos térmicos secuenciales cuando se emplea el tratamiento cuarentenario puede implicar grandes beneficios para la comercialización del mango. El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de dos tratamientos hidrotérmicos (THT) aplicados secuencialmente sobre la tolerancia al DF y los cambios en el metabolismo oxidativo del mango. Los frutos se dividieron en cuatro grupos: testigo, THT<sub>1</sub> (inmersión en agua a 46.1 °C durante 75 min), THT<sub>2</sub> (inmersión en agua a 55 °C durante 5 min) y THT<sub>1</sub> + THT<sub>2</sub>. Los frutos se almacenaron a 5 °C por 30 días para inducir el DF, y después a 21 °C durante 8 días. Se utilizaron tres muestras con cinco repeticiones para evaluar el índice de DF, la pérdida de electrolitos (PE), el malondialdehído (MDA), la pérdida de peso (PP), el color, la firmeza y la actividad enzimática antioxidante. El THT<sub>1</sub> redujo el DF durante el almacenamiento a temperatura baja, mientras que el THT<sub>2</sub> y el THT<sub>1</sub> + THT<sub>2</sub> presentaron menores síntomas de DF durante la maduración. El uso de THT<sub>1</sub> mostró un porcentaje similar de PE y mayor contenido de MDA ( $7.07 \times 10^4 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) que el testigo ( $6.68 \times 10^4 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ). La combinación THT<sub>1</sub> + THT<sub>2</sub> presentó la menor PP (2.98 %) y la mayor actividad enzimática antioxidante durante el almacenamiento frío durante los primeros días a 21 °C; en tanto que el THT<sub>2</sub> mostró la retención más alta de color y firmeza. Los THT aplicados de manera secuencial se pueden considerar una alternativa efectiva para inducir la tolerancia al DF y para mantener la calidad del mango.

**Palabras clave:** *Mangifera indica* L., tratamiento cuarentenario, calentamiento de corto plazo, estrés por frío, enzimas antioxidantes.



## Introduction

Mango (*Mangifera indica* L.) is a tropical fruit, highly accepted by consumers due to its unique taste, aroma and attractive appearance. This fruit is produced and marketed throughout the world. Mexico is the world's sixth largest producer but is the leading exporter, especially to Canada, the United States of America, and Japan (Food and Agriculture Organization [FAO], 2021). For marketing, mango is stored at critical temperatures (10-13 °C) because in its pre-climacteric stage it is highly susceptible to chilling injury (CI) (Chongchatuporn, Ketsa, & van Doorn, 2013; Zhang et al., 2017), a physiological disorder that is observed when fruit is stored below the critical temperature.

The susceptibility to CI is related to the storage time and physicochemical quality of the fruit (López-López et al., 2018; de Mello-Vasconcelos et al., 2019). Changes in the components of the membrane and its permeability are the first responses to CI at the cellular level, while oxidative stress is the second response (Zhang, Shen, Li, Meng, & Sheng, 2013; Shadmani, Ahmad, Saari, Ding, & Tajidin, 2015). The combination of these responses in "Tommy Atkins" mango results in symptoms like pitting or sunken lesions, peel browning, uneven ripening, internal discoloration, water soaking of the tissue, and fungal decay (Wang et al., 2008; Kim, Lounds-Singleton, & Talcott, 2009), and the symptoms can become more intense when fruit is stored at higher temperatures (Zhang et al., 2012).

Previous studies have reported that the use of oxalic acid ("Zill"; Li, Zheng, Liu, & Zhu, 2014), nitric oxide ("Kensington Pride", Zaharah & Singh, 2011; Barman, Asrey, Pal, Jha, & Bhatia, 2014), gum arabic and calcium chloride ("Choke Anan"; Khaliq, Muda-Mohamed, Ghazali, Ding, & Ali, 2016), and hot water treatment (quarantine) alone ("Tommy Atkins", Kim et al., 2009) or in combination with calcium chloride ("Keitt", López-López et al., 2018; Díaz-Corona et al., 2020) reduce susceptibility to chilling temperatures in mango.

The use of moderate stress (heat or cold temperature) prior to storage at low temperature is a technology that helps fruit to reduce oxidative stress, activating the antioxidant system which includes enzymes like superoxide dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), catalase (CAT, EC 1.11.1.6), ascorbate peroxidase (APX, EC 1.11.1.11), glutathione reductase (GR, EC 1.8.1.7), and peroxidase (POD, EC 1.11.1.7). It also increases heat shock proteins and antioxidant compounds such as polyphenols, carotenoids and ascorbic acid (López-López et al., 2018; Zhang et al., 2019). This system allows the defense mechanism to be prepared for an enhanced stress like cold storage and has positive effects on fruit quality by reducing respiration rate and increasing shelf life (Dea, Brecht, Nunes, & Baldwin, 2010; Nasef, 2018).

## Introducción

El mango (*Mangifera indica* L.) es un fruto tropical, muy aceptado por los consumidores debido a su sabor único, su aroma y su aspecto atractivo. Este fruto se produce y comercializa en todo el mundo, donde México es el sexto productor mundial y el principal exportador, especialmente hacia Canadá, Estados Unidos de América y Japón (Food and Agriculture Organization [FAO], 2021). Para su comercialización, el mango se almacena a temperaturas críticas (10 a 13 °C), ya que en su etapa preclimática es altamente susceptible al daño por frío (DF) (Chongchatuporn, Ketsa, & van Doorn, 2013; Zhang et al., 2017), un trastorno fisiológico que se observa cuando la fruta se almacena por debajo de la temperatura crítica.

La susceptibilidad al DF está relacionada con el tiempo de almacenamiento y la calidad fisicoquímica del fruto (López-López et al., 2018; de Mello-Vasconcelos et al., 2019). Los cambios en los componentes de la membrana y su permeabilidad son las primeras respuestas al DF a nivel celular, mientras que el estrés oxidativo es la segunda respuesta (Zhang, Shen, Li, Meng, & Sheng, 2013; Shadmani, Ahmad, Saari, Ding, & Tajidin, 2015). La combinación de estas respuestas en el mango "Tommy Atkins" genera síntomas como lesiones de picado o hundimiento, oscurecimiento de la cáscara, maduración irregular, decoloración interna, humedecimiento del tejido y deterioro por hongos (Wang et al., 2008; Kim, Lounds-Singleton, & Talcott, 2009). Además, los síntomas pueden ser más intensos cuando la fruta se almacena a temperaturas más altas (Zhang et al., 2012).

Estudios previos han reportado que el uso de ácido oxálico ("Zill"; Li, Zheng, Liu, & Zhu, 2014), óxido nítrico ("Kensington Pride", Zaharah & Singh, 2011; Barman, Asrey, Pal, Jha, & Bhatia, 2014), goma arábiga, cloruro de calcio ("Choke Anan"; Khaliq, Muda-Mohamed, Ghazali, Ding, & Ali, 2016), y el tratamiento hidrotérmico (cuarentenario) solo ("Tommy Atkins", Kim et al., 2009) o en combinación con cloruro de calcio ("Keitt", López-López et al., 2018; Díaz-Corona et al., 2020) reduce la susceptibilidad del mango a las temperaturas bajas.

El uso de estrés moderado (temperatura alta o baja) antes del almacenamiento a baja temperatura es una tecnología que ayuda al fruto a reducir el estrés oxidativo, al activar el sistema antioxidante que incluye enzimas como superóxido dismutasa (SOD, EC 1.15.1.1), catalasa (CAT, EC 1.11.1.6), ascorbato peroxidasa (APX, EC 1.11.1.11), glutatión reductasa (GR, EC 1.8.1.7) y peroxidasa (POD, EC 1.11.1.7). Asimismo, aumenta las proteínas de choque térmico y los compuestos antioxidantes como los polifenoles, los carotenoides y el ácido ascórbico (López-López et al., 2018; Zhang et al., 2019). Este sistema permite preparar el mecanismo de defensa para un estrés potenciado como el

The mango export protocol requires the fruit to be subjected to a quarantine treatment to eliminate invasive pests (USDA-APHIS, 2014). The use of hot water as a quarantine treatment (46.1 °C/75 to 110 min; USDA-APHIS, 2014) allows fruit fly disinfection and reduces lenticel darkening and anthracnose. Also, a quarantine treatment increases the activity of antioxidant enzymes (CAT, APX and POD) and reduces CI susceptibility in mango (López-López et al., 2018; Díaz-Corona et al., 2020). However, quarantine treatment can also accelerate ripening, increasing softening, water loss, sinking pulp in the peduncle area and poor color development, compromising the mango quality (Dessalegn, Ayalew, & Woldetsadik, 2013; Nasef, 2018).

On the other hand, the use of short-term hot water treatments (HWT) allows a delay in fruit ripening and softening, maintaining postharvest quality. Some of these beneficial effects have been reported in several fruits, such as “lisbo” lemon (*Citrus limon* [L.] Brum) (Safizadeh, Rahemi, & Aminlari, 2007), “Satsuma” mandarin (*Citrus unshiu* Marc) (Ghasemnezhad, Marsh, Shilton, Babalar, & Woolf, 2008), “Italica” broccoli (*Brassica oleracea*) (Zhang, Nakano, & Maezawa, 2009), “Baifeng” peach (*Prunus persica* Batsch) (Jin, Zheng, Tang, Rui, & Wang, 2009) and loquat (*Eriobotrya japonica*) (Shao & Tu, 2012). In mango (“Tainong 1” and “Tommy Atkins”), short-term heat treatment (55°C, 10 min; 55 °C, 5 min) also increases CI tolerance and reduces quality loss, but does not control the fruit fly (Zhang et al., 2012; Almeida-Miguel, Durigan, Marques, Ascari Morgado, & Ferraudo, 2016).

Some authors report that sequential heat treatments in “Tommy Atkins” (hot water at 36.5 °C for 75 min + 46.5 °C for 61 min) and “Tu Shien” (hot water for 55 °C for 3 min + vapor heat at 46.5 °C for 40 min) mangoes previous to storage at low temperatures increases CI tolerance and reduces membrane damage and water loss, compared to the same treatments applied individually (Nyanjage, Wainwright, & Bishop, 1999; Le, Shiesh, & Lin, 2010), but these combinations do not control the fruit fly. In this sense, sequential heat treatments where quarantine treatment is included can have great benefits, taking advantage of the fact that quarantine hot water treatment ensures pest control and that it is a mandatory treatment for mangoes exported to the United States. The objective of this study was to determine the effect of sequential hot water treatments on CI incidence and antioxidant enzyme activity in “Tommy Atkins” mango during storage at 5 °C (85-90 % relative humidity) and ripening.

## Materials and methods

### Plant material, treatments and experimental design

“Tommy Atkins” mangoes were obtained from an orchard located in Culiacan, Sinaloa, Mexico (24° 46' 23" N

almacenamiento en frío, y tiene efectos positivos en la calidad de la fruta al reducir la tasa de respiración y prolongar la vida de anaquel (Dea, Brecht, Nunes, & Baldwin, 2010; Nasef, 2018).

El protocolo de exportación demanda que los frutos sean sometidos a un tratamiento cuarentenario para eliminar plagas invasivas (USDA-APHIS, 2014). El uso de agua caliente como tratamiento cuarentenario (46.1 °C durante 75 a 110 min; USDA-APHIS, 2014) permite la desinfección de moscas de la fruta y reduce tanto el oscurecimiento lenticelar como la antracnosis. Adicionalmente, los tratamientos cuarentenarios incrementan la actividad de las enzimas antioxidantes (CAT, APX y POD) y reducen la susceptibilidad al DF en mango (López-López et al., 2018; Díaz-Corona et al., 2020). No obstante, el tratamiento cuarentenario también puede acelerar la maduración y potenciar el ablandamiento, la pérdida de agua, el hundimiento de la pulpa en el área del pedúnculo y el desarrollo deficiente del color, lo cual compromete la calidad del mango (Dessalegn, Ayalew, & Woldetsadik, 2013; Nasef, 2018).

Por otro lado, el uso de tratamientos hidrotérmicos (THT) de corto plazo permite retrasar la maduración y el ablandamiento del fruto, lo cual mantiene la calidad poscosecha. Algunos de estos efectos benéficos han sido reportados en frutos, como el limón “Lisboa” (*Citrus limon* [L.] Brum) (Safizadeh, Rahemi, & Aminlari, 2007), la mandarina “Satsuma” (*Citrus unshiu* Marc) (Ghasemnezhad, Marsh, Shilton, Babalar, & Woolf, 2008), el brocoli “Italica” (*Brassica oleracea*) (Zhang, Nakano, & Maezawa, 2009), el durazno “Baifeng” (*Prunus persica* Batsch) (Jin, Zheng, Tang, Rui, & Wang, 2009) y el níspero (*Eriobotrya japonica*) (Shao & Tu, 2012). En mango (“Tainong 1” y “Tommy Atkins”), el tratamiento térmico de corto plazo (55 °C por 10 min más 55 °C por 5 min) también incrementa la tolerancia al DF y reduce la pérdida de la calidad, pero no controla la mosca de la fruta (Zhang et al., 2012; Almeida-Miguel, Durigan, Marques, Ascari Morgado, & Ferraudo, 2016).

Algunos autores reportan que los tratamientos térmicos secuenciales en mangos “Tommy Atkins” (agua caliente a 36.5 °C durante 75 min + 46.5 °C durante 61 min) y “Tu Shien” (agua caliente a 55 °C durante 3 min + calor de vapor a 46.5 °C durante 40 min) aplicados previo al almacenamiento a temperaturas bajas incrementan la tolerancia al DF, y reducen el daño a la membrana y la pérdida de agua, en comparación con los mismos tratamientos aplicados de manera individual (Nyanjage, Wainwright, & Bishop, 1999; Le, Shiesh, & Lin, 2010), aunque estas combinaciones no controlan la mosca de la fruta. En este sentido, los tratamientos térmicos secuenciales, donde se incluye el tratamiento cuarentenario, pueden tener grandes beneficios, al aprovechar el hecho de que el tratamiento cuarentenario con agua caliente asegura

and 107° 32' 56'' W, at 26 m a. s. l.). The fruits were harvested from trees 15 and 20 years old located in sandy or clay soils, warm weather (30-34 °C). The plants were maintained with drip irrigation before the rainy season. The fruits were selected in stage 2 (8-11 °Brix) (Crisosto et al., 2009) with absence of physical damage and a weight range of approximately 350 to 420 g, and transferred to the Physiology and Technology Postharvest laboratory at the Autonomous University of Sinaloa, Mexico.

Fruits were cleaned by dipping in a solution of 300 µL·L<sup>-1</sup> sodium hypochlorite for 3 min, air dried and randomly divided into four groups. Each group received one of the following treatments: control (immersed in water at room temperature), HWT<sub>1</sub> (dipping in water at 46.1 °C for 75 [USDA-APHIS, 2014]), HWT<sub>2</sub> (dipping in water at 55 °C for 5 min [Ghasemnezhad et al., 2008]), and HWT<sub>1</sub> + HWT<sub>2</sub> (sequential treatment under the same aforementioned conditions, applied one after the other).

The HWT were carried out using a water bath (1266-02, Cole-Parmer®, Thermo Scientific, USA) with continuous hot water recirculation. Untreated mangoes (immersed in water at room temperature) were used as the control. Fruits of each treatment were stored at 5 °C (85-90 % relative humidity) for 15 and 30 days. After storage for 30 days at 5 °C, the fruits were exposed to ripening for 4 and 8 days at 21 °C ± 1 °C.

## Parameters evaluated

### Chilling injury index

The chilling injury index (CII) was determined according to López-López et al. (2018). The evaluations were made once fruits were removed from each storage. Symptoms of CI were visually assessed and included lenticel darkening (L), pitting (P), uneven color development (U), and decay (D). The severity (S) of CI symptoms was evaluated with a five-point visual scale (0 = no tissue injured, 1 = 1 to 25 % of tissue injured, 2 = 26 to 50 % of tissue injured, 3 = 51 to 75 % of tissue injured, and 4 = more than 76 % of tissue injured). Five fruits were used per day and treatment. The CII was calculated by the following formula:

$$CII = \frac{(SL + SP + SU + SD)}{4}$$

where *SL* is the severity of lenticel darkening, *SP* is the severity of pitting, *SU* is the severity of uneven color development, and *SD* is the severity of decay.

### Electrolyte leakage

For electrolyte leakage (EL), ten mesocarp discs (7 mm in diameter and 5 mm in height) were obtained

el control de plagas y que es un tratamiento obligatorio para los mangos exportados a los Estados Unidos. El objetivo de este estudio fue determinar el efecto de tratamientos térmicos secuenciales sobre la incidencia del DF, la actividad de las enzimas antioxidantes en mango "Tommy Atkins" y la maduración durante el almacenamiento a 5 °C (85 a 90 % de humedad relativa).

## Materiales y métodos

### Material vegetativo, tratamientos y diseño experimental

Los mangos "Tommy Atkins" se obtuvieron de una huerta ubicada en Culiacán, Sinaloa, México (24° 46' 23'' LN y 107° 32' 56'' LO, a 26 m s. n. m.). Los frutos se cosecharon de árboles de entre 15 y 20 años plantados en suelos arenosos y limosos, en clima cálido (30-34 °C). Las plantas se mantuvieron con riego por goteo antes de la temporada de lluvia. Los frutos se seleccionaron en el estadio 2 (8-11 °Brix) (Crisosto et al., 2009) con ausencia de daño físico y peso de 350 a 420 g; posteriormente, se transfirieron al laboratorio de Fisiología y Tecnología Poscosecha en la Universidad Autónoma de Sinaloa.

Los frutos se limpiaron por inmersión en una solución de 300 µL·L<sup>-1</sup> de hipoclorito de sodio durante 3 min, se secaron con aire y se dividieron aleatoriamente en cuatro grupos. Cada grupo recibió uno de los siguientes tratamientos: testigo (sumergidos en agua a temperatura ambiente durante 15 y 30 días), THT<sub>1</sub> (inmersión en agua a 46.1 °C durante 75 min [USDA-APHIS, 2014]), THT<sub>2</sub> (inmersión en agua a 55 °C durante 5 min [Ghasemnezhad et al., 2008]) y THT<sub>1</sub> +THT<sub>2</sub> (tratamiento secuencial bajo las condiciones antes mencionadas, aplicado uno después del otro).

Los THT se realizaron usando un baño (1266-02, Cole-Parmer®, Thermo Scientific, EUA) con recirculación continua de agua caliente. Los frutos de cada tratamiento se almacenaron a 5 °C (85 a 90 % de humedad relativa) durante 15 y 30 días. Después del almacenamiento de 30 días a 5 °C, los frutos se dejaron madurar durante 4 y 8 días a 21 °C ± 1 °C.

### Parámetros evaluados

#### Índice de daño por frío

El índice de daño por frío (IDF) se calculó de acuerdo con lo reportado por López-López et al. (2018). Las evaluaciones se hicieron una vez que las frutas se retiraron de cada almacenamiento. Los síntomas de DF se evaluaron visualmente e incluyeron oscurecimiento de la lenticela (L), picado (P), desarrollo irregular del color (U) y descomposición (D). La severidad de los síntomas por DF se evaluó mediante una escala visual de cinco puntos (0 = sin tejido dañado, 1 = 1 a 25 % de

from each fruit with a cork borer (Malacrida, Valle, & Boggio, 2006). The discs were washed three times with deionized water, then placed in 25 mL of 0.4 M mannitol solution and incubated for 2 h at 25 °C with continuous shaking (150 rpm). Electrical conductivity ( $S \cdot m^{-1}$ ) readings of the solution were taken with a conductivity meter (Hanna Instruments®, HI98311, South Africa) after incubation (initial electrical conductivity) and after the discs were autoclaved at 121 °C for 20 min and cooled at 25 °C (total electrical conductivity). Five fruits were used per day and treatment. The percentage of EL was calculated with the following formula:

$$EL(\%) = \frac{\text{initial electrical conductivity}}{\text{total electrical conductivity}} \times 100$$

#### Determination of malondialdehyde

The final product of lipid peroxidation is malondialdehyde (MDA) and was determined by the thiobarbituric acid (TBA) technique according to Hodges, de Long, Forney, and Prange (1999). Briefly, 1 g of fresh tissue and 30 mL of ethanol:water (80:20 v/v) were homogenized and centrifuged at 3,000 g (4 °C, 10 min). Two solutions were prepared: 1 mL of supernatant plus 1 mL of solution A (-TBA) and 1 mL of supernatant plus solution B (+TBA). Both solutions contained 20 % trichloroacetic acid (TCA) + 0.01 % butylated hydroxytoluene (BHT), and solution B also contained 0.65 % TBA. All samples were shaken, heated at 95 °C for 25 min, cooled and centrifuged (3,000 g) at 25 °C for 10 min. Absorbance readings were taken at 440, 532 and 600 nm using an UV-Vis spectrophotometer (SQ2800, Unico, USA). The concentration of MDA equivalents was calculated using the following formula:

$$A = [(ABS_{532+TBA} - ABS_{600+TBA}) - (ABS_{532-TBA} - ABS_{600-TBA})]$$

$$B = [(ABS_{440+TBA} - ABS_{600+TBA}) \times 0.0571]$$

$$MDA \text{ equivalents } (nmol \cdot L^{-1}) = \frac{A - B}{15,7000} \times 10^9$$

#### Weight loss

The weight loss (WL) was determined individually in nine fruits (Concellón, Zaro, Chaves, & Vicente, 2012). The weight was recorded on the initial day and then every 3 days during storage at 5 °C. The percentage of WL was calculated as follows:

$$WL(\%) = \frac{(W_i - W_f)}{W_i} \times 100$$

where  $W_i$  represents the initial weight and  $W_f$  represents the final weight.

tejido dañado, 2 = 26 a 50 % de tejido dañado, 3 = 51 a 75 % de tejido dañado y 4 = más de 76 % de tejido dañado). Se utilizaron cinco frutos por tratamiento al día. El IDF se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$IDF = \frac{(SL + SP + SU + SD)}{4}$$

donde  $SL$  es la severidad del oscurecimiento de la lenticela,  $SP$  es la severidad del picado,  $SU$  es la severidad del desarrollo irregular del color y  $SD$  es la severidad de la descomposición.

#### Pérdida de electrolitos

Para la pérdida de electrolitos (PE), se obtuvieron diez discos (7 mm de diámetro por 5 mm de altura) del mesocarpo de cada fruto con un barreno de corteza (Malacrida, Valle, & Boggio, 2006). Los discos se enjuagaron tres veces con agua deionizada, se colocaron en 25 mL de solución de 0.4 manatiol e incubaron por 2 h a 25 °C con agitación constante (150 rpm). Las lecturas de conductividad eléctrica ( $S \cdot m^{-1}$ ) de la solución se tomaron con un medidor de conductividad (HI98311, Hanna Instruments®, Sudáfrica) después de la incubación (conductividad eléctrica inicial); posteriormente, los discos se colocaron en autoclave a 121 °C durante 20 min y se enfriaron a 25 °C (conductividad eléctrica total). Se utilizaron cinco frutos por día y por tratamiento. El porcentaje de PE se calculó con la siguiente fórmula:

$$PE(\%) = \frac{\text{conductividad eléctrica inicial}}{\text{conductividad eléctrica total}} \times 100$$

#### Determinación del malondialdehído

El producto final de la peroxidación lipídica es el malondialdehído (MDA) y se determinó mediante la técnica del ácido tiobarbitúrico (TBA) conforme a Hodges, de Long, Forney, y Prange (1999). En resumen, se homogenizó 1 g de tejido fresco en 30 mL de etanol:agua (80:20 v/v) y se centrifugó a 3,000 g (4 °C por 10 min). Se prepararon dos soluciones: 1 mL de sobrenadante más 1 mL de solución A (-TBA) y 1 mL de sobrenadante más solución B (+TBA). Ambas soluciones contenían 20 % de ácido tricloroacético (TCA) + 0.01 % de hidroxitolueno butilado (BHT). La solución B también contenía 0.65 % de TBA. Todas las muestras se agitaron, se calentaron a 95 °C durante 25 min, se enfriaron y se centrifugaron (3,000 g) a 25 °C durante 10 min. Se tomaron lecturas de absorbancia a 440, 532 y 600 nm utilizando un espectrofotómetro UV-Vis (SQ2800, Unico, EUA). La concentración de equivalentes de MDA se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$A = [(ABS_{532+TBA} - ABS_{600+TBA}) - (ABS_{532-TBA} - ABS_{600-TBA})]$$

### Color

This parameter was measured using a colorimeter (CR200, Minolta, Japan) based on the CIELAB color system and calibrated with a white plate. The measurements were made in three equidistant points on the equatorial axis of each fruit peel, and the values of luminosity ( $L^*$ ) and hue angle ( $^\circ\text{Hue}$ ) were recorded.

### Firmness

Firmness was evaluated with a digital penetrometer (Chatillon DFE 100, AMETEK®, USA) fitted with an 11 mm diameter stainless steel cylinder probe. The fruit peel was removed and the mesocarp was penetrated (5 mm depth) at six different points with a constant speed of 50 mm·min<sup>-1</sup>. The results are expressed in Newtons (N).

### Oxidative metabolism (enzymatic activity)

**Superoxide dismutase (SOD, EC 1.15.1.1).** The enzymatic activity of SOD was determined according to López-López et al. (2018). A freeze-dried tissue sample of 0.5 g was homogenized with 5 mL of 0.05 M potassium phosphate buffer (pH 7.5) + 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) + 5 % polyvinylpyrrolidone (PVP). The mixture was centrifuged for 15 min (17,200 g at 4 °C) and the supernatant was recovered as enzymatic extract. The reaction mixture included 1 µL of enzymatic extract plus 199 µL of 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.8) which contained 0.025 % Triton X-100, 0.01 M methionine, 0.11 M EDTA, and 57 µM nitro blue tetrazolium chloride (NBT), plus 50 µL of 20 µM riboflavin (final volume 250 µL). The absorbance at 550 nm was recorded before and after the light exposition (25 W) for 10 min, using a microplate reader (The Synergy™ HT Multi-Detection, Bio-Tek®, USA).

SOD activity is expressed in units of enzymatic activity per milligram of protein (U·mg<sup>-1</sup> protein). One unit of SOD activity was defined as the amount of enzyme that would inhibit 50 % of the NBT photoreduction. Proteins were quantified using the Bradford (1976) assay.

**Catalase (CAT, EC 1.11.1.6).** To analyze CAT activity, 0.5 g of freeze-dried tissue was homogenized with 5 mL of extraction buffer (0.045 M potassium phosphate [pH 7.0] + 5 mM dithiothreitol + 5 mM EDTA + 0.125 g of polyvinylpyrrolidone). The mixture was centrifuged at 17,200 g and 4 °C for 30 min. The supernatant was recovered as enzymatic extract. CAT activity was determined by measuring the disappearance of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (López-López et al., 2018). The reaction mixture contained 1 mL of 0.04 M potassium phosphate buffer (pH 7.0) plus 0.04 M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 25 µL of enzymatic extract. The changes in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration

$$B = [(ABS_{440+TBA} - ABS_{600+TBA}) \times 0.0571]$$

$$MDA \text{ equivalentes (nmol} \cdot L^{-1}) = \frac{A - B}{157,000} \times 10^9$$

### Pérdida de peso

La pérdida de peso (PP) se determinó individualmente en nueve frutos (Concellón, Zaro, Chaves, & Vicente, 2012). El peso se registró el día inicial y, posteriormente, cada tres días durante el almacenamiento a 5 °C. El porcentaje de PP se calculó como se indica a continuación:

$$PP(\%) = \frac{(Pi - Pf)}{Pi} \times 100$$

donde  $Pi$  representa el peso inicial y  $Pf$  es el peso final.

### Color

Este parámetro se midió con un colorímetro (CR200, Minolta, Japón) basado en el sistema de color CIELAB y calibrado con una placa blanca. Las mediciones se hicieron en tres puntos equidistantes en el eje ecuatorial de la cáscara de cada fruto, y se registraron los valores de luminosidad ( $L^*$ ) y ángulo Hue ( $^\circ\text{Hue}$ ).

### Firmeza

La firmeza se evaluó con un penetrómetro digital (Chatillon DFE 100, AMETEK®, EUA) ajustado con una sonda cilíndrica de acero inoxidable de 11 mm de diámetro. La piel de la fruta se removió y el mesocarpio se penetró (5 mm de profundidad) en seis puntos distintos con una velocidad constante de 50 mm·min<sup>-1</sup>. Los resultados se expresaron en Newtons (N).

### Metabolismo oxidativo (actividad enzimática)

**Superóxido dismutasa (SOD, EC 1.15.1.1).** La actividad enzimática de la SOD se determinó conforme a lo reportado por López-López et al. (2018). Una muestra de tejido liofilizado de 0.5 g se homogenizó con 5 mL de amortiguador de fosfato de potasio 0.05 M (pH 7.5) + 1 mM de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) + 5 % de polivinilpirrolidona (PVP). La mezcla se centrifugó durante 15 min (17,200 g a 4 °C) y el sobrenadante se recuperó como extracto enzimático. La mezcla de reacción incluyó 1 µL de extracto enzimático más 199 µL de amortiguador de fosfato de potasio 0.1 M (pH 7.8) que contenía 0.025 % de Triton X-100, 0.01 M de metionina, 0.11 M de EDTA y 57 µM de cloruro denitro-azul de tetrazolio (NBT), más 50 µL de 20 µM de riboflavina (volumen final 250 µL). La absorbancia a 550 nm se registró antes y después de la exposición a la luz (25 W) durante 10 min, utilizando un lector de microplacas (The Synergy™ HT Multi-Detection, Bio-Tek®, EUA).

during 5 min were calculated based on its extinction coefficient ( $43 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) at 240 nm. The results are expressed in  $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$  protein.

**Ascorbate peroxidase (APX, EC 1.11.1.11).** The APX activity was determined using the same enzymatic extract obtained for CAT. The reaction mixture contained 969  $\mu\text{L}$  of 40 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) plus 5  $\mu\text{L}$  of 0.1 M ascorbic acid and 1  $\mu\text{L}$  of 0.1 M  $\text{H}_2\text{O}_2$  and 25  $\mu\text{L}$  enzymatic extract (López-López et al., 2018). The activity is expressed as  $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$  protein. The changes in ascorbic acid concentration were calculated based on its extinction coefficient ( $2.8 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) at 290 nm.

### Statistical analysis

Data were subjected to a two-way analysis of variance (ANOVA) using Stat-graphics Plus 5.1 software (Statistical Graphics, Rockville, MD). The effect of treatments (control,  $\text{HWT}_1$ ,  $\text{HWT}_2$  and  $\text{HWT}_1+\text{HWT}_2$ ) and days of storage (0, 15, 30, 30+4 and 30+8 days) were the factors analyzed. Significant differences ( $P \leq 0.05$ ) between means were established using Fisher's least significant difference (LSD) test. Unless another number is indicated, three replicates with five repetitions were used for the analysis.

## Results and discussion

### Chilling injury index

The application of HWT and storage time had a significant effect on the presence of CI symptoms like pitting, uneven color development and decay in "Tommy Atkins" mango (Figure 1). The application of  $\text{HWT}_1$ ,  $\text{HWT}_2$  or  $\text{HWT}_1 + \text{HWT}_2$  significantly reduced the susceptibility to CI compared with the control after 30 days at 5 °C (Figure 1a). When fruits were transferred at ripening, the presence of symptoms increased as the storage period progressed (30+8 days) (Figure 1b). Mangoes treated with  $\text{HWT}_2$  and  $\text{HWT}_1 + \text{HWT}_2$  resulted in a lower CII (1.72). When doing a linear regression analysis,  $\text{HWT}_2$  showed the lowest rate in the appearance of symptoms during storage at 5 °C (linear term coefficient of 0.053, coefficient of determination of  $R^2$  0.999), while  $\text{HWT}_1 + \text{HWT}_2$  presented this behavior during storage at 21 °C (linear term coefficient of 0.080, coefficient of determination of  $R^2$  0.955). This result is related to postharvest heat treatment, since it generates physiological and biochemical changes in the fruit. These changes are related to factors such as the type of heat treatment, the exposure time and the fruit genotype (Ummarat, Matsumoto, Wall, & Seraypheap, 2011).

The increase in CI tolerance favored by an individual short or long heat treatment has been previously

La actividad de la SOD se expresó en unidades de actividad enzimática por miligramo de proteína ( $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$  proteína). Una unidad de actividad SOD se definió como la cantidad de enzima que inhibiera el 50 % de la fotorreducción del NBT. Las proteínas se cuantificaron mediante el ensayo de Bradford (1976).

**Catalasa (CAT, EC 1.11.1.6).** Para analizar la actividad de la CAT se homogenizaron 0.5 g de tejido liofilizado con 5 mL de amortiguador de extracción (0.045 M de fosfato de potasio [pH 7.0] + 5 mM de ditioneol + 5 mM de EDTA + 0.125 g de polivinilpolipirrolidona). La mezcla se centrifugó a 17,200 g y 4 °C durante 30 min. El sobrenadante se recuperó como extracto enzimático. La actividad de la CAT se determinó midiendo la desaparición del peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (López-López et al., 2018). La mezcla de reacción contenía 1 mL de amortiguador de fosfato de potasio 0.04 M (pH 7.0), más 0.04 M de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y 25  $\mu\text{L}$  de extracto enzimático. Los cambios en la concentración del  $\text{H}_2\text{O}_2$  durante 5 min se calcularon a partir de su coeficiente de extinción ( $43 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) a 240 nm. Los resultados se expresaron en  $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$  proteína.

**Ascorbato peroxidasa (APX, EC 1.11.1.11).** La actividad de la APX se determinó utilizando el mismo extracto enzimático obtenido para la CAT. La mezcla de reacción contenía 969  $\mu\text{L}$  de amortiguador de fosfato de potasio 40 mM (pH 7.0), 5  $\mu\text{L}$  de ácido ascórbico 0.1 M, 1  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  0.1 M y 25  $\mu\text{L}$  de extracto enzimático (López-López et al., 2018). La actividad se expresó en  $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$  proteína. Los cambios en la concentración de ácido ascórbico se calcularon a partir de su coeficiente de extinción ( $2.8 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) a 290 nm.

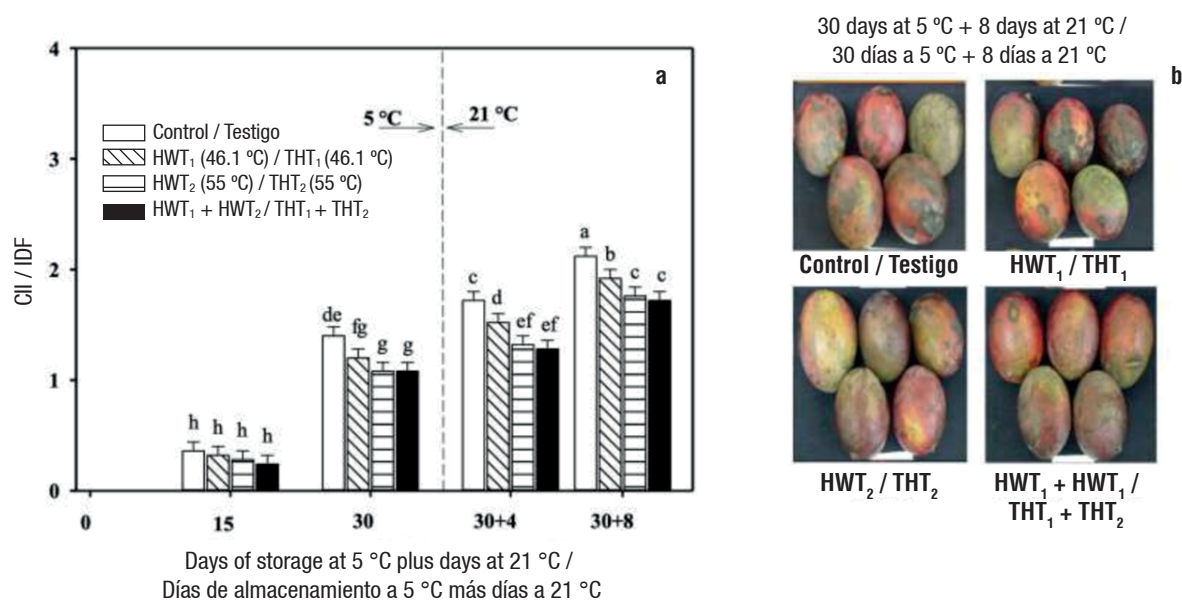
### Análisis estadístico

Los datos se sometieron a un análisis de varianza de dos vías utilizando el programa Stat-graphics Plus 5.1 (Statistical Graphics, Rockville, MD). El efecto de los tratamientos (testigo,  $\text{THT}_1$ ,  $\text{THT}_2$  y  $\text{THT}_1+\text{THT}_2$ ) y los días de almacenamiento (0, 15, 30, 30+4 y 30+8 días) fueron los factores analizados. Las diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) entre las medias se establecieron usando la prueba de diferencias mínimas significativas (DMS) de Fisher. A menos que otro número se indique, se utilizaron tres muestras con cinco repeticiones para el análisis.

## Resultados y discusión

### Índice de daño por frío

La aplicación de THT y el tiempo de almacenamiento tuvieron un efecto significativo en la presencia de síntomas de DF como picado, desarrollo irregular de color y descomposición en mangos "Tommy Atkins" (Figura 1). La aplicación de  $\text{THT}_1$ ,  $\text{THT}_2$  o  $\text{THT}_1 + \text{THT}_2$  redujo significativamente la susceptibilidad al DF en comparación con el testigo después de 30 días a 5 °C



**Figure 1. a) Chilling injury index (CII) of “Tommy Atkins” mango during storage at 5 °C plus 4 and 8 days at 21 °C, and b) representative images of mango from each treatment after 30 days at 5 °C plus 8 days at 21 °C. HWT = hot water treatments. Data are the mean of five replicates with Fisher’s least significant difference (LSD = 0.17) as vertical bars. Different letters show significant differences among treatments (Fisher,  $P < 0.05$ ).**

**Figura 1. a) Índice de daño por frío (IDF) de mango “Tommy Atkins” durante almacenamiento a 5 °C más 4 y 8 días a 21 °C y b) imágenes representativas de mangos de cada tratamiento después de 30 días a 5 °C más 8 días a 21 °C. THT = tratamientos hidrotérmicos. Los datos son la media de cinco muestras con la diferencia mínima significativa (DMS = 0.17) como barras verticales. Barras con letras iguales entre los tratamientos no difieren estadísticamente (Fisher,  $P < 0.05$ ).**

reported in “Tuu Shien” and ‘Keitt’ mango (Le et al., 2010; Díaz-Corona et al., 2020), “Hom Thong” banana (Ummarat et al., 2011) and “Hongyang” kiwifruit (Ma et al., 2014). Also, this tolerance was observed when sequential heat treatment was applied in “Frangi” papaya (Shadmani et al., 2015). The ability of HWT<sub>2</sub> and sequential treatment to reduce CII can be attributed to the maintenance of cell membrane integrity (less MDA content) and a reduction in membrane permeability (less EL; Figure 2a), as well as an increase in the enzymatic antioxidant system that protects cells from oxidative stress in fruit subjected to HWT<sub>1</sub> + HWT<sub>2</sub>.

Also, the reduction in CI susceptibility in HWT<sub>1</sub> fruit with respect to the control was related to higher enzymatic activity, but not to a reduction in cell membrane damage, since HWT<sub>1</sub> presented higher MDA and EL values than the control. Thus, the use of sequential heat stress allows a greater activation of the antioxidant system in the fruit, priming it for greater stress such as long-term cold stress (30 days at 5 °C).

#### Electrolyte leakage and malondialdehyde

The EL increased in different proportions during storage at 5 °C and room temperature for all treatments. At day 15, mango treated with HWT<sub>2</sub> and HWT<sub>1</sub> + HWT<sub>2</sub>

(Figura 1a). Cuando los frutos se llevaron a maduración, la presencia de síntomas aumentó a medida que avanzó el periodo de almacenamiento (30+8 días) (Figura 1b). Los mangos tratados con THT<sub>2</sub> y THT<sub>1</sub> + THT<sub>2</sub> presentaron un menor IDF (1.72). Al realizar un análisis de regresión lineal, el THT<sub>2</sub> mostró el menor índice en la aparición de síntomas durante el almacenamiento a 5 °C (coeficiente de término lineal de 0.053 y coeficiente de determinación de  $R^2$  de 0.999), mientras que el THT<sub>1</sub> + THT<sub>2</sub> presentó este comportamiento durante el almacenamiento a 21 °C (coeficiente de término lineal de 0.080 y coeficiente de determinación de  $R^2$  de 0.955). Este resultado está relacionado con el tratamiento hidrotérmico poscosecha, ya que genera cambios fisiológicos y bioquímicos en el fruto. Estos cambios están relacionados con factores como el tipo de tratamiento térmico, el tiempo de exposición y el genotipo del fruto (Ummarat, Matsumoto, Wall, & Seraypheap, 2011).

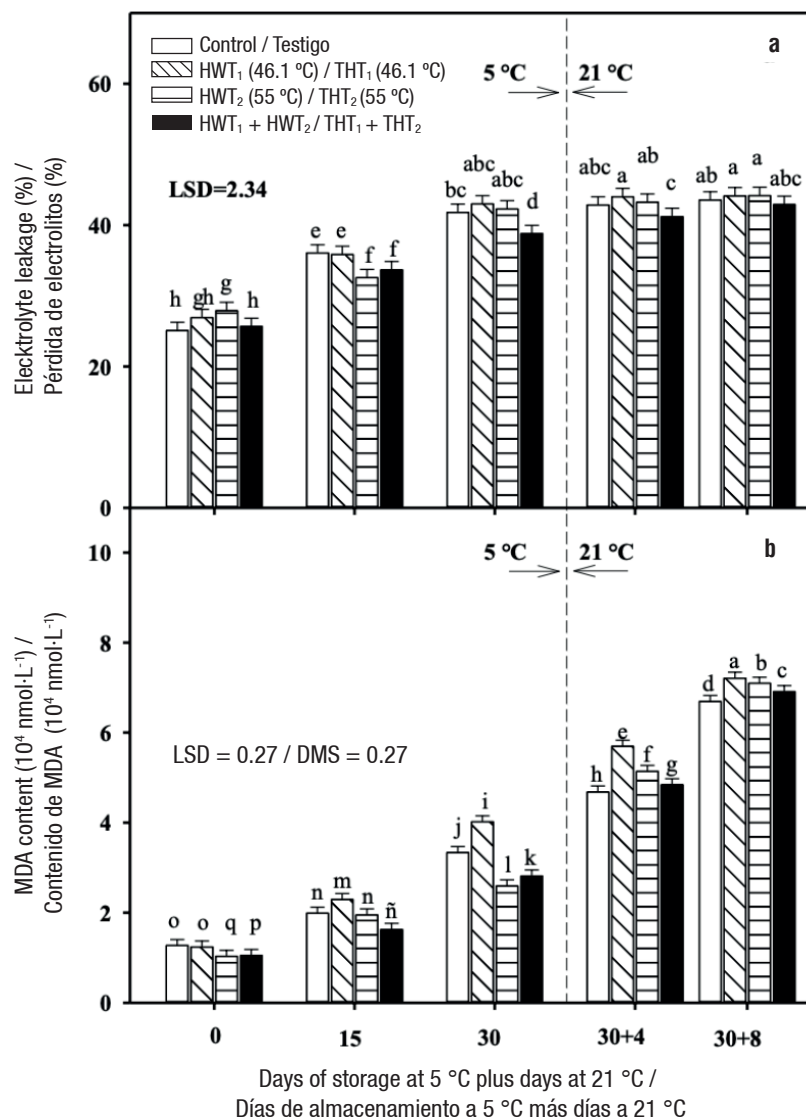
El aumento de la tolerancia al DF, favorecido por un tratamiento térmico individual corto o largo, se ha reportado previamente en mango “Tuu Shien” y “Keitt” (Le et al., 2010; Díaz-Corona et al., 2020), plátano “Hom Thong” (Ummarat et al., 2011) y kiwi “Hongyang” (Ma et al., 2014). También se observó esta tolerancia cuando se aplicó un tratamiento térmico secuencial en papaya



presented lower EL than HWT<sub>1</sub> and the control, while after 30 days of cold storage, only the HWT<sub>1</sub> + HWT<sub>2</sub> treatment maintained the lowest EL. However, during storage at 21 °C, all treatments presented similar EL (Figure 2a). In regression analysis at 5 °C, HWT<sub>1</sub> + HWT<sub>2</sub> showed the lowest rate of electrolyte release, obtaining a linear term coefficient of 0.437 (coefficient of determination of 0.983), while, contrary to what was observed in the analysis of variance at 21 °C, HWT<sub>1</sub> presented the lowest rate in EL (linear term coefficient of 0.141, coefficient of determination of R<sup>2</sup> 0.826).

“Frangi” (Shadmani et al., 2015). La capacidad del THT<sub>2</sub> y del tratamiento secuencial para reducir el IDF se puede atribuir al mantenimiento de la integridad de la membrana celular (menor contenido de MDA) y a una reducción de la permeabilidad de la membrana (menor PE; Figura 2a), así como a un aumento del sistema enzimático antioxidante que protege a las células del estrés oxidativo en los frutos sometidos a THT<sub>1</sub> + THT<sub>2</sub>.

La reducción de la susceptibilidad al DF en los frutos del THT<sub>1</sub> respecto al testigo se relacionó con una mayor



**Figure 2. a) Electrolyte leakage and b) malondialdehyde (MDA) content in “Tommy Atkins” mango during storage at 5 °C plus 4 and 8 days of ripening at 21 °C. HWT = hot water treatments. Data are the mean of five replicates with Fisher’s least significant difference (LSD = 0.17) as vertical bars. Different letters show significant differences among treatments (Fisher,  $P < 0.05$ ).**

**Figura 2. a) Pérdida de electrolitos y b) contenido de malodialdehído (MDA) en mango “Tommy Atkins” durante almacenamiento a 5 °C más 4 y 8 días de maduración a 21 °C. THT = tratamientos hidrotérmicos. Los datos son la media de cinco muestras con la diferencia mínima significativa (DMS = 0.17) como barras verticales. Barras con letras iguales entre los tratamientos no difieren estadísticamente (Fisher,  $P < 0.05$ ).**

On the other hand, MDA content increased with storage time at both storage temperatures (Figure 2b). Fruit treated with HWT<sub>2</sub> showed the lowest MDA content at the end of storage at 5 °C, followed by fruit of the sequential treatment, while the application of HWT<sub>1</sub> promoted a higher MDA content, even over the control. During ripening, fruit treated with different HWTs presented higher MDA content than the control, but the use of HWT<sub>1</sub> + HWT<sub>2</sub> allowed lower lipid peroxidation. Similar behavior was observed in linear regression analysis, as HWT<sub>2</sub> presented the lowest MDA production rate with a regression coefficient of 0.052 and coefficient of determination of R<sup>2</sup> 0.989 at 5 °C. On the other hand, at 21 °C, this analysis showed that HWT<sub>1</sub> presented the lowest MDA production rate with a regression coefficient of 0.398 and coefficient of determination of R<sup>2</sup> 0.999, which differs from the analysis of variance possibly due to variability in MDA production.

The abiotic stress produced by low temperatures promotes oxidative damage in fruit and fast senescence. Therefore, accumulation of reactive oxygen species (ROS) in cells due to stress can result in membrane deterioration and an increase in EL and MDA content (Nasef, 2018). The use of HWT<sub>2</sub> and HWT<sub>1</sub> + HWT<sub>2</sub> protected the cell membrane, reducing the levels of EL and MDA during cold storage. However, after removing from 5 °C, HWT fruit showed significant increases in these parameters. Similar results were previously reported in different fruits (pomegranate, mandarin, banana, and cucumber) treated with HW for a short time (40 to 55 °C, 4 to 10 min), where heat treatment reduced membrane damage (Mirdehghan et al., 2007; Ghasemnezhad et al., 2008; Ummarat et al., 2011; Nasef, 2018).

Nasef (2018) reported that heat treatment (55 °C for 5 min) alleviated CI in cucumbers due to a reduction in EL and retention of membrane integrity. Likewise, the behavior of the sequential treatment of the present study was similar to that of the combination of two HWTs (36.5 °C for 75 min plus 46.5 °C for 61 min) in “Tommy Atkins” mango stored at 4 and 9 °C, because the sequential heat treatment may delay ripening and softening, and thus reduce EL (Nyanjage et al., 1999). The individual application of heat treatments presented similar EL to the control. This increase in cell membrane permeability is attributed to the effects of heat stress, as it induces the activation of heat shock proteins, the arginine pathway, and glucose metabolism. Furthermore, it increases antioxidant enzymes and antioxidant compounds such as ascorbic acid and glutathione, which inhibit peroxidative damage (Zhang et al., 2019).

actividad enzimática, pero no con una reducción del daño en la membrana celular, ya que el THT<sub>1</sub> presentó valores de MDA y PE más elevados que el testigo. Así, el uso de estrés térmico secuencial permite una mayor activación del sistema antioxidante en el fruto, preparándolo para un estrés mayor como el causado por frío a largo plazo (30 días a 5 °C).

### Pérdida de electrolitos y malondialdehído

La PE aumentó en diferentes proporciones durante el almacenamiento a 5 °C y a temperatura ambiente en todos los tratamientos. En el día 15, el mango tratado con el THT<sub>2</sub> y THT<sub>1</sub> + THT<sub>2</sub> presentó menor PE que el THT<sub>1</sub> y el testigo, mientras que después de 30 días de almacenamiento en frío sólo el THT<sub>1</sub> + THT<sub>2</sub> mantuvo la menor PE. Sin embargo, durante el almacenamiento a 21 °C, todos los tratamientos presentaron una PE similar (Figura 2a). En el análisis de regresión a 5 °C, el THT<sub>1</sub> + THT<sub>2</sub> mostró la menor tasa de liberación de electrolitos, con un coeficiente de término lineal de 0.437 (coeficiente de determinación de 0.983). Por el contrario, en el análisis de varianza a 21 °C, el THT<sub>1</sub> presentó la menor tasa en la PE (coeficiente de término lineal de 0.141 y coeficiente de determinación R<sup>2</sup> de 0.826).

El contenido de MDA aumentó con el tiempo de almacenamiento en ambas temperaturas de almacenaje (Figura 2b). La fruta tratada con el THT<sub>2</sub> mostró el menor contenido de MDA al final del almacenamiento a 5 °C, seguida por la fruta del tratamiento secuencial, mientras que la aplicación del THT<sub>1</sub> promovió un mayor contenido de MDA, incluso por encima del testigo. Durante la maduración, los frutos tratados con los distintos THT presentaron un mayor contenido de MDA que el testigo, pero el uso del THT<sub>1</sub> + THT<sub>2</sub> permitió una menor peroxidación lipídica. Un comportamiento similar fue observado en el análisis de regresión lineal, ya que el THT<sub>2</sub> presentó la menor tasa de producción de MDA con un coeficiente de regresión de 0.052 y un coeficiente de determinación R<sup>2</sup> de 0.989 a 5 °C. Por otro lado, a 21 °C, este análisis mostró que el THT<sub>1</sub> presentó la tasa de producción de MDA más baja, con un coeficiente de regresión de 0.398 y un coeficiente de determinación R<sup>2</sup> de 0.999, lo cual difiere del análisis de varianza. Lo anterior debido, posiblemente, a la variabilidad en la producción de MDA.

El estrés abiótico producido por las bajas temperaturas promueve el daño oxidativo en el fruto y la senescencia rápida. Por lo tanto, la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ERO) en las células debida al estrés puede provocar el deterioro de la membrana y un aumento de la PE y del contenido de MDA (Nasef, 2018). El uso de

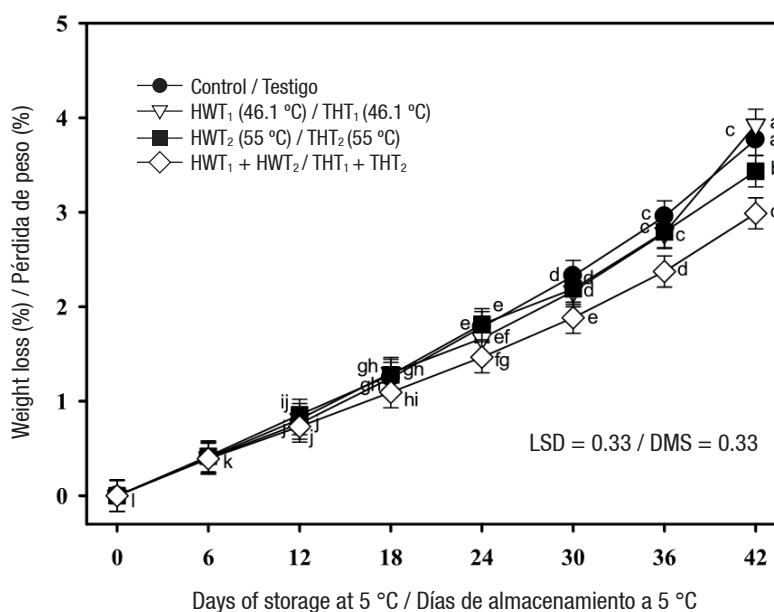
## Weight loss

All treatments presented an increase in WL during storage at 5 °C, reaching values ranging from 2.98 % for HWT<sub>1</sub> + HWT<sub>2</sub> up to 3.92 % for HWT<sub>1</sub> at the end of storage (Figure 3). Mango treated with a sequential treatment resulted in the lowest WL (2.98 %), showing significant differences ( $P < 0.05$ ) with the fruit of the other treatments after 36 days at 5 °C. Interestingly, HWT<sub>1</sub> and control fruit had similar values and resulted in the highest WL percentages. Likewise, this study revealed that HWT<sub>1</sub> + HWT<sub>2</sub> was more effective in reducing WL than the individual application of each heat treatment, which suggests that sequential heat treatment could reduce alterations in fruit peel, transpiration and respiration during cold storage, without inhibiting ripening when transferred to room temperatures (Shadmani et al., 2015).

The application of sequential heat treatment in mango could increase the barrier properties of cuticle and epicuticular wax, maintaining the integrity of the tissue (Shadmani et al., 2015). Contrary to these results, “Kensington” mango subjected to sequential treatment for a long time (vapor heat, 40 °C for 8 h plus HWT, 47 °C for 15 min) and stored at ripening temperature showed increased WL (2.29 %), a higher respiration rate, accelerated ripening (11.43 N in firmness, 13.92 °Brix, 0.96 titratable acidity), and increased transpiration and dehydration, compared to control fruit (Jacobi, Macrae, & Hetherington, 2000). On the other hand, Nasef (2018) reported that WL of cucumbers was affected by

THT<sub>2</sub> y THT<sub>1</sub> + THT<sub>2</sub> protegió a la membrana celular, con lo cual se redujeron los niveles de PE y MDA durante el almacenamiento en frío. Sin embargo, después de retirar de los 5 °C, la fruta del THT presentó incrementos significativos en dichos parámetros. Resultados similares fueron reportados con anterioridad en diferentes frutas (granada, mandarina, plátano y pepino) tratadas con THT durante un tiempo corto (40 a 55 °C, de 4 a 10 min), donde el tratamiento térmico redujo el daño de la membrana (Mirdehghan et al., 2007; Ghasemnezhad et al., 2008; Ummarat et al., 2011; Nasef, 2018).

Nasef (2018) señala que el tratamiento térmico (55 °C durante 5 min) disminuye el DF en pepinos debido a una reducción de la PE y a la conservación de la integridad de la membrana. Asimismo, el comportamiento del tratamiento secuencial del presente estudio fue similar al de la combinación de dos THT (36.5 °C durante 75 min más 46.5 °C durante 61 min) en mango “Tommy Atkins” almacenado a 4 y 9 °C (Nyanjage et al., 1999). Lo anterior debido a que el tratamiento térmico secuencial puede retrasar la maduración y el ablandamiento y, por tanto, reducir la PE. La aplicación individual de THT presentó una PE similar al testigo. Este incremento en la permeabilidad de la membrana celular se atribuye a los efectos del estrés térmico, ya que induce la activación de las proteínas de choque térmico, la vía de la arginina y el metabolismo de la glucosa. Además, aumenta las enzimas y los compuestos antioxidantes, como el ácido ascórbico y el glutatión, los cuales inhiben el daño peroxidativo (Zhang et al., 2019).



**Figure 3.** Weight loss of Tommy Atkins mango during storage at 5 °C. Data are the mean of nine replicates. Vertical bars represent Fisher's least significant difference (LSD) = 0.33.

**Figura 3.** Pérdida de peso de mango “Tommy Atkins” durante el almacenamiento a 5 °C. Los datos son la media de nueve muestras. Las barras verticales representan la diferencia mínima significativa (DMS) de Fisher = 0.33.

treatment temperature (45 or 55 °C for 5 min), storage period (7, 14, 21 days at 5 °C plus 2 and 4 days at 20 °C), and their interaction. The use of 55 °C for 5 min could increase the barrier functions of the cell membrane and cell wall, including during ripening. The use of quarantine treatment plus short-term heat treatment has not been previously reported.

### Color

Color parameters ( $L^*$  and Hue angle) are presented in Table 1. Fruit showed an initial bright red and green coloration with average values of 41.18 and 18.23 for  $L^*$  and °Hue, respectively. Storage time had a significant effect on loss of luminosity (-9.67 % on average), regardless of the treatment, which was maintained when the fruits were transferred to ripening at 21 °C in HWT<sub>1</sub> + HWT<sub>2</sub> and the control. HWT<sub>2</sub> showed the lowest reduction in  $L^*$  values after 30 days of cold storage, and after 8 days of ripening with respect to the other treatments. The treatments HWT<sub>1</sub> and HWT<sub>1</sub> + HWT<sub>2</sub> showed the highest loss in  $L^*$  values during cold storage (-13.91 %) and ripening (-16.51 %), respectively.

On the other hand, a significant reduction ( $P < 0.05$ ) in °Hue values was observed during cold storage in HWT<sub>1</sub> fruit, while the values in the other treatments remained nearly constant. After an additional 8 days at 21 °C, only the control presented a significant reduction in °Hue (-13.42 %). The HWT<sub>2</sub> and HWT<sub>1</sub> + HWT<sub>2</sub> preserved mango quality and maintained good appearance and color (luminosity and °Hue). This behavior can be associated with a reduction in CI symptoms and WL, stabilization of the cell membrane and a delay in ripening that in combination reduced the changes in peel color (López-López et al., 2018).

Similar results were previously observed in “Dahshan” cucumber, because the use of HWT for 5 min maintained a good color and appearance which was attributed to a delay in chlorophyll degradation by reduction of chlorophyll oxidase and peroxidase activities, induction of heat shock protein, stabilization of cellular membrane, and reduction of WL (Nasef, 2018). Likewise, the peel color index did not change significantly in mango immersed in heat treatments for a long time (75 min, 20 min) (Dea et al., 2010; Alwindia & Acda, 2015) or sequential heat treatment (3 min, plus 40 min) (Le et al., 2010), but they do when exposed to irradiation (Cruz, Soares, Fabbri, Cordenunsi, & Sabato, 2012).

### Firmness

In relation to firmness, all treatments presented a significant reduction during storage at 5 and 21 °C (Table 1). Initial firmness values ranged from 123 to

### Pérdida de peso

Todos los tratamientos presentaron un incremento en la PP durante el almacenamiento a 5 °C, alcanzando valores de 2.98 % (THT<sub>1</sub> + THT<sub>2</sub>) a 3.92 % (THT<sub>1</sub>) al final del almacenamiento (Figura 3). El mango tratado con un tratamiento secuencial presentó la menor PP (2.98 %), mostrando diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) con la fruta de los otros tratamientos después de 36 días a 5 °C. La fruta del THT<sub>1</sub> y el testigo tuvieron valores similares y produjeron los porcentajes más altos de PP. Asimismo, este estudio reveló que el THT<sub>1</sub> + THT<sub>2</sub> fue más eficaz en la reducción de la PP que la aplicación individual de cada tratamiento térmico, lo cual sugiere que el tratamiento térmico secuencial podría reducir las alteraciones en la piel del fruto, la transpiración y la respiración durante el almacenamiento en frío, sin inhibir la maduración cuando se transfiere a temperatura ambiente (Shadmani et al., 2015).

La aplicación del tratamiento térmico secuencial en mango podría aumentar las propiedades protectoras de la cutícula y la cera epicuticular, manteniendo la integridad del tejido (Shadmani et al., 2015). Contrario a estos resultados, el mango “Kensington” sometido a tratamiento secuencial por largo tiempo (calor de vapor a 40 °C por 8 h más THT a 47 °C por 15 min) y almacenado a temperatura de maduración presentó un incremento de PP (2.29 %), mayor tasa de respiración, maduración acelerada (11.43 N en firmeza, 13.92 °Brix y 0.96 acidez titulable) e incremento en transpiración y deshidratación, comparado con fruta testigo (Jacobi, Macrae, & Hetherington, 2000). Por otro lado, Nasef (2018) señala que la PP en pepinos se ve afectada por la temperatura del tratamiento (45 o 55 °C durante 5 min), el periodo de almacenamiento (7, 14 y 21 días a 5 °C, más 2 y 4 días a 20 °C) y su interacción. El uso de 55 °C durante 5 min podría potenciar las funciones de protección de la membrana y la pared celular, incluso durante la maduración. El uso de un tratamiento cuarentenario más un tratamiento térmico de corta duración no se había reportado anteriormente.

### Color

Los parámetros de color ( $L^*$  y ángulo Hue) se presentan en el Cuadro 1. La fruta mostró una coloración inicial rojo y verde brillante, con valores promedio de 41.18 y 18.23 para  $L^*$  y °Hue, respectivamente. El tiempo de almacenamiento tuvo un efecto significativo sobre la pérdida de luminosity (-9.67 % en promedio), sin distinción del tratamiento, la cual se mantuvo cuando los frutos se llevaron a maduración a 21 °C en THT<sub>1</sub> + THT<sub>2</sub> y el testigo. El THT<sub>2</sub> presentó la reducción más baja en los valores de  $L^*$  después de 30 días de almacenamiento frío, así como después de 8 días de maduración con respecto a otros tratamientos.

**Table 1. Effect of the individual and sequential application of two different hot water conditions on luminosity, hue angle and firmness during storage of “Tommy Atkins” mango.**

**Cuadro 1. Efecto de la aplicación individual y secuencial de dos condiciones de tratamiento térmico sobre la luminosidad, el ángulo Hue y la firmeza durante el almacenamiento de mango “Tommy Atkins”.**

Treatments/Tratamientos	Days of storage at 5 °C + days at 21 °C / Días de almacenamiento a 5 °C + días a 21 °C		
	0	30+0	30+8
<b>Luminosity / Luminosidad</b>			
Control/Testigo	41.18 ± 0.46 aB	36.84 ± 1.24 bB	34.74 ± 0.97 cC
HWT <sub>1</sub> /THT <sub>1</sub>	42.41 ± 1.02 aA	36.51 ± 0.09 bB	36.95 ± 0.86 bB
HWT <sub>2</sub> /THT <sub>2</sub>	40.62 ± 0.54 aB	39.22 ± 1.04 bA	38.66 ± 1.01 bA
HWT <sub>1</sub> + HWT <sub>2</sub> /THT <sub>1</sub> + THT <sub>2</sub>	43.06 ± 1.00 aA	38.40 ± 0.35 bA	35.95 ± 0.26 cBC
<b>Hue angle / Ángulo Hue</b>			
Control/Testigo	18.23 ± 1.70 aB	17.28 ± 0.82 aB	14.96 ± 1.04 bC
HWT <sub>1</sub> /THT <sub>1</sub>	18.81 ± 1.45 aAB	17.33 ± 0.23 bB	17.01 ± 0.80 bB
HWT <sub>2</sub> /THT <sub>2</sub>	19.85 ± 0.71 aA	18.98 ± 1.07 aA	19.18 ± 0.96 aA
HWT <sub>1</sub> + HWT <sub>2</sub> /THT <sub>1</sub> + THT <sub>2</sub>	18.90 ± 0.89 aAB	18.28 ± 1.01 aAB	17.36 ± 1.69 aB
<b>Firmness (N) / Firmeza (N)</b>			
Control/Testigo	135.68 ± 3.75 aAB	112.95 ± 3.24 bA	29.70 ± 3.99 cC
HWT <sub>1</sub> /THT <sub>1</sub>	137.08 ± 4.18 aA	104.07 ± 4.66 bB	29.33 ± 0.87 cC
HWT <sub>2</sub> /THT <sub>2</sub>	133.60 ± 6.98 aB	101.80 ± 4.78 bB	47.52 ± 2.70 cA
HWT <sub>1</sub> + HWT <sub>2</sub> /THT <sub>1</sub> + THT <sub>2</sub>	123.53 ± 4.72 aC	97.67 ± 3.17 bC	37.27 ± 1.96 cB

For each parameter, different letters (a, b, c) in the same row (days of storage for each treatment) and different letters in the same column (A, B, C) (treatments in the same day) represent statistical differences according to Fisher's least significant difference (LSD) test ( $P < 0.05$ ). Values are the mean ± standard deviation. HWT<sub>1</sub> = hot water treatment (46.1 °C, 75 min); HWT<sub>2</sub> = hot water treatment (55 °C, 5min); HWT<sub>1</sub> + HWT<sub>2</sub> (same conditions, sequentially applied). 30+0 = 30 days of storage at 5 °C + 0 days at 21 °C, 30+8 = 30 days of storage at 5 °C + 8 days at 21 °C.

Para cada parámetro, las medias con letras iguales (a, b, c) en la misma fila (días de almacenamiento para cada tratamiento), así como las iguales en la misma columna (A, B, C) (tratamientos en el mismo día), no difieren estadísticamente según la prueba de diferencia mínima significativa (DMS) de Fisher ( $P < 0.05$ ). Los valores son la media ± desviación estándar. THT<sub>1</sub> = tratamiento hidrotérmico (46.1 °C por 75 min), THT<sub>2</sub> = tratamiento hidrotérmico (55 °C por 5 min), THT<sub>1</sub> + THT<sub>2</sub> (mismas condiciones aplicadas secuencialmente). 30+0 = 30 días de almacenamiento a 5 °C + 0 días a 21 °C, 30+8 = 30 días de almacenamiento a 5 °C + 8 días a 21 °C.

137 N, and after 30 days of cold storage varied from 112.95 to 97.67 N. Interestingly, control fruit showed the lowest decrease in firmness (-16.75 %). The application of HWT<sub>1</sub> in mango promoted the highest loss of firmness (-24.08 %), followed by HWT<sub>2</sub> (-23.80 %) and the sequential treatment (-20.93 %). However, when the fruits were transferred to ripening, those of HWT<sub>2</sub> showed the lowest loss of firmness, followed by HWT<sub>1</sub>+HWT<sub>2</sub>, while the control and HWT<sub>1</sub> fruits showed higher loss of firmness without significant differences ( $P > 0.05$ ) between them.

The use of HWT<sub>1</sub> + HWT<sub>2</sub> caused a significant reduction in firmness compared with the treatments separately at the beginning of the study, which could be due to an increase in respiration rate and ethylene synthesis that cause degradation of starch into sugars, or to an activation of degradative enzymes that affect the cell wall (Hossain, Rana, Kimura, & Roslan,

Los tratamientos THT<sub>1</sub> y THT<sub>1</sub> + THT<sub>2</sub> presentaron las pérdidas más altas en los valores de L\* durante el almacenamiento frío (-13.91 %) y la maduración (-16.51 %), respectivamente.

Por otro lado, se observó una reducción significativa ( $P < 0.05$ ) en los valores del °Hue durante el almacenamiento en frío en la fruta del THT<sub>1</sub>, mientras que los valores en los otros tratamientos permanecieron prácticamente constantes. Después de 8 días adicionales a 21 °C, sólo el testigo presentó una reducción significativa del °Hue (-13.42 %). El THT<sub>2</sub> y el THT<sub>1</sub> + THT<sub>2</sub> preservaron la calidad del mango, y mantuvieron buena apariencia y color (luminosidad y °Hue). Este comportamiento se puede asociar a una reducción de los síntomas del IDF y de la PP, a la estabilización de la membrana celular y a un retraso en la maduración, lo cual redujo los cambios en el color de la piel (López-López et al., 2018).

2014). Although the HWT<sub>1</sub> + HWT<sub>2</sub> treatment had the lowest firmness values at the end of the storage period at 5 °C, it also presented the least change with respect to the initial day. Therefore, when sequential heat treatment is combined with storage at cold temperatures, cell wall degradation is reduced. According to Mirdehghan et al. (2007), a double stress could cause less depolymerization and solubilization of pectic substances (polyuronide) leading to reduce soluble pectin and ripening, as well as a decrease in the compression strength and enzymatic activity maintaining cell integrity and lower loss of firmness and cell decay (Le et al., 2010; Mahto & Das, 2013).

During ripening, the immersion of fruit in HWT<sub>2</sub> reduced softening at day 30 at 5 °C plus 8 days at 21 °C, which could be associated with the short immersion time that had no effect on the activity of the enzymes polygalacturonase and β-galactosidase (Chávez-Sánchez, Carrillo-López, Vega-García, & Yahia, 2013). Similar results with sequential treatments were reported by Jacobi et al. (2000) in “Tuu Shein” mango treated with hot air for 8 h plus HW for 15 min, and Le et al. (2010) in mango treated with HW plus vapor heat for 40 min, where the authors observed reduced softening due to less cell wall degradation and changes in soluble pectin content.

#### Oxidative metabolism (enzymatic activity)

SOD activity increased for all treatments during storage at 5 °C. At day 30, the sequential treatment showed the highest activity followed by HWT<sub>1</sub>, while HWT<sub>2</sub> and the control showed lower SOD activity without significant differences ( $P > 0.05$ ) between them (Figure 4a). At day 30+8, all treatments presented a significant reduction in SOD activity; however, HWT<sub>1</sub> + HWT<sub>2</sub> maintained the highest activity with significant differences with respect to the other treatments. SOD enzyme contributes in the initial step of eliminating ROS and catalyzes the transformation of superoxide ion ( $O_2^-$ ) to  $H_2O_2$  (Alscher, Erturk, & Heat, 2002; Soleimani-Aghdam, Jannatizadeh, Sheikh-Assadi, & Malekzadeh, 2016). In this study, the application of HW for a long time (HWT<sub>1</sub> and HWT<sub>1</sub> + HWT<sub>2</sub>) enhanced SOD activity, however, the sequential treatment presented higher activity at both storage temperatures (5 and 21 °C).

The HWT<sub>2</sub> did not show any effect on SOD activity due to low membrane damage and reduced ROS content. These results suggest that the effect of HWT<sub>1</sub> + HWT<sub>2</sub> on the reduction of CI can be associated with an increase in SOD activity which prevented the accumulation of  $O_2^-$  and therefore oxidative damage, decreasing EL and MDA content during cold storage. No significant differences were observed in SOD activity between HWT<sub>2</sub> and control fruit. Contrary to

Se observaron resultados similares en pepino “Dahshan”, ya que el uso de THT durante 5 min mantuvo buen color y buena apariencia, lo cual se atribuye a un retraso en la degradación de la clorofila por la reducción de las actividades de la clorofila oxidasa y peroxidasa, inducción de la proteína de choque térmico, estabilización de la membrana celular y reducción de la PP (Nasef, 2018). Asimismo, el índice de color de la cáscara no cambió significativamente en mango sumergido en tratamientos con calor durante un tiempo prolongado (75 min y 20 min) (Dea et al., 2010; Alwindia & Acda, 2015) o tratamiento con calor secuencial (3 min más 40 min) (Le et al., 2010), pero sí lo hacen cuando los frutos son expuestos a irradiación (Cruz, Soares, Fabbri, Cordenunsi, & Sabato, 2012).

#### Firmeza

Respecto a la firmeza, todos los tratamientos presentaron una reducción significativa durante el almacenamiento a 5 y 21 °C (Cuadro 1). Los valores iniciales de firmeza variaron de 123 a 137 N, y después de 30 días de almacenamiento en frío variaron de 112.95 a 97.67 N. La fruta testigo mostró la menor disminución de firmeza (-16.75 %). La aplicación del THT<sub>1</sub> promovió la mayor pérdida de firmeza (-24.08 %), seguido del THT<sub>2</sub> (-23.80 %) y el tratamiento secuencial (-20.93 %). Sin embargo, cuando los frutos se transfirieron a maduración, los del THT<sub>2</sub> mostraron la menor pérdida de firmeza, seguidos por los de THT<sub>1</sub> + THT<sub>2</sub>, mientras que los frutos testigo y del THT<sub>1</sub> mostraron mayor pérdida de firmeza sin diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) entre ellos.

El uso del THT<sub>1</sub> + THT<sub>2</sub> originó una reducción significativa de la firmeza en comparación con los tratamientos por separado al inicio del estudio, lo cual se podría deber a un aumento de la tasa de respiración y de la síntesis de etileno que provocan la degradación del almidón en azúcares, o a una activación de las enzimas degradativas que afectan a la pared celular (Hossain, Rana, Kimura, & Roslan, 2014). Aunque el THT<sub>1</sub> + THT<sub>2</sub> presentó los valores de firmeza más bajos al final del periodo de almacenamiento a 5 °C, también presentó el menor cambio con respecto al día inicial. Por lo tanto, cuando se combina el tratamiento térmico secuencial con el almacenamiento a temperaturas frías, la degradación de la pared celular se reduce. De acuerdo con Mirdehghan et al. (2007), un doble estrés podría causar una menor despolimerización y solubilización de las sustancias pécticas (poliuronido), lo cual llevaría a una reducción de la pectina soluble y de la maduración, así como a una disminución de la fuerza de compresión y de la actividad enzimática, lo que mantendría la integridad celular, y reducir la pérdida de firmeza y la descomposición celular (Le et al., 2010; Mahto & Das, 2013).

this result, Fogelman, Kaplan, Tanami, and Ginzberg (2011) and Wang et al. (2016) reported that the increase in SOD activity in “Hami” melon was due to the effect of immersion in HW at 59 °C for 30 s plus 55 °C for 3 min; however, SOD activity did not have an effect on CI reduction, since it increased the content of  $O_2^-$  and  $H_2O_2$  which led to lipid peroxidation and membrane damages.

On the other hand, the results obtained in this study were similar to those reported by López-López et al. (2018) in “Keitt” mango immersed in quarantine treatment and stored at 5 °C, since an increase in

Durante la maduración, la inmersión de la fruta en el THT<sub>2</sub> redujo el ablandamiento al día 30 a 5 °C más 8 días a 21 °C, lo cual se podría deber a que el corto tiempo de inmersión no tuvo efecto sobre la actividad de las enzimas poligalacturonasa y  $\beta$ -galactosidasa (Chávez-Sánchez, Carrillo-López, Vega-García, & Yahia, 2013). Resultados similares con tratamientos secuenciales fueron reportados por Jacobi et al. (2000) en mango “Tuu Shein” tratado con aire caliente por 8 h más THT por 15 min, y Le et al. (2010) en mango tratado con THT más vapor de calor por 40 min, donde observaron un ablandamiento reducido debido a una menor degradación de la pared celular y cambios en el contenido de pectina soluble.

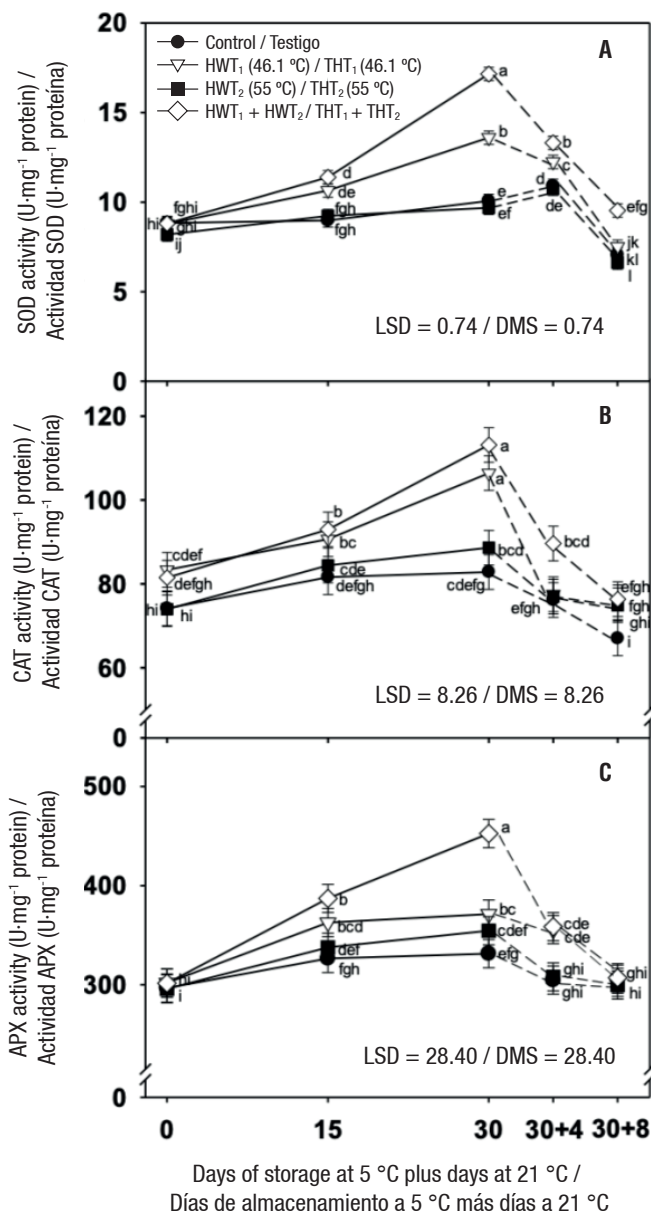


Figure 4. Antioxidant enzymatic activity in mango “Tommy Atkins” during storage at 5 °C (continuous lines) plus 4 and 8 days at 21 °C (dotted lines): a) superoxidase dismutase (SOD), b) catalase (CAT), and c) ascorbate peroxidase (APX). Data are the mean of five replicates with Fisher’s least significant difference (LSD) as vertical bars.

Figura 4. Actividad enzimática antioxidante en mango “Tommy Atkins” durante almacenamiento a 5 °C (líneas continuas) más 4 y 8 días a 21 °C (líneas punteadas): a) superóxido dismutasa (SOD), b) catalasa (CAT) y c) ascorbato peroxidasa (APX). Los datos son la media de cinco muestras con la diferencia mínima significativa (DMS) como barras verticales.

SOD activity was related to CI tolerance and reduced membrane damage. Moreover, the use of sequential HWT (42 °C for 30 min plus 49 °C for 20 min) in “Frangi” papaya did not significantly increase SOD activity during storage at 6 °C; therefore, it did not correlate with CI tolerance (Shadmani et al., 2015). This is contrary to our results with sequential treatment, and can be associated with the differences in exposure time at both temperatures.

In a similar mode, HWT<sub>1</sub> + HWT<sub>2</sub> and HWT<sub>1</sub> presented higher CAT activities during cold storage, showing increases of 38.80 and 27.67 %, respectively, at day 30 (Figure 4b). HWT<sub>2</sub> and the control showed lower activity (19.80 and 11.68 %, respectively). When the fruits were transferred at 21 °C, those treated with HWT<sub>1</sub> had the maximum reduction in CAT activity at day 30+4, while the fruit treated with HWT<sub>1</sub> + HWT<sub>2</sub> maintained the highest activity with significant differences with respect to the other treatments. At the end of ripening storage, CAT activity was reduced in all treatments and no significant differences were observed among them. CAT reduces H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to water and oxygen, protecting the cell membrane of oxidative damage (Nasef, 2018).

CAT activity showed similar behavior to SOD activity. HWT<sub>1</sub> and HWT<sub>1</sub> + HWT<sub>2</sub> treatments presented a significant increase in CAT activity at the end of storage at 5 °C; the quarantine treatment can induce oxidative stress, but it also induces oxidative stress defense (López-López et al., 2018). HWT<sub>2</sub> induced minimum CAT activity, similar to the control, but with the difference that HWT<sub>2</sub> reduces membrane damage and ROS production. During ripening, the increase in CI symptoms was associated with reduced CAT activity and accumulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a molecule that easily passes through the cell membrane and reacts with intracellular metal ions, producing hydroxyl radicals that cause damage in protein and DNA structure and also loss of membrane integrity (Sala & Lafuente, 2000).

HWT<sub>1</sub> + HWT<sub>2</sub> maintained the highest activity during the first four days at ripening as observed for SOD activity. Both enzymes help to reduce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and O<sub>2</sub><sup>-</sup> production limiting hydroxyl radical intracellular and CI symptoms. In agreement with this, different authors indicate that heat treatment increases CAT activity and reduces the accumulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> protecting the cell from damage and CI symptoms, with even CAT presenting higher antioxidant effect than APX, an enzyme that competes for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> during cold storage (Fogelman et al., 2011; Nasef, 2018). On the other hand, Shadmani et al. (2015) report that sequential HW in papaya promoted less CAT activity than the control at 6 °C, especially after two weeks. They observed that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in control fruit was correlated with higher CAT activity, and hence, it was not observed

### Metabolismo oxidativo (actividad enzimática)

La actividad de la SOD aumentó en todos los tratamientos durante el almacenamiento a 5 °C. En el día 30, el tratamiento secuencial mostró la actividad más alta, seguido del THT<sub>1</sub>, mientras que el THT<sub>2</sub> y el testigo mostraron una menor actividad de la SOD sin diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) entre ellos (Figura 4a). En el día 30+8, todos los tratamientos presentaron una reducción significativa de la SOD; sin embargo, el THT<sub>1</sub> + THT<sub>2</sub> mantuvo la actividad más alta con diferencias significativas respecto a los otros tratamientos. La enzima SOD contribuye en la etapa inicial de la eliminación de las ERO y cataliza la transformación del ion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Alscher, Erturk, & Heat, 2002; Soleimani-Aghdam, Jannatizadeh, Sheikh-Assadi, & Malekzadeh, 2016). En este estudio, la aplicación de THT durante un tiempo prolongado (THT<sub>1</sub> y THT<sub>1</sub> + THT<sub>2</sub>) mejoró la actividad de la SOD; no obstante, el tratamiento secuencial presentó una mayor actividad en ambas temperaturas de almacenamiento (5 y 21 °C).

El THT<sub>2</sub> no mostró ningún efecto sobre la actividad de la SOD debido al bajo daño de la membrana y a la reducción del contenido de ERO. Estos resultados sugieren que el efecto del THT<sub>1</sub> + THT<sub>2</sub> sobre la reducción del DF puede estar asociado a un incremento de la SOD, el cual impidió la acumulación de O<sub>2</sub><sup>-</sup> y, por tanto, el daño oxidativo, disminuyendo la PE y el contenido de MDA durante el almacenamiento en frío. No se observaron diferencias significativas en la actividad de la SOD entre la fruta del THT<sub>2</sub> y el testigo. Por el contrario, Fogelman, Kaplan, Tanami, y Ginzberg (2011) y Wang et al. (2016) señalan que el aumento de la actividad de la SOD en melón “Hami” se debió al efecto del THT a 59 °C durante 30 s más 55 °C durante 3 min; sin embargo, la actividad de la SOD no tuvo efecto sobre la reducción del IDF, ya que aumentó el contenido de O<sub>2</sub><sup>-</sup> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, lo cual provocó peroxidación lipídica y daños en las membranas.

Los resultados obtenidos en este estudio fueron similares a los reportados por López-López et al. (2018) en mango “Keitt” sumergido en tratamiento cuarentenario y almacenado a 5 °C, ya que un incremento en la actividad de la SOD se relacionó con la tolerancia al DF y a la reducción del daño de la membrana. Además, el uso de THT secuencial (42 °C durante 30 min más 49 °C durante 20 min) en papaya “Frangi” no aumentó significativamente la actividad de la SOD durante el almacenamiento a 6 °C; por lo tanto, no se correlacionó con la tolerancia al DF (Shadmani et al., 2015). Esto es contrario a nuestros resultados con el tratamiento secuencial, y puede estar asociado con las diferencias en el tiempo de exposición a ambas temperaturas.



that higher CAT activity correlated with CI tolerance in HWT fruit (Shadmani et al., 2015).

Regarding APX activity, this increased during cold storage in fruit with different HWTs, while control fruit did not show significant changes (Figure 4c). After 30 days at 5 °C, sequential treatment presented higher APX activity with significant differences with respect to HWT<sub>2</sub> and the control. After 4 days at 21 °C, APX activity was reduced for all HWTs, but HWT<sub>1</sub> + HWT<sub>2</sub> maintained the highest values with respect to the other treatments. After 8 days at 21 °C, no significant differences in APX activity were observed between the control and all HWTs. In this work, the use of different HWTs increased APX activity, especially at the end of storage at 5 °C. During ripening, all treatments reduced APX activity in a similar way to the other enzymes (SOD and CAT), showing the highest activity with the sequential treatment.

Chongchatuporn et al. (2013) indicate that a reduction in CI susceptibility is related to a reduction in ROS and an increase in CAT and APX activities during cold storage. Similar results were previously observed in strawberry (Vicente, Martínez, Chaves, & Civello, 2006), broccoli (Zhang et al., 2009), banana (Ummarat et al., 2011), and mango (López-López et al., 2018), where a higher transcription and activity of APX were observed with respect to the control, reducing ROS accumulation and cell damage and increasing CI tolerance. A coordinated increase in the activities of antioxidant enzymes such as SOD, CAT, and APX promoted by sequential treatment is very important for scavenging ROS to protect the cell membrane, to induce CI tolerance and to maintain quality during cold storage.

Thus, the use of heat treatment for balance between antioxidant enzymes is critical for cell survival during cold stress (Zhang et al., 2013; López-López et al., 2018). It is important to highlight that the observed effect for sequential treatment (quarantine plus short-term) has not been previously reported for SOD, CAT and APX activities and CI tolerance in mango.

## Conclusions

The application of hot water treatment previous to cold storage reduced chilling injury susceptibility in “Tommy Atkins” mango, especially in those treated with HWT<sub>2</sub> (55 °C for 5 min) and in those with HWT<sub>1</sub> + HWT<sub>2</sub> (46.1 °C for 75 min plus 55 °C for 5 min) during ripening. HWT<sub>1</sub> + HWT<sub>2</sub> reduced EL, MDA and WL at 5 °C and activated the antioxidant system by increasing SOD, CAT and APX activities. HWT<sub>2</sub> maintained color and firmness the best, followed by the sequential

Los tratamientos THT<sub>1</sub> + THT<sub>2</sub> y THT<sub>1</sub> presentaron una mayor actividad de la CAT durante el almacenamiento en frío al mostrar incrementos de 38.80 y 27.67 %, respectivamente, en el día 30 (Figura 4b), mientras que el THT<sub>2</sub> y el testigo mostraron una menor actividad (19.80 y 11.68 %, respectivamente). Cuando los frutos se transfirieron a 21 °C, los tratados con THT<sub>1</sub> presentaron la máxima reducción de la actividad de la CAT en el día 30+4, mientras que los tratados con THT<sub>1</sub> + THT<sub>2</sub> mantuvieron la actividad más alta con diferencias significativas respecto a los otros tratamientos. Al final del almacenamiento de maduración, la actividad de la CAT se redujo en todos los tratamientos, y no se observaron diferencias significativas entre ellos. La CAT reduce el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a agua y oxígeno, con lo cual protege a la membrana celular del daño oxidativo (Nasef, 2018).

La actividad de la CAT mostró un comportamiento similar a la actividad SOD. El THT<sub>1</sub> y THT<sub>1</sub> + THT<sub>2</sub> presentaron un aumento significativo de la actividad de la CAT al final del almacenamiento a 5 °C. El tratamiento cuarentenario puede inducir estrés oxidativo, pero también induce defensas frente al estrés oxidativo (López-López et al., 2018). El THT<sub>2</sub> indujo una actividad CAT mínima, similar al testigo, pero con la diferencia de que el THT<sub>2</sub> reduce el daño de la membrana y la producción de ERO. Durante la maduración, el aumento de los síntomas de DF se asoció con la reducción de la CAT y la acumulación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, una molécula que permea fácilmente la membrana celular y reacciona con los iones metálicos intracelulares, lo cual produce radicales de hidroxilo que causan daños en la estructura de las proteínas y el ADN, así como pérdida de la integridad de la membrana (Sala & Lafuente, 2000).

El THT<sub>1</sub> + THT<sub>2</sub> mantuvo la actividad enzimática más alta durante los primeros cuatro días de maduración, tal y como se observó para la actividad de la SOD. La CAT y la SOD ayudan a reducir la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y O<sub>2</sub><sup>-</sup> al limitar el radical hidroxilo intracelular y los síntomas de DF. En concordancia con lo anterior, diversos autores indican que el tratamiento térmico incrementa la actividad de la CAT y reduce la acumulación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> protegiendo a la célula de daños y síntomas de DF. La CAT presentó un mayor efecto antioxidante que la APX, enzima que compite por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante el almacenamiento en frío (Fogelman et al., 2011; Nasef, 2018). Shadmani et al. (2015) informan que el THT secuencial en papaya promovió menos actividad CAT que el testigo a 6 °C, especialmente después de dos semanas. Además, observaron que la acumulación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la fruta testigo estaba correlacionada con una actividad CAT más alta y, por lo tanto, no se observó que una mayor actividad CAT se correlacionara con la tolerancia al DF en la fruta de THT (Shadmani et al., 2015).

treatment. The combination of a quarantine treatment and a short-term heat treatment can be a useful alternative to maintain postharvest quality during storage and distribution of “Tommy Atkins” mango, complying with the pest control regulations required by USDA-APHIS (2014) and providing CI tolerance, which would facilitate its marketing to distant places. In addition, it would be interesting to try it on other cultivars susceptible to low temperatures and check its effectiveness.

#### End of English version

### References / Referencias

- Alscher, R. G., Erturk, N., & Heath, L. S. (2002). Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*, 53(372), 1331-1341. doi: 10.1093/jexbot/53.372.1331
- Almeida-Miguel, A. C., Durigan, J. F., Magalhaes-Marques, K., Ascari-Morgado, C. M., & Ferraudo, A. S. (2016). Prevention of chilling injury in ‘Tommy Atkins’ mangoes previously stored at 5 °C, using heat treatment and radiation UV (UV-C). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 38, 053-063. doi: 10.1590/0100-2945-123/14
- Alvandia, D. G., & Acda, M. A. (2015). Revisiting the efficacy of hot water treatment in managing anthracnose and stem-end rot diseases of mango cv. ‘Carabao’. *Crop Protection*, 67, 96-101. doi: 10.1016/j.cropro.2014.09.016
- Barman, K., Asrey, R., Pal, R. K., Jha, S. K., & Bhatia, K. (2014). Post-harvest nitric oxide treatment reduces chilling injury and enhances the shelf-life of mango (*Mangifera indica* L.) fruit during low-temperature storage. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 89(3), 253-260. doi: 10.1080/14620316.2014.11513076
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Chávez-Sánchez, I., Carrillo-López, A., Vega-García, M., & Yahia, E. M. (2013). The effect of antifungal hot-water treatments on papaya postharvest quality and activity of pectinmethylesterase and polygalacturonase. *Journal Food Science and Technology*, 50, 101-107. doi: 10.1007/s13197-011-0228-0
- Chongchatuporn, U., Ketsa, S., & van Doorn, W. G. (2013). Chilling injury in mango (*Mangifera indica*) fruit peel: Relationship with ascorbic acid concentrations and antioxidant enzyme activities. *Postharvest Biology and Technology*, 86, 409-417. doi: 10.1016/j.postharvbio.2013.07.023
- Concellón, A., Zaro, M. J., Chaves, A. R., & Vicente, A. R. (2012). Changes in quality and phenolic antioxidants in dark purple American eggplant (*Solanum melongena* L. cv. Lucía) as affected by storage at 0 °C and 10 °C. *Postharvest Biology and Technology*, 66, 35-41. doi: 10.1016/j.postharvbio.2011.12.003
- En cuanto a la actividad de la APX, ésta aumentó durante el almacenamiento en frío en los frutos con diferentes THT, mientras que los frutos testigo no mostraron cambios significativos (Figura 4c). Después de 30 días a 5 °C, el tratamiento secuencial presentó mayor actividad APX, con diferencias significativas respecto al THT<sub>2</sub> y el testigo. Después de 4 días a 21 °C, la actividad de la APX se redujo en todos los THT, pero el THT<sub>1</sub> + THT<sub>2</sub> mantuvo los valores más altos con respecto a los otros tratamientos. Después de 8 días a 21 °C, no se observaron diferencias significativas en la actividad de dicha enzima entre el testigo y todos los THT. En este trabajo, el uso de diferentes THT incrementó la actividad de la APX, especialmente al final del almacenamiento a 5 °C. Durante la maduración, todos los tratamientos redujeron la actividad de la APX de forma similar a las otras enzimas (SOD y CAT), al presentar la mayor actividad con el tratamiento secuencial.
- Chongchatuporn et al. (2013) indican que una reducción de la susceptibilidad al DF está relacionada con una reducción de ERO y un incremento de las actividades de la CAT y la APX durante el almacenamiento en frío. Se han observado resultados similares en fresa (Vicente, Martínez, Chaves, & Civello, 2006), brócoli (Zhang et al., 2009), plátano (Ummarat et al., 2011) y mango (López-López et al., 2018), donde hubo una mayor transcripción y actividad de la APX respecto al testigo, reducción de la acumulación de ERO y el daño celular, así como aumento de la tolerancia al DF. Un aumento sincronizado de las actividades de enzimas antioxidantes como SOD, CAT y APX, promovido por el tratamiento secuencial, es muy importante para la eliminación de ERO con el fin de proteger la membrana celular, inducir la tolerancia al DF y mantener la calidad durante el almacenamiento en frío.
- Por lo tanto, el uso de tratamientos térmicos para el equilibrio entre las enzimas antioxidantes es crítico para la supervivencia celular durante el estrés por frío (Zhang et al., 2013; López-López et al., 2018). Es importante destacar que el efecto observado en el tratamiento secuencial (cuarentena más corto plazo) no ha sido reportado previamente para las actividades de la SOD, la CAT, la APX y la tolerancia al DF en mango.

### Conclusiones

La aplicación de tratamientos térmicos, previo al almacenamiento en frío, redujo la susceptibilidad al daño por frío en mango “Tommy Atkins”, especialmente en aquellos tratados con THT<sub>2</sub> (55 °C por 5 min) y en aquellos con THT<sub>1</sub> + THT<sub>2</sub> (46.1 °C por 75 min más 55 °C por 5 min). El THT<sub>1</sub> + THT<sub>2</sub> redujo la PE, el MDA y la PP a 5 °C y activó el sistema antioxidante

- Crisosto, C. H., Crisosto, G. M., Brecht, J., Sargent, S., Kader, A., Mitcham, E., Maul, F., Brecht, P., Osuna, J., Kihlstedt, D., Menocal, O., González-Moscoso, S., Huag, M., Makani, O., & Resende-Nassur, R. (2009). *Mango handling and ripening protocol*. USA: National Mango Board. Retrieved from [https://www.mango.org/wp-content/uploads/2017/10/Mango\\_Handling\\_and\\_Ripening\\_Protocol\\_Eng.pdf](https://www.mango.org/wp-content/uploads/2017/10/Mango_Handling_and_Ripening_Protocol_Eng.pdf)
- Cruz, J. N., Soares, C. A., Fabbri, A. D., Cordenunsi, B. R., & Sabato, S. F. (2012). Effect of quarantine treatments on the carbohydrate and organic acid content of mangoes (cv. Tommy Atkins). *Radiation Physics and Chemistry*, 81, 1059-1063. doi: 10.1016/j.radphyschem.2012.02.026
- de Mello-Vasconcelos, O. C., Duarte, D., de Castro-Silva, J., Oliveros-Mesa, N. F., Teruel-Mederos, B. J., & Tonetyo-de Freiras, S. (2019). Modeling ‘Tommy Atkins’ mango cooling time based on fruit physicochemical quality. *Scientia Horticulturae*, 244, 413-420. doi: 10.1016/j.scienta.2018.09.068
- Dea, S., Brecht, J. K., Nunes, M. C., & Baldwin, E. A. (2010). Quality of fresh-cut ‘Kent’ mango slices prepared from hot water or non-hot water-treated fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 56(2), 171-180. doi: 10.1016/j.postharvbio.2010.01.007
- Dessalegn, Y., Ayalew, A., & Woldetsadik, K. (2013). Integrating plant defense inducing chemical, inorganic salt and hot water treatments for the management of postharvest mango anthracnose. *Postharvest Biology and Technology*, 85, 83-88. doi: 10.1016/j.postharvbio.2013.05.003
- Díaz-Corona, D. A., López-López, M. E., Ayón-Reyna, L. E., López-Velázquez, J. G., López-Zazueta, B. A., & Vega-García, M. O. (2020). Impact of hot water-calcium on the activity of the cell wall degrading and antioxidant system enzymes in mango stored at chilling temperature. *Journal of Food Biochemistry*, 44(8), 13286. doi: 10.1111/jfbc.13286
- Food and Agriculture Organization (FAO). (2021). *Agricultural data FAOSTAT*. USA: FAO. Retrieved January, 2021 from <http://www.faostat.org>
- Fogelman, E., Kaplan, A., Tanami, Z., & Ginzberg, I. (2011). Antioxidative activity associated with chilling injury tolerance of muskmelon (*Cucumis melo* L.) rind. *Scientia Horticulturae*, 128(3), 267-273. doi: 10.1016/j.scienta.2011.01.034
- Ghasemnezhad, M., Marsh, K., Shilton, R., Babalar, M., & Woolf, A. (2008). Effect of hot water treatments on chilling injury and heat damage in ‘Satsuma’ mandarins: Antioxidant enzymes and vacuolar ATPase, and pyrophosphatase. *Postharvest Biology and Technology*, 48, 364-371. doi: 10.1016/j.postharvbio.2007.09.014
- Hodges, D. M., de Long, J. M., Forney, C. F., & Prange, R. K. (1999). Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta*, 207, 604-611. doi: 10.1007/s004250050524
- Hossain, A., Rana, M., Kimura, Y., & Roslan, H. A. (2014). Changes in biochemical characteristics and activities of ripening associated enzymes in mango fruit during the storage at different temperatures. *BioMed Research International*, 2014, 1-11. doi: 10.1155/2014/232969
- al aumentar la actividad de la SOD, la CAT y la APX. El THT<sub>2</sub> fue el que mejor mantuvo el color y la firmeza, seguido del tratamiento secuencial. La combinación de un tratamiento cuarentenario y un tratamiento térmico de corta duración puede ser una alternativa útil para mantener la calidad poscosecha durante el almacenamiento y la distribución de mango ‘Tommy Atkins’, ya que atiende a la normativa de control de plagas establecida por el USDA-APHIS y proporciona tolerancia al DF, lo cual facilitaría su comercialización en lugares lejanos. Asimismo, sería interesante probar dicho tratamiento en otros cultivares susceptibles a temperaturas bajas y comprobar su eficacia.
- Fin de la versión en español**
- Jacobi, K. K., Macrae, E. A., & Hetherington, S. E. (2000). Effects of hot air conditioning of ‘Kensington’ mango fruit on the response to hot water treatment. *Postharvest Biology and Technology*, 21, 39-49. doi: 10.1016/S0925-5214(00)00163-0
- Jin, P., Zheng, Y., Tang, S., Rui, H., & Wang, C. Y. (2009). A combination of hot air and methyl jasmonate vapor treatment alleviates chilling injury of peach fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 52, 24-29. doi: 10.1016/j.postharvbio.2008.09.011
- Khaliq, G., Muda-Mohamed, M. T., Ghazali, H. M., Ding, P., & Ali, A. (2016). Influence of gum arabic coating enriched with calcium chloride on physiological, biochemical and quality responses of mango (*Mangifera indica* L.) fruit stored under low temperature stress. *Postharvest Biology and Technology*, 111, 362-369. doi: 10.1016/j.postharvbio.2015.09.029
- Kim, Y., Lounds-Singleton, A. J., & Talcott, S. T. (2009). Antioxidant phytochemical and quality changes associated with hot water immersion treatment of mangoes (*Mangifera indica* L.). *Food Chemistry*, 115, 989-993. doi: 10.1016/j.foodchem.2009.01.019
- Le, T. N., Shiesh, C. C., & Lin, H. L. (2010). Effect of vapor heat and hot water treatments on disease incidence and quality of Taiwan native strain mango fruits. *International Journal Agriculture and Biology*, 12(5), 673-678. doi: 10-198/DAK/2010/12-5-673-678
- Li, P., Zheng, X., Liu, Y., & Zhu, Y. (2014). Pre-storage application of oxalic acid alleviates chilling injury in mango fruit by modulating proline metabolism and energy status under chilling stress. *Food Chemistry*, 142, 72-78. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.06.132
- López-López, M. E., López-Valenzuela, J. A., Delgado-Vargas, F., López-Angulo, G., Carrillo-López, A., Ayón-Reyna, L. E., & Vega-García, M. O. (2018). A treatment combining hot water with calcium lactate improves the chilling injury tolerance of mango fruit. *Horticultural Science*, 53(2), 217-223. doi: 10.21273/HORTSCI12575-17
- Ma, Q., Suo, J., Huber, D. J., Dong, X., Han, Y., Zhang, Z., & Rao, J. (2014). Effect of hot water treatments on chilling injury and expression of a new C-repeat binding factor (CBF) in ‘Hongyang’ kiwifruit during low temperature storage.

- Postharvest Biology and Technology*, 97, 102-110. doi: 10.1016/j.postharvbio.2014.05.018
- Mahto, R., & Das, M. (2013). Effect of gamma irradiation on the physico-chemical and visual properties of mango (*Mangifera indica* L.), cv. 'Dushehri' and 'Fazli' stored at 20 °C. *Postharvest Biology and Technology*, 86, 447-455. doi: 10.1016/j.postharvbio.2013.07.018
- Malacrida, C., Valle, E. M., & Boggio, S. B. (2006). Postharvest chilling induces oxidative stress response in the dwarf tomato cultivar Micro-Tom. *Physiology Plant*, 127, 10-18. doi: 10.1111/j.1399-3054.2005.00636.x
- Mirdehghan, S. H., Rahemi, M., Martínez-Romero, D., Guillén, F., Valverde, J. M., Zapata, P. J., & Valero, D. (2007). Reduction of pomegranate chilling injury during storage after heat treatment: Role of polyamines. *Postharvest Biology and Technology*, 44, 19-25. doi: 10.1016/j.postharvbio.2006.11.001
- Nasef, I. N. (2018). Short hot water as safe treatment induces chilling tolerance and antioxidant enzymes, prevents decay and maintains quality of cold-stored cucumbers. *Postharvest Biology and Technology*, 138, 1-10. doi: 10.1016/j.postharvbio.2017.12.005
- Nyanjage, M. O., Wainwright, H., & Bishop, C. F. (1999). Effects of hot-water treatment and storage temperature on electrolyte leakage of mangoes (*Mangifera indica* Linn.). *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 74(5), 566-572. doi: 10.1080/14620316.1999.11511154
- Safizadeh, M. R., Rahemi, M., & Aminlari, M. (2007). Effect of postharvest calcium and hot-water dip treatments on catalase, peroxidase, and superoxide dismutase in chilled Lisbon lemon fruit. *International Journal of Agricultural Research*, 2(5), 440-449. doi: 10.3923/ijar.2007.440.449
- Sala, J. M., & Lafuente, T. (2000). Catalase enzyme activity is related to tolerance of mandarin fruits to chilling. *Postharvest Biology and Technology*, 20, 81-89. doi: 10.1016/S0925-5214(00)00115-0
- Shadmani, N., Ahmad, S. H., Saari, N., Ding, P., & Tajidin, N. E. (2015). Chilling injury incidence and antioxidant enzyme activities of *Carica papaya* L. 'Frangi' as influenced by postharvest hot water treatment and storage temperature. *Postharvest Biology and Technology*, 99, 114-119. doi: 10.1016/j.postharvbio.2014.08.004
- Shao, X., & Tu, K. (2012). Hot air treatment improved the chilling resistance of loquat fruit under cold storage. *Journal of Food Processing and Preservation*, 38(2014), 694-703. doi: 10.1111/jfpp.12019
- Soleimani-Aghdam, M., Jannatizadeh, A., Sheikh-Assadi, M., & Malekzadeh, P. (2016). Alleviation of postharvest chilling injury in anthurium cut flowers by salicylic acid treatment. *Scientia Horticulturae*, 202, 70-76. doi: 10.1016/j.scienta.2016.02.025
- Ummarat, N., Matsumoto, T. K., Wall, M. M., & Seraypheap, K. (2011). Changes in antioxidants and fruit quality in hot water-treated "Hom Thong" banana fruit during storage. *Scientia Horticulturae*, 130(4), 801-807. doi: 10.1016/j.scienta.2011.09.006
- U.S. Department of Agriculture (USDA-APHIS). (2014). *Treatment schedules*. Retrieved June 15, 2014 from <[https://www.aphis.usda.gov/aphis/ourfocus/planthealth/import-information/sa\\_quarantine\\_treatments/ct\\_quarantine-treatment](https://www.aphis.usda.gov/aphis/ourfocus/planthealth/import-information/sa_quarantine_treatments/ct_quarantine-treatment)>
- Vicente, A. R., Martínez, G. A., Chaves, A. R., & Civello, P. M. (2006). Effect of heat treatment on strawberry fruit damage and oxidative metabolism during storage. *Postharvest Biology and Technology*, 40(2), 116-122. doi: 10.1016/j.postharvbio.2005.12.012
- Wang, B., Wang, J., Liang, H., Yi, J., Zhang, J., Lin, L., Wu, Y., Feng, X., Cao, J., & Jiang, W. (2008). Reduced chilling injury in mango fruit by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and the antioxidant response. *Postharvest Biology and Technology*, 48, 172-181. doi: 10.1016/j.postharvbio.2007.10.005
- Wang, J., Mao, L., Li, X., Zhang, H., Zhang, M., & Ju, G. (2016). Reduction of active oxygen metabolism and mitigation of chilling injury in Hami melon fruit as influenced by postharvest hot water treatment. *Nongye Gongcheng Xuebao/Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 32(2), 280-286. doi: doi.org/10.11975/j.issn.1002-6819.2016.02.040
- Zaharah, S.S., & Singh, Z. (2011). Postharvest nitric oxide fumigation alleviates chilling injury, delays fruit ripening and maintains quality in cold-stored 'Kensington Pride' mango. *Postharvest Biology and Technology*, 60, 202-210. doi: 10.1016/j.postharvbio.2011.01.011
- Zhang, M., Liu, W., Li, C., Shao, C., Jiang, X., Zhao, H., & Ai, W. (2019). Postharvest hot water dipping and hot water forced convection treatments alleviate chilling injury for zucchini fruit during cold storage. *Scientia Horticulturae*, 249, 219-227. doi: 10.1016/j.scienta.2019.01.058
- Zhang, X., Shen, L., Li, F., Meng, D., & Sheng, J. (2013). Arginase induction by heat treatment contributes to amelioration of chilling injury and activation of antioxidant enzymes in tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 79, 1-8. doi: 10.1016/j.postharvbio.2012.12.019
- Zhang, Z., Nakano, K., & Maezawa, S. (2009). Comparison of the antioxidant enzymes of broccoli after cold or heat shock treatment at different storage temperatures. *Postharvest Biology and Technology*, 54, 101-105. doi: 10.1016/j.postharvbio.2009.05.006
- Zhang, Z., Gao, Z., Li, M., Hu, M., Gao, H., & Yang, B. (2012). Hot water treatment maintains normal ripening and cell wall metabolism in mango (*Mangifera indica* L.) fruit. *HortScience*, 47, 1466-1471. doi: 10.21273/HORTSCI.47.10.1466
- Zhang, Z., Zhu, Q., Hu, M., Gao, Z., An, F., Li, M., & Jiang, Y. (2017). Low-temperature conditioning induces chilling tolerance in stored mango fruit. *Food Chemistry*, 219, 76-84. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.09.123