



EFFECT OF THE GABA APPLICATION ON THE EXPRESSION OF ANTIOXIDANT GENES IN PERSIAN LIME †

[EFECTO DE LA APLICACIÓN DE GABA EN LA EXPRESIÓN DE GENES ANTIOXIDANTES EN LIMÓN PERSA]

Felipe Roberto Flores-de la Rosa^{1*}, Elías Vergara-Estudillo²,
Ricardo Santillán-Mendoza¹, Cynthia Guadalupe Rodríguez-Quibrera¹
and Jacel Adame-García²

¹Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Campo Experimental Ixtacuaco Km 4.5 Carretera Martínez de la Torre-Tlapacoyan, cong. Rojo Gómez, Tlapacoyan, Veracruz, CP 93600, México. Email: flores.felipe@inifap.gob.mx.

²Tecnológico Nacional de México. Instituto Tecnológico de Úrsulo Galván Km 4.5 carretera Cardel-Chachalacas Úrsulo Galván Veracruz, CP 91667, México.

*Corresponding author

SUMMARY

Background: The Persian lime (*Citrus latifolia* Tan.) is one of the most economically important citrus fruits in Mexico. However, it confronts a vast range of threats to reach optimal productivity. Different sources of biotic and abiotic stress cause an alteration in the metabolism of Reactive Oxygen Species (ROS), which leads a high level of oxidative stress. The application of γ -aminobutyric acid (GABA) has been shown to induce an increase in the expression of antioxidant genes in various plant species. **Objective:** Determine the effect of exogenous application of GABA on the expression of *APX* and *CAT* genes in Persian lime plants, as well as to determine the similarity of the coding regions of these genes with other plant species. **Methodology:** a GABA 1 mM solution was applied in Persian lime plants of 1 year and RNA was extracted at 0, 1, 5, 24 h after application. *CAT* and *APX* genes were amplified through RT-PCR and expression was quantified using a densitometric approach. **Results:** The application of GABA generated an increase in the activity of both genes, especially at 1 hour after the application. The *APX* gene was the one that showed the greatest increase at 1 hour; however, 24 hours after application, the activity of this gene was repressed. The *CAT* gene showed an increase at 1h, and it was decreasing over time, however, it was always higher compared to the control. Sequence analysis showed a high similarity between *APX* from Persian lime and *A. thalina* and *CAT* between Persian lime and *C. sinensis*. **Implications:** Further studies are necessary to evaluate if the application of GABA in Persian lime helps against biotic and abiotic sources of stress. **Conclusions:** The application of GABA in Persian lime is a possible strategy to counteract the effects of oxidative damage caused by biotic and abiotic stress.

Keywords: Gamma-aminobutyric acid; tolerance; antioxidant activity.

RESUMEN

Antecedentes: El limón Persa es uno de los cítricos de mayor importancia económica en México. Sin embargo, enfrenta una vasta gama de amenazas para su productividad óptima. Diferentes fuentes de estrés biótico y abiótico causan una alteración en el metabolismo de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS), por lo cual se entra en un alto nivel de estrés oxidativo. La aplicación del ácido γ -amino butírico (GABA) ha mostrado inducir incremento en la expresión de genes antioxidantes en diversas especies de plantas. **Objetivo:** determinar el efecto que la aplicación exógena de GABA tiene en la actividad temprana de los genes *APX* y *CAT* en plantas de limón Persa, así como determinar la similitud de las regiones codificantes de estos genes con otras especies vegetales. **Metodología:** Se aplicó una solución de 1mM de GABA a plantas de limón Persa de un año de edad. Se extrajo ARN a las 0, 1, 5 y 24 h posteriores a la aplicación. Los genes *CAT* y *APX* fueron amplificados mediante RT-PCR y la expresión se cuantificó mediante un enfoque densitométrico. **Resultados:** La aplicación de GABA generó un alza en la actividad de ambos genes, especialmente a 1h posterior a la aplicación. El gen *APX* fue el que mostró un mayor incremento a 1h, sin embargo, a 24h de la aplicación, la actividad de este gen fue reprimida. El gen *CAT* mostró un incremento a 1h, y fue disminuyendo a lo largo del tiempo, sin embargo,

† Submitted December 21, 2020 – Accepted May 6, 2021. This work is licensed under a CC-BY 4.0 International License.
ISSN: 1870-0462.

siempre fue mayor respecto al testigo. El análisis de las secuencias demostró una alta similitud entre *APX* de limón Persa y *A. thalina* y de *CAT* entre limón Persa y *C. sinensis*. **Implicaciones:** Estudios adicionales son necesarios para determinar si la aplicación de GABA en limón Persa coadyuva a enfrentar las fuentes de estrés biótico y abiótico. **Conclusiones:** La aplicación de GABA en limón Persa es una posible estrategia para contrarrestar los efectos del daño oxidativo causado por estrés biótico y abiótico.

Palabras clave: ácido gamma-aminobutírico; tolerancia; actividad antioxidante.

INTRODUCCIÓN

La producción citrícola es una de las actividades económicas más importantes a nivel mundial, ya que los cítricos son ampliamente utilizados en diferentes industrias y tipos de consumo, por lo cual representan una relevante derrama económica para los países productores (Liu *et al.* 2012). México es un importante productor de diferentes variedades de cítricos, de entre los cuales destaca la producción del limón Persa (*Citrus latifolia*) (Curti-Díaz *et al.* 2012, Mendoza-Tornez *et al.* 2016, López-Hernández *et al.* 2019).

La producción citrícola enfrenta varias amenazas por diversos tipos de estrés que afectan la homeostasis de la planta: bióticos, causados por múltiples microorganismos patógenos (Mendoca *et al.* 2017) y abióticos, ocasionado por condiciones medioambientales adversas (Zhang *et al.* 2017).

Una alteración que las plantas de cítricos sufren ante el estrés es la disminución de la actividad de enzimas antioxidantes y la sobreproducción de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS). Por ejemplo, se ha observado que ante estrés por sequía y altas temperaturas, genotipos susceptibles muestran muy bajos niveles de actividad de las enzimas Ascorbato Peroxidasa (*APX*) y Catalasa (*CAT*) (Zandalinas *et al.* 2017); bajo estrés osmótico causado por altos niveles de salinidad, igualmente se observa una afectación sobre la actividad antioxidante (Arbona *et al.* 2003). Por otro lado, la infección por la bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus*, agente causal de la enfermedad HLB, genera una acumulación de peróxido de hidrógeno debido a una disminución de la actividad antioxidante, observada por un muy bajo nivel de expresión de los genes codificantes de enzimas antioxidantes (Pitino *et al.* 2017).

Debido a lo anterior, se considera que incrementar la actividad de los genes codificantes de enzimas antioxidantes podría ser un enfoque que permita disminuir el efecto del estrés antes mencionado, especialmente en cítricos (Molassiotis *et al.* 2016). Para este efecto, se ha evaluado la aplicación de diferentes elicitores químicos, entre los cuales destaca el ácido γ -amino butírico (GABA), un aminoácido de naturaleza no proteica que tiene una

función relevante como señalizador en las plantas (Ramesh *et al.* 2017). Algunos estudios reportan que un incremento en la expresión de genes antioxidantes se lleva a cabo en diversas especies ante la aplicación de GABA (Li *et al.* 2018, Seifikalhor *et al.* 2020), incluidos algunos cítricos dulces (Sheng *et al.* 2017). Sin embargo, no existe información respecto al efecto que la aplicación exógena de GABA tiene en la expresión de genes antioxidantes en limón Persa, por tanto, en el presente trabajo se evaluó la variación en la expresión temprana de los genes *CAT* y *APX* en plantas sanas de limón Persa ante la aplicación exógena de GABA.

MATERIALES Y MÉTODOS

Establecimiento del experimento

El presente estudio se llevó a cabo en el Campo Experimental Ixtacuaco del INIFAP. Se utilizaron plantas de limón Persa de un año de edad, injertadas en Swingle, las cuales fueron obtenidas de un vivero certificado y se corroboró mediante PCR la ausencia de la infección por HLB (datos no mostrados). Se aplicó una solución de GABA a una concentración de 1 mM y se comparó contra un testigo al cual se le aplicó solo agua estéril. La aplicación de la solución de GABA y el agua estéril se aplicaron vía foliar en las plantas hasta que las hojas se cubrieran completamente por las y envés. Posterior a la aplicación se evaluó la expresión de los genes codificantes de la enzima *CAT*alasa (*CAT*) y ascorbato peroxidasa (*APX*) a las 0, 1, 5 y 24 h posteriores a la aplicación. Se utilizaron tres plantas independientes para cada repetición en cada tiempo. Los datos obtenidos de la expresión se analizaron mediante un análisis t de Student de una cola ($\alpha=0.05$). El experimento se repitió dos veces.

Extracción de RNA y DNA

La extracción de ARN total se realizó empleando el método de Trizol® utilizando el protocolo descrito por el fabricante, para el cual se pesaron 50 mg de tejido foliar y se agregaron 500 μ L de TRIzol en morteros para macerar, el resultado de la maceración se colocó en tubos de microcentrífuga de 2 mL y se incubó por 5 min a temperatura ambiente, posteriormente se adicionaron 100 μ L de

cloroformo y se incubó por 3 min a temperatura ambiente; se centrifugó durante 15 min a 12,000 g a 4°C. Posteriormente, se transfirió la fase acuosa a un tubo estéril nuevo, se adicionaron 250 µL de isopropanol, se incubó por 2 h a -20°C y se centrifugó 20 min a 12,000 g a 4°C. Se eliminó el sobrenadante por decantación del tubo, se adicionaron 500 µL de etanol al 75%, se llevó al vortex con brevedad, posteriormente se centrifugó 5 min a 7,600 g a 4°C, se eliminó el sobrenadante (se realizó doble lavado con etanol). La pastilla se secó a temperatura ambiente por 20 minutos, y se resuspendió en 60 µL de agua libre de nucleasas. Se determinó la integridad del ARN mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1 % y la calidad se estimó mediante espectrofotometría en espectrofotómetro (Thermo Scientific Nano Drop OneC®) a las absorbancias 260 y 230 nm. Para la extracción de ADN se siguió el método CTAB, el cual consistió en lo siguiente: se lavó el material vegetal con agua y se maceró en nitrógeno líquido. Se colocaron 500 mg de material vegetal en un tubo eppendorf de 2 mL adicionando 1.5 mL de buffer 2-ME/CTAB (2% de 2- mercaptoethanol, 2% de bromuro deciltrimetil-amonio, 100 mM Tris-HCl pH 8, 20 mM EDTA pH 8, 1.4 M NaCl, 1% p/v polivinylpyrrolidona), previamente precalentado a 65 °C. Se incubó a 65 °C por 2 horas con vortex cada 30 minutos. Posteriormente se extrajeron 800µl de sobrenadante a un tubo eppendorf estéril de 2 ml, adicionando 800µl de SEVAG (cloroformo-alcohol isoamílico 24:1) homogenizando la muestra por inversión. Se centrifugó a 13000 rpm/10 minutos a temperatura ambiente. Se recuperaron 500 µl de sobrenadante en un tubo nuevo estéril de 1.5 ml, adicionando 250 µl de acetato de amonio (7.5 M) y 300 µl de isopropanol. Se dejó precipitar 24 h a -20°C. Se centrifugó a 13000 rpm/20 minutos. Se desechó el sobrenadante rápidamente para evitar el desprendimiento de la pastilla, y se lavó dos veces con 1 mL de etanol frío al 70 %, centrifugando a 13000 rpm/10 minutos a 4°C y se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente, se hidrató con 50

µl de agua mQ estéril. Por último, se almacenó el DNA a -20 °C hasta que fue utilizado.

Expresión génica

Se sintetizó cDNA mediante la enzima retrotranscriptasa y a partir de éste se realizó el análisis de expresión mediante RT-PCR semicuantitativa. Se analizó la expresión de los genes *CAT* y *APX* y se utilizó la expresión del gen *UPL7* para normalización (Pitino *et al.* 2017). La lista de iniciadores utilizados se muestra en la tabla 1. Las condiciones de reacción fueron buffer 10x, 50 mM de MgCl₂, 10 mM de cada dNTP, 30 pmol de cada iniciador, 1U de Taq polimerasa recombinante (Invitrogen) a un volumen final de 25 µL. El ciclo térmico utilizado consistió en una desnaturalización inicial a 94°C durante 3 min, seguida de 28 ciclos con desnaturalización a 94 °C por 45 s, anillamiento a 60 °C por 35 s, extensión a 72 °C por 35 s y una extensión final a 72 °C durante 10 min. El producto de PCR se analizó mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2.0% a 90 V durante 30 min y los geles fueron analizados mediante un fotodocumentador en luz UV. El análisis de densitometría óptica de cada producto de PCR fue cuantificado mediante el software ImageJ.

Secuenciación y análisis bioinformático

Se secuenció el producto de PCR de los genes antes mencionados, para lo cual, la banda con el tamaño esperado (*CAT*-130 pb; *APX*-115 pb) fue purificada mediante el kit de purificación Wizard®. Se secuenció producto generado desde cDNA y gDNA. Las secuencias obtenidas fueron verificadas contra el electroferograma generado y utilizadas para realizar alineamientos mediante el algoritmo ClustalW contra secuencias de los mismos genes de los genomas de *Citrus sinensis* (<https://www.citrusgenomedb.org/>) y *Arabidopsis thaliana* (<https://www.arabidopsis.org/>).

Tabla 1. Primers utilizados en el presente trabajo para expresión génica y secuenciación desde ADNg.

Gen	Primer F	Primer R	Fuente
CsAPX	GAGGCAAGTCTTTGGTGCTC	GGAAAACAGGGTCATCCAGA	Pitino <i>et al.</i> , 2017
CsSOD	GGAATGACATCCCCATCATC	TTGGGTTCGCCTAAATTCAC	Pitino <i>et al.</i> , 2017
CsCAT	CCCCCTTCTTTACCACCAAT	TGGGTGACCTCAAAGAAACC	Pitino <i>et al.</i> , 2017
CsUPL7	CAAAGAAGTGCAGCGAGAGA	TCAGGAACAGCAAAGCAAG	Pitino <i>et al.</i> , 2017

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este trabajo se observó que la aplicación de GABA en plantas sanas de limón Persa tiene un efecto temprano en la expresión de los genes *CAT* y *APX*. En el caso del gen *APX*, se muestra un claro incremento de la expresión debido a la aplicación de GABA en 1 h, la cual disminuye paulatinamente a las 5 y 24 h, sin embargo, sigue siendo mayor que a la 0 h (Figura 1c). En lo que respecta al testigo, la expresión de *APX* mostró un incremento constante a lo largo de los tiempos evaluados (Figura 1a), lo que sugiere un efecto del rocío de la aplicación, concordando con el importante rol de este gen ante diversos estímulos externos en la planta (Caverzan *et al.* 2012).

Al comparar la expresión entre tratamientos, se observa que, respecto al testigo, la aplicación de GABA incrementa la expresión del gen *APX* hasta 2.4 veces a 1 h (Figura 2). Lo cual concuerda con estudios previos en que se observa el incremento en la actividad de *APX* por la aplicación de GABA en plantas bajo condiciones de sequía y estrés por calor (Li *et al.* 2018), estrés por frío (Malekzadeh *et al.* 2014), anegamiento (Salah *et al.* 2019), y otras fuentes de estrés.

Durante el experimento, la expresión de *APX* se reprime en las plantas tratadas con GABA a 24 h, lo que podría explicarse con que la planta no se encuentra bajo estrés y por tanto no es necesario altos niveles de dicha enzima, similar a lo que se ha observado en otras plantas (Caverzan *et al.* 2012).

La aplicación del GABA mostró un fuerte efecto en la expresión del gen *CAT*, mientras que en las

plantas en que sólo se aplicó agua (testigo), la expresión de este gen se mantuvo bastante homogénea (Figura 1b). la aplicación del GABA generó un notable incremento en la expresión después de 1 h, la cual fue decreciendo a lo largo del tiempo (Figura 1d). Esto es un resultado importante, ya que se ha demostrado que la enzima catalasa es indispensable para los mecanismos de defensa en plantas por efectos oxidantes del H_2O_2 (Caverzan *et al.* 2012). Además de que, en cítricos, la expresión del gen *CAT* ha sido asociada a la actividad antioxidante en peroxisomas (Racchi 2013), lo que se relaciona con la capacidad de tolerancia a estrés por frío en mandarinas (Sala and Lafuente 2000), a la sequía en diferentes portainjertos (Hussain *et al.* 2018), o al anegamiento (Hossain *et al.* 2009). Al aplicar el GABA, se observó un incremento de hasta 2.2 veces en la expresión de *CAT* a diferencia del testigo en el que solo se aplicó agua (Figura 2), lo que sugiere que la aplicación de GABA es una alternativa para contrarrestar el efecto de estrés oxidativo ante condiciones ambientales o enfermedades, como el HLB (Pitino *et al.* 2017). Asimismo, ha sido reportada que la aplicación exógena de GABA incrementa la expresión de genes antioxidantes en plantas, sobre todo al exponerse a diferentes tipos de estrés biótico y abiótico (Li *et al.*, 2018; Jin *et al.*, 2019; Seifikalhor *et al.*, 2020). A nivel celular, la acumulación de GABA en respuesta a diferentes fuentes de estrés parece estar relacionado con la acumulación de Ca_2^+ , sin embargo, el mecanismo por el cual se induce la expresión de genes antioxidantes aún no es claro (Li *et al.*, 2021).

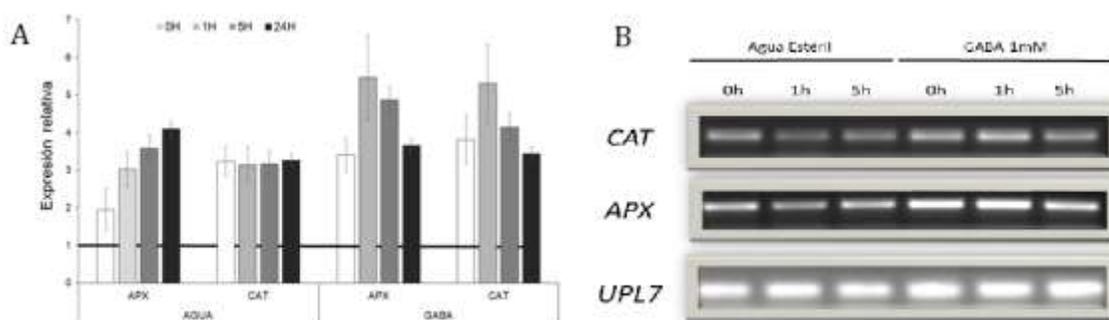


Figura 1. (A) Expresión relativa del gen codificante de la enzima ascorbato peroxidasa (*APX*) ante la aplicación de agua y GABA y del gen codificante de la enzima catalasa bajo condiciones de agua y GABA. (B) Geles de agarosa en que se observa la variación en la expresión de los genes en estudio.

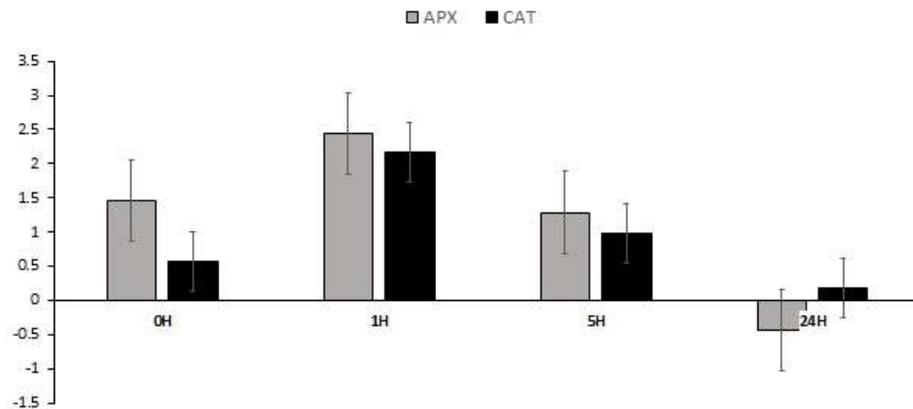


Figura 2. Incremento en la actividad de los genes *APX* (gris) y *CAT* (negro) en limón Persa como resultado de la aplicación exógena de GABA.

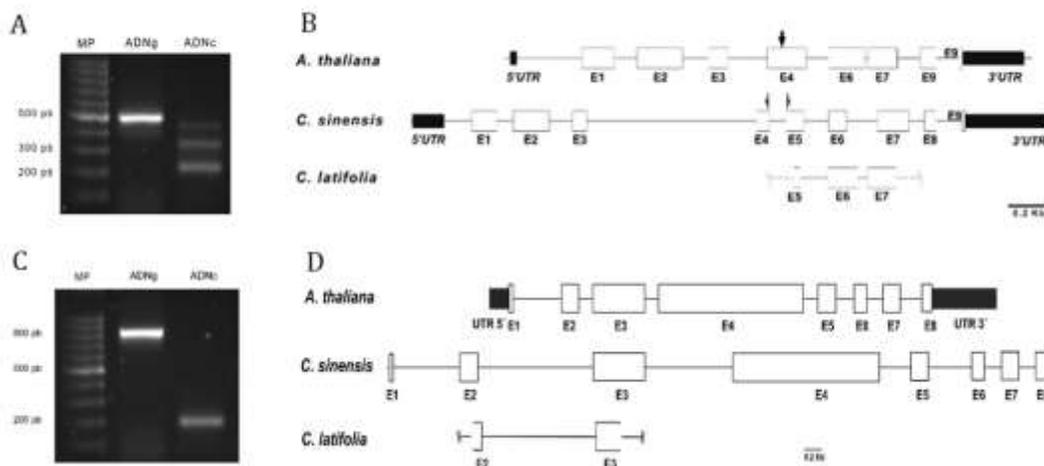


Figura 3. Secuenciación y alineamiento de los genes *APX* y *CAT* en limón persa con respecto a otras especies. A) Perfil de bandas expresión de transcritos de *APX*. B) Alineamientos de exones del gen *APX* de limón Persa, *C. sinensis* y *A. thaliana*. C) Perfil de bandas expresión de transcritos de *CAT*. D) Alineamientos de exones del gen *CAT* de limón Persa, *C. sinensis* y *A. thaliana*. (MP: Marcador de Peso molecular 100 pb; ADNg: ADN genómico; ADNc: ADN complementario)

A pesar de la importancia que la actividad de los genes *CAT* y *APX* tienen para enfrentar diferentes tipos de estrés en cítricos, no existe información disponible respecto a estos genes en limón Persa. Debido a esto, se realizó la comparación de la secuencia obtenida del ARNm de la RT-PCR con genomas de *A. thaliana* y *C. sinensis*. En el caso del gen *APX*, al realizar la secuenciación se observó una mayor similitud con las secuencias de la isoforma *APX* de cloroplasto de *A. thaliana* que de *C. sinensis* (Figura 3). Respecto al gen *CAT*, se

encontraron secuencias homólogas en las dos especies con las que se comparó. Se observó una alta similitud entre secuencias (Figura 4C) y estructura exónica (Figura 4) de limón Persa y *C. sinensis*, lo que sugiere una actividad y funcionalidad similar. Respecto a *A. thaliana*, se observó diferencia en la longitud de la secuencia en ADNg.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que la aplicación de GABA en plantas de limón Persa inducen un incremento en la expresión de los genes *APX* y *CAT*. Dichos genes muestran alta similaridad con sus homólogos de *A. thaliana* y *C. sinensis*. Esto sugiere que la aplicación de GABA es una alternativa para contrarrestar los daños oxidativos causados por estrés biótico y abiótico en el limón Persa.

Agradecimientos

Los autores agradecen a Ared Mendoza y Nelly A. González Oviedo por su apoyo técnico durante la fase de laboratorio.

Financiamiento. Fondo FIDEICOMISO INIFAP por el financiamiento del proyecto “Evaluación de agentes elicitores de resistencia sistémica y actividad antioxidante en cítricos como medida de protección ante el HLB” (No. Proyecto 1210034811).

Conflictos de interés. Se declara que los autores no presentan conflicto de intereses.

Cumplimiento de estándares de ética. Se han cumplido todos los estándares éticos.

Disponibilidad de datos. Los datos están disponibles con: Dr. Felipe Roberto Flores de la Rosa, flores.felipe@inifap.gob.mx, previa solicitud razonable.

REFERENCIAS

- Arbona, V., Flores, V., Jacas, J., García-Agustín, P. and Gómez-Cadenas, A. 2003. Enzymatic and non-enzymatic antioxidant responses of Carrizo citrange, a salt-sensitive citrus rootstock, to different levels of salinity. *Plant and Cell Physiology*, 44(4), pp.388–394. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcg059>
- Caverzan, A., Passaia, G., Barcellos Rosa, S., Werner Ribeiro, C., Lazzarotto, F. and Margis Pinheiro, M. 2012. Plant responses to stresses: Role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. *Genetics and Molecular Biology*, 35(4), pp.1011–1019. <https://doi.org/10.1590/s1415-47572012000600016>
- Curti-Díaz, S. A., Hernández-Guerra, C. and Loredo-Salazar, R.X. 2012. Productividad del limón “persa” injertado en cuatro portainjertos en una huerta comercial de Veracruz, México. *Revista Chapingo, Serie Horticultura*, 18(3), pp.291–305. <https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2010.11.109>
- Hossain, Z., Climent, M. F., Arbona, V., Perez-Clemente, R. and Gómez-Cadenas, A. 2009. Modulation of the antioxidant system in Citrus under waterlogging and subsequent drainage. *Journal of Plant Physiology*, 166(13), pp.1391–1404. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2009.02.012>
- Hussain, S., Khalid, M.F., Saqib, M., Ahmad, S., Zafar, W., Rao, M. J., Morillon, R. and Anjum, M.A. 2018. Drought tolerance in citrus rootstocks is associated with better antioxidant defense mechanism. *Acta Physiologiae Plantarum*, 40, 135. <https://doi.org/10.1007/s11738-018-2710-z>
- Jin, X., Liu, T., Xu, J., Gao, Z., and Hu, X. 2019. Exogenous GABA enhances muskmelon tolerance to salinity-alkalinity stress by regulating redox balance and chlorophyll biosynthesis. *BMC Plant Biology*, 19(1), 48. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1660-y>
- Li, L., Dou, N., Zhang, H., and Wu, C. 2021. The versatile GABA in plants. *Plant Signaling and Behavior*, 16,3: 1862565. <https://doi.org/10.1080/15592324.2020.1862565>
- Li, Z., Peng, Y. and Huang, B. 2018. Alteration of transcripts of stress-protective genes and transcriptional factors by γ -aminobutyric acid (GABA) associated with improved heat and drought tolerance in creeping bentgrass (*agrostis stolonifera*). *International Journal of Molecular Sciences*, 19(6), 1623. <https://doi.org/10.3390/ijms19061623>
- Liu, Y., Heying, E. and Tanumihardjo, S.A. 2012. History, Global Distribution, and Nutritional Importance of Citrus Fruits. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11, pp.530–545. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2012.00201.x>
- López-Hernández, W. A., Coutiño Estrada, B., Garza-Bueno, L. E., Cruz-Galindo, B. y Nieto-Angel, R. 2019. Competitividad del limón persa en la región del Papaloapan, Oaxaca. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 10(4), pp.921–934. <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i4.408>
- Malekzadeh, P., Khara, J. and Heydari, R. 2014. Alleviating effects of exogenous Gamma-

- aminobutyric acid on tomato seedling under chilling stress. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 20(1), pp.133–137. <https://doi.org/10.1007/s12298-013-0203-5>
- Mendoca, L., Zambolim, L. and Badel, J. 2017. Bacterial Citrus Diseases: Major Threats and Recent Progress. *Journal of Bacteriology & Mycology: Open Access*, 5(4), pp.340-350. <https://doi.org/10.15406/jbmoa.2017.05.00143>
- Mendoza-Tornez, R., Marquez-Berber, S. R., Almaguer-Vargas, G., Aguilar Ávila, J., Gardezi, A. K. and Ayala-Garay, A. V. 2016. Value Network of the Persian Lime in Mexico. *Agrofor International Journal*, 1(6), pp.39-45. <https://doi.org/10.7251/AGRENG1603039T>
- Molassiotis, A., Job, D., Ziogas, V. and Tanou, G. 2016. Citrus plants: A model system for unlocking the secrets of NO and ROS-inspired priming against salinity and drought. *Frontiers in Plant Science*, 7, pp.1–7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00229>
- Pitino, M., Armstrong, C. M. and Duan, Y. 2017. Molecular mechanisms behind the accumulation of ATP and H₂O₂ in citrus plants in response to “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” infection. *Horticulture Research*, 4, pp.1–8. <https://doi.org/10.1038/hortres.2017.40>
- Racchi, M. L. 2013. Antioxidant defenses in plants with attention to *Prunus* and *Citrus* spp. *Antioxidants*, 2(4), pp.340–369. <https://doi.org/10.3390/antiox2040340>
- Ramesh, S. A., Tyerman, S. D., Gilliam, M. and Xu, B. 2017. γ -Aminobutyric acid (GABA) signalling in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74(9), pp.1577–1603. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2415-7>
- Sala, J., and Lafuente, M. T. 2000. Catalase enzyme activity is related to tolerance of mandarin fruits to chilling. *Postharvest Biology and Technology*, 20(1), pp.81–89. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(00\)00115-0](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(00)00115-0)
- Salah, A., Zhan, M., Cao, C., Han, Y., Ling, L., Liu, Z., Li, P., Ye, M. and Jiang, Y. 2019. γ -Aminobutyric Acid Promotes Chloroplast Ultrastructure, Antioxidant Capacity, and Growth of Waterlogged Maize Seedlings. *Scientific Reports*, 9(1), pp.1–19. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36334-y>
- Seifikalhor, M., Aliniaefard, S., Bernard, F., Seif, M., Latifi, M., Hassani, B., Didaran, F., Bosacchi, M., Rezadoost, H. and Li, T. 2020. γ -Aminobutyric acid confers cadmium tolerance in maize plants by concerted regulation of polyamine metabolism and antioxidant defense systems. *Scientific reports*, 10, 3356. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59592-1>
- Sheng, L., Shen, D., Luo, Y., Sun, X., Wang, J., Luo, T., Zeng, Y., Xu, J., Deng, X. and Cheng, Y. 2017. Exogenous γ -aminobutyric acid treatment affects citrate and amino acid accumulation to improve fruit quality and storage performance of postharvest citrus fruit. *Food Chemistry*, 216, pp.138–145. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.024>
- Zandalinas, S. I., Balfagón, D., Arbona, V. and Gómez-Cadenas, A. 2017. Modulation of antioxidant defense system is associated with combined drought and heat stress tolerance in citrus. *Frontiers in Plant Science*, 8, pp.1–10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00953>
- Zhang, Y., Srivastava, A. K., Chi, T., Rao, G. and Wu, Q. 2017. Evaluation of tolerance to abiotic stresses in (*Citrus* spp.). *Current Horticulture*, 5(1), pp.15–19.