



ULL

Universidad
de La Laguna

TRABAJO DE FIN DE GRADO

La influencia del estrés abiótico en la síntesis de metabolitos secundarios de plantas medicinales

Alberto Alfonso Molina

Tutor: Francisco Valdés González
Co-tutor: David Jiménez Arias

Universidad de la Laguna
Facultad de Ciencias de la Salud, Sección Farmacia
Dpto. Botánica, Ecología y Fisiología Vegetal
Grado en Farmacia
Septiembre 2018

Índice

Resumen	2
Palabras clave	2
Abstract	2
Keywords	2
Agradecimientos	3
Metodología	3
Introducción	4
Desarrollo	6
Conclusiones	11
Bibliografía	12

Resumen

Actualmente, y a pesar de los avances en la química sintética, las plantas siguen siendo una fuente muy importante de materias primas para la industria farmacéutica, pero la cantidad de producto que se extrae por planta es muy reducida. Factores ambientales como la sequía, salinidad o radiación UV son capaces de alterar el metabolismo de las plantas. En los últimos años se han realizado numerosos estudios que demuestran que la elicitación mediante estrés abiótico puede ocasionar un incremento en la biosíntesis de metabolitos secundarios útiles, pero también un descenso en el crecimiento. En este TFG haremos una revisión de los trabajos más destacados realizados sobre plantas con interés medicinal, y también de los trabajos sobre el fenómeno del "priming" que los biólogos vegetales ven como una posible solución a la pérdida de biomasa tras la elicitación abiótica.

Palabras clave

Metabolitos secundarios, estrés abiótico, elicitors, primado.

Abstract

At present, and despite the advances in synthetic chemistry, plants are still a very important source of raw materials for the pharmaceutical industry, but the amount of product being harvested per plant is very small. Environmental factors such as drought, salinity or UV radiation are able to alter the metabolism of plants. In recent years, numerous studies have shown that elicitation using abiotic stress may cause an increase in the biosynthesis of useful secondary metabolites, but also a decrease in plant's growth. In this TFG, we will make a review of the most prominent essays on plants with medicinal interest, and also about the studies on the "priming" phenomenon, that plant biologists see as a possible solution to the loss of biomass after the abiotic elicitation.

Keywords

Secondary metabolites, abiotic stress, elicitors, priming.

Agradecimientos

Quiero agradecer encarecidamente al Dr. Francisco Valdés González que se ofreciese a ser mi tutor y me brindara la oportunidad de realizar este Trabajo de Fin de Grado. Sin su ayuda, planteamiento y orientación, este trabajo no hubiera sido posible.

Del mismo modo, agradecer al Dr. David Jiménez Arias por sus consejos, su tiempo y su inestimable ayuda en la búsqueda de información.

Metodología

La búsqueda de la información se realizó mediante el metabuscador PuntoQ de la Biblioteca de la Universidad de La Laguna, introduciendo diferentes combinaciones de las palabras clave (estrés abiótico, elicitores, metabolitos secundarios, sequía, salinidad, anegamiento, primado, etc.) y sus equivalentes en inglés. El puntoQ me permitió acceder, consultar y descargar sin restricción una gran variedad de artículos alojados en bases de datos como MedLinePLus, Scielo, Science Direct o Springer Link.

Se ha utilizado el programa Mendeley Desktop como gestor bibliográfico, y su plug-in para Microsoft Word 2016 como una ayuda a la hora de referenciar los artículos de la bibliografía.

Introducción

Las plantas se han utilizado con fines medicinales desde hace milenios en prácticamente todas las culturas[1]. A día de hoy, los remedios tradicionales basados en plantas terrestres siguen siendo el método terapéutico más utilizado en todo el planeta[2], ya que el costo de los nuevos biofármacos limita su acceso a una gran parte de la población. Además, la Organización Mundial de la Salud en su último informe sobre medicina tradicional, propone aumentar el uso de plantas medicinales con el fin de compensar el aumento de la población y la consiguiente demanda de medicamentos a nivel mundial[3].

Actualmente, y a pesar de los avances en la química sintética, las plantas siguen siendo una fuente muy importante de compuestos utilizados en la industria farmacéutica. Se estima que el 25% de los fármacos actuales derivan directa o indirectamente de metabolitos de las plantas[4]. Por todo ello, es comprensible el interés en la búsqueda de avances que permitan mejorar la producción de compuestos orgánicos procedentes de plantas.

Se conoce como metabolismo a la suma de todos los procesos bioquímicos que se llevan a cabo en un ser vivo. Por una parte se encuentran los metabolitos primarios (como los azúcares, aminoácidos o lípidos), que son los involucrados directamente en el crecimiento, desarrollo y reproducción de la planta. Por otro lado, los metabolitos secundarios son moléculas producidas por la planta para relacionarse con el entorno y que actúan como un mecanismo de defensa en respuesta a diferentes condiciones de estrés, tales como sequía, temperaturas extremas, alta radiación ultravioleta, infecciones de patógenos o incluso frente a ataques de herbívoros. Los metabolitos secundarios derivan de los primarios, e integran a una gran variedad de moléculas orgánicas que contribuyen a los olores, colores y sabores característicos de cada especie y que se clasifican según su origen biosintético en tres grupos: terpenoides, compuestos fenólicos y compuestos nitrogenados o alcaloides[5].

Se estima que existen aproximadamente unos 100.000 metabolitos secundarios sintetizados por las plantas[6] y su extracción para ser usados como materia prima tiene interés para la industria farmacéutica, cosmética o alimentaria, entre otras. Lamentablemente se suelen encontrar en unas concentraciones muy bajas, normalmente inferiores al 1% del peso seco de la planta[7], siendo necesario el uso de grandes cantidades de material vegetal para obtener una cantidad significativa de producto. Por tanto, resulta muy interesante hallar métodos que logren aumentar la cantidad total de estos compuestos presentes en los cultivos, con el fin de incrementar la productividad.

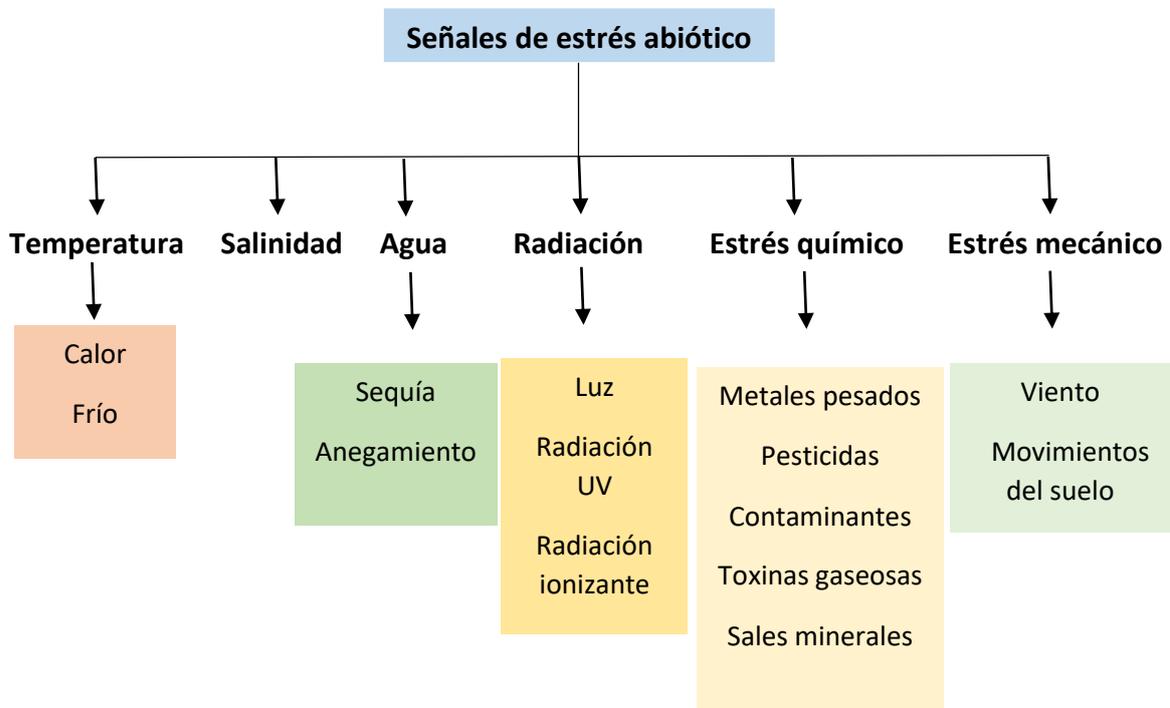
Las técnicas de cultivo de tejidos vegetales in vitro supusieron un gran avance, ya que pueden llevarse a cabo en condiciones controladas independientemente de los factores ambientales bióticos (insectos, microorganismos...) y abióticos (luz ultravioleta,

cambios de temperatura, salinidad...). Actualmente se trabaja con diferentes estrategias para incrementar el rendimiento de la producción de metabolitos secundarios en estos cultivos, tales como la ingeniería genética y metabólica, la selección y mejoramiento de la línea celular, la adición de precursores o el uso de elicitors [8,9]. A diferencia de técnicas más complejas, como podría ser la ingeniería genética, la elicitación resalta como una opción más económica y relativamente sencilla de implementar.

Desde un punto de vista fisiológico, un elicitor es una molécula o un factor ambiental que es capaz de activar una cascada de señalización en las plantas que media en la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de metabolitos secundarios[10]. Pueden clasificarse en dos grupos según su origen: bióticos o abióticos. Los primeros son principalmente compuestos orgánicos procedentes de la pared celular de hongos, levaduras, bacterias o plantas. Mientras que los abióticos están comprendidos por factores físicos y químicos capaces de producir estrés en las células y desencadenar una respuesta enzimática, tales como la radiación UV, sequía, salinidad, cambios bruscos de temperatura, daño mecánico o la presencia de metales pesados[11,12]. En esta revisión nos centraremos específicamente en los elicitors abióticos (Figura 1).

En los últimos años, se han llevado a cabo una gran cantidad de estudios usando diferentes elicitors abióticos, revelando prometedores resultados. Muestra de ello es el realizado por Zobayed *et al.* [13] en el que demostraron que, tras someter a estrés por sequía a plantas de Hierba de San Juan (*Hypericum perforatum*), la concentración de hiperforina se duplicó con respecto a las plantas del grupo de control. La hiperforina, molécula responsable de las propiedades ansiolíticas y antidepresivas de la planta[14], posee una eficacia similar a la de fármacos como la fluoxetina o la sertralina. Con estos resultados, queda patente lo interesante que puede resultar la elicitación de cultivos en la producción de metabolitos secundarios.

Figura 1. Varias señales abióticas que producen estrés en las plantas (modificada de Ramakrishna y Ravishankar[11]).



Desarrollo

A continuación, se recogen algunos tipos de elicitores presentados en diversos estudios que ilustran la influencia del uso del estrés abiótico sobre la biosíntesis de metabolitos secundarios en plantas con interés medicinal.

Estrés por sequía

La falta de agua es uno de los principales fenómenos causantes de estrés medioambiental en las plantas, limitando severamente su crecimiento y alterando su composición bioquímica. Como respuesta a la sequía, los estomas de la planta se cierran, logrando que disminuya la cantidad de agua que se pierde mediante la transpiración, pero provocando que se acumule un exceso de energía que debe eliminarse por otras vías, como el incremento en la biosíntesis de metabolitos secundarios[15]. En este sentido, se ha observado que en el maíz los cambios más notables se dieron en aminoácidos, azúcares y ácidos orgánicos[16], metabolitos utilizados por la planta para intentar vencer el estrés osmótico que ocasiona la falta de agua.

Diferentes estudios llevados a cabo con plantas del género *Hypericum* han demostrado una clara relación entre la falta de agua y el incremento de la síntesis de moléculas con interés medicinal. En plantas de *Hypericum polyanthemum* sometidas durante dos semanas a estrés por sequía, la concentración de Uliginosin B, un derivado fenólico al que se le atribuyen propiedades antinociceptivas[17] y antidepresivas[18], aumentó hasta 40 veces con respecto a los niveles hallados en las plantas del grupo de control[19].

Al cultivar plantas de *Salvia officinalis* en condiciones de sequía durante ocho semanas, Nowak *et al.* [20] observaron un aumento medio de un 33% en la concentración de monoterpenos, como el alcanfor y el eucalipitol.

De forma similar, un significativo aumento de la concentración de flavonoides y saponinas de interés medicinal en *Stellaria dichotoma* fue reportado tras 90 días de sequía controlada[21].

Anegamiento

El exceso de agua también puede resultar muy dañino para las plantas. El anegamiento durante periodos prolongados provoca condiciones de hipoxia, que provoca un gran estrés en las raíces, inhibiendo la asimilación del carbono y el uso de fotosintatos[22], lo que conlleva la acumulación de sustancias como manitol, betaína o prolina con el fin de compensar la osmolaridad.

En cultivos de adormidera (*Papaver somniferum*) en los que se estudió el efecto del anegamiento sobre los alcaloides de la planta, se observó que las cantidades de morfina y codeína aumentaron en un 46% y 48% respectivamente[23].

Salinidad

Una elevada salinidad en el suelo provoca una gran variedad de respuestas bioquímicas y fisiológicas que afectan a casi todos los procesos de las plantas. Una de las estrategias de defensa para minimizar los daños producidos por el estrés salino es incrementar la síntesis de metabolitos osmoprotectores[24] y sustancias antioxidantes[25].

Fatima *et al.* [26] reportaron un aumento significativo de la síntesis de vinblastina y vincristina, dos alcaloides usados actualmente en el tratamiento de muchos tipos de cáncer[27], en cultivos de vinca de Madagascar (*Catharanthus roseus*) sometidos a pequeños niveles de salinidad. En un estudio similar, también se observó una mayor concentración de dichos alcaloides tras varios meses de riego con agua salada[28].

Un aumento de la salinidad en el medio durante treinta días favoreció notablemente la acumulación de flavonoides de gran interés medicinal y alimenticio[29] en las hojas de Cártamo (*Carthamus tinctorius*)[30].

En *Mentha piperita*, el contenido de ácidos fenólicos se duplicó y la concentración de aceite esencial incrementó un 35% con respecto al grupo de control tras dos meses de estrés salino[31]. Asimismo, el contenido de aceite esencial en las flores de *Calendula officinalis*, que posee propiedades antibióticas y antifúngicas[32], también se vio aumentado al ser cultivada en un ambiente salino[33].

Radiación UV

Frente a un exceso de radiación UV, las plantas acumulan sustancias como flavonoides, antocianinas, alcaloides, carotenoides o cumarinas con el fin de protegerse del daño oxidativo generado[34].

Catorce días de estrés por radiación UV-B y UV-C lograron aumentar significativamente en los dos casos la cantidad de artemisinina acumulada en las hojas e inflorescencias de *Artemisia annua*[35], molécula de la que derivan los principales fármacos utilizados actualmente en el tratamiento de la malaria[36].

Podemos encontrar resultados similares en el estudio realizado por Luis *et al.*[37] en el que se exponía a radiación UV-B durante dos semanas a plantas de romero (*Rosmarinus officinalis*). En él, se demuestra que en este caso la síntesis de ácido carnósico y rosmarínico (dos potentes antioxidantes[38,39]) fue muy superior con respecto al grupo de control.

La síntesis de flavonoides y antocianinas se vio incrementada en un 47% y 59% respectivamente al someter a un suplemento de radiación ultravioleta-B a plantas de lino (*Linum usitatissimum*)[40]. De igual modo, en cultivos de bufera (*Withania somnifera*) también se observaron notables aumentos en la concentración de alcaloides, flavonoides, antocianinas y saponinas[41].

Un destacable aumento en la cantidad de taxol presente en las hojas de *Taxus chinensis* fue observado tras una exposición de tres meses a radiación UV-B[42]. Un hallazgo especialmente relevante, puesto que el taxol es un fármaco anticancerígeno muy difícil de producir por síntesis química y su extracción de la planta es el método más viable económicamente[27,43].

Estrés mecánico

Diferentes factores como el movimiento provocado por el viento, la lluvia al caer, o el daño producido por herbívoros también provoca cambios en el metabolismo de las plantas.

Se demostró que, tras dañar cada 6 horas con un escalpelo plantas de mostaza marrón (*Brassica juncea*), los niveles de glucosinolatos presentes se habían duplicado a las 24 horas[44]. Similares resultados obtuvieron Costa *et al.* con el árbol del jabón (*Quillaja brasiliensis*), en el que la concentración de saponinas de interés medicinal aumentó en más de un 50%[45].

Otra forma de estrés mecánico es el resultado de someter a las plantas a ultrasonidos de baja intensidad durante unos pocos minutos. Un incremento de hasta un 75% en la concentración de saponinas presentes en *Panax ginseng* se reportó tras un minuto de exposición a ultrasonidos[46]. Asimismo, la concentración de resveratrol, conocido por ser un excelente antioxidante[47], contenida en cacahuetes se incrementó de 0.48 a 3.96 $\mu\text{g/g}$ de peso seco tras una exposición de 4 minutos a estrés por ultrasonidos[48].

Cabe destacar que la elicitación por estrés abiótico también puede afectar negativamente a los cultivos. Uno de los problemas que encontramos es que, mientras que la producción de cierto metabolito aumenta drásticamente, otros sufren un notable descenso de su síntesis en una misma planta. Por otro lado, la principal desventaja es que el estrés en muchos casos provocó un notable descenso en el crecimiento de las plantas y por tanto en la cantidad total de biomasa obtenida (Tabla 1).

Hemos de señalar que en muchos de los estudios consultados se habla de la concentración del metabolito, pero no se dan datos sobre el peso de las plantas elicitadas, ni la diferencia del peso con las del grupo de control. Esto nos hace imposible saber si el aumento de la concentración representaba realmente una mayor cantidad de producto frente al obtenido en las plantas que mantuvieron un crecimiento normal, pero tenían una concentración menor de producto

Tabla 1. Efecto de diferentes elicitores en la producción de metabolitos secundarios y su efecto en el crecimiento de la planta.

Especie	Producto	Factor abiótico	Δ producto (%)	Δ biomasa (%)	Referencia
<i>Hypericum perforatum</i>	Hiperforina	Sequía	100	-10	[13]
<i>Salvia officinalis</i>	Monoterpenos	Sequía	33	-10	[20]
<i>Papaver somniferum</i>	Morfina	Anegamiento	46	---	[23]
<i>Mentha piperita</i>	Fenoles	Salinidad	120	-84	[31]
<i>Artemisia annua</i>	Artemisinina	UV-C	17.5	-40	[35]
<i>Ginko biloba</i>	Bilobálicos	Ozono	220	---	[49]
<i>Artemisia annua</i>	Artemisinina	Congelación	45	---	[50]
<i>Dioscorea bulbifera</i>	Diosgenina	Metal (Cu)	727	-54	[51]
<i>Catharantus roseus</i>	Ajmalicina	Calor	100	---	[52]
<i>Panax ginseng</i>	Saponinas	Metal (Se)	31	+31	[53]

El “priming” o primado de plantas aparece como una posible solución al problema de la pérdida de crecimiento. Este consiste en una exposición inicial a un estímulo estresante, con la que la planta queda preparada para defenderse, actuando de una manera más rápida y eficaz frente a un segundo estímulo de estrés [54]. Gracias al primado se consigue mitigar parte de daño sufrido durante el estrés de la elicitación, por lo que el crecimiento de la planta y su biomasa final no se verían tan afectadas.

El Grupo de Biología Vegetal aplicada, con quien he colaborado en la realización de este TFG, ha desarrollado conjuntamente con el Consejo Superior de Investigaciones Científicas varias sustancias capaces de aumentar de manera natural las defensas de las plantas. Un ejemplo es la Menadiona Sodio Bisulfito (MSB), que como demuestra un estudio realizado por Jiménez-Arias *et al.*[55], es capaz de aumentar mediante el primado en semilla la tolerancia de *Arabidopsis* a la salinidad, gracias a la acumulación de prolina, mejorando considerablemente su crecimiento bajo estrés.

A pesar de ser un fenómeno ampliamente evidenciado en las últimas décadas, y aunque todavía no se conoce bien cómo actúan los mecanismos moleculares de defensa[55–58], el primado parece tener un prometedor futuro junto al campo de la elicitación en la obtención de mayores cantidades de metabolitos secundarios de interés.

Conclusiones

La gran demanda de productos naturales con fines terapéuticos, junto con la baja concentración a la que estos se encuentran en las plantas, pone de manifiesto la necesidad de encontrar nuevas formas de aumentar la producción, que permitan satisfacer una demanda que va en aumento.

La fisiología vegetal del estrés, como hemos visto, es un campo muy interesante para aumentar las concentraciones de compuestos con interés farmacológico. Así, la elicitación mediante diferentes factores de estrés abióticos ha demostrado ser una técnica capaz de aumentar considerablemente la concentración de metabolitos secundarios de interés medicinal presentes en los cultivos. Lamentablemente, este aumento de concentración se acompaña en demasiadas ocasiones de un descenso en el crecimiento, provocando la pérdida de biomasa.

Técnicas como el primado podrían suponer un gran avance a la hora de superar los efectos adversos que provoca el estrés en las plantas durante la elicitación, aunque todavía son necesarias muchas investigaciones que nos permitan conocer realmente cómo funcionan estos mecanismos.

Bibliografía

1. Hoareau L, DaSilva EJ. Medicinal plants: A re-emerging health aid. Vol. 2, Electronic Journal of Biotechnology. 1999. p. 56–70.
2. Cragg GM, Pezzuto JM. Natural Products as a Vital Source for the Discovery of Cancer Chemotherapeutic and Chemopreventive Agents. In: Medical Principles and Practice. 2016. p. 41–59.
3. OMS. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023. Organ Mund la Salud. 2013;
4. Fowler MW. Plants, medicines and man. Vol. 86, Journal of the Science of Food and Agriculture. 2006. p. 1797–804.
5. Osbourn AE, Lanzotti V. Plant-derived natural products: Synthesis, function, and application. Plant-derived Natural Products: Synthesis, Function, and Application. 2009. 1-597 p.
6. Bhalla R, Narasimhan K, Swarup S. Metabolomics and its role in understanding cellular responses in plants. Vol. 24, Plant Cell Reports. 2005. p. 562–71.
7. Ramachandra Rao S, Ravishankar GA. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. Vol. 20, Biotechnology Advances. 2002. p. 101–53.
8. Zabala A, Velásquez A, Juliana M, Cardona A, Maria A, Manuel J, et al. Estrategias Para Incrementar La Producción De Metabolitos Secundarios En Cultivos De Células Vegetales. RevFacNalAgrMedellín. 2009;62:4881–95.
9. Pérez-Alonso N, Jiménez E. Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo in vitro. Biotechnol Veg. 2011;11(4):195–211.
10. Shakya P, Marslin G, Siram K, Beerhues L, Franklin G. Elicitation as a tool to improve the profiles of high-value secondary metabolites and pharmacological properties of *Hypericum perforatum*. J Pharm Pharmacol. 2017;
11. Ramakrishna A, Ravishankar GA. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. Plant Signal Behav. 2011;6(11):1720–31.
12. Radman R, Saez T, Bucke C, Keshavarz T. Elicitation of plants and microbial cell systems. Biotechnol Appl Biochem [Internet]. 2003;37(1):91. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1042/BA20020118>
13. Zobayed SMA, Afreen F, Kozai T. Phytochemical and physiological changes in the leaves of St. John's wort plants under a water stress condition. Environ Exp Bot. 2007;59(2):109–16.

14. Zanolli P. Role of hyperforin in the pharmacological activities of St. John's Wort. *CNS Drug Rev.* 2004;10(3):203–18.
15. Selmar D, Kleinwächter M. Stress enhances the synthesis of secondary plant products: The impact of stress-related over-reduction on the accumulation of natural products. *Plant Cell Physiol.* 2013;54(6):817–26.
16. Michaletti A, Naghavi MR, Toorchi M, Zolla L, Rinalducci S. Metabolomics and proteomics reveal drought-stress responses of leaf tissues from spring-wheat. *Sci Rep.* 2018;8(1).
17. Stolz ED, Viana AF, Hasse DR, von Poser GL, do Rego JC, Rates SMK. Uliginosin B presents antinociceptive effect mediated by dopaminergic and opioid systems in mice. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry* [Internet]. 2012;39(1):80–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pnpbp.2012.05.012>
18. Stein AC, Viana AF, Müller LG, Nunes JM, Stolz ED, Do Rego JC, et al. Uliginosin B, a phloroglucinol derivative from *Hypericum polyanthemum*: A promising new molecular pattern for the development of antidepressant drugs. *Behav Brain Res* [Internet]. 2012;228(1):66–73. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2011.11.031>
19. de Matos Nunes J, Bertodo LOO, da Rosa LMG, Von Poser GL, Rech SB. Stress induction of valuable secondary metabolites in *Hypericum polyanthemum* acclimatized plants. *South African J Bot* [Internet]. 2014;94:182–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sajb.2014.06.014>
20. Nowak M, Kleinwächter M, Manderscheid R, Weigel HJ, Selmar D. Drought stress increases the accumulation of monoterpenes in sage (*Salvia officinalis*), an effect that is compensated by elevated carbon dioxide concentration. Vol. 83, *Journal of Applied Botany and Food Quality*. 2010. p. 133–6.
21. Zhang W, Cao Z, Xie Z, Lang D, Zhou L, Chu Y, et al. Effect of water stress on roots biomass and secondary metabolites in the medicinal plant *Stellaria dichotoma* L. var. *lanceolata* Bge. *Sci Hortic (Amsterdam)* [Internet]. 2017;224(July):280–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2017.06.030>
22. Wei W, Li D, Wang L, Ding X, Zhang Y, Gao Y, et al. Morpho-anatomical and physiological responses to waterlogging of sesame (*Sesamum indicum* L.). *Plant Sci.* 2013;208:102–11.
23. Szabó B, Lakatos Á, Kőszegi T, Kátay G, Botz L. Thin-layer chromatography-densitometry and liquid chromatography analysis of alkaloids in leaves of *papaver somniferum* under stress conditions. *J AOAC Int.* 2005;88(5):1571–7.

24. Nemoto Y, Sasakuma T. Differential stress responses of early salt-stress responding genes in common wheat. *Phytochemistry*. 2002;61(2):129–33.
25. Munns R, Tester M. Mechanisms of Salinity Tolerance. *Annu Rev Plant Biol* [Internet]. 2008;59(1):651–81. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911>
26. Fatima S, Mujib A, Tonk D. NaCl amendment improves vinblastine and vincristine synthesis in *Catharanthus roseus*: a case of stress signalling as evidenced by antioxidant enzymes activities. *Plant Cell Tissue Organ Cult*. 2015;121(2):445–58.
27. Moraes DFC, de Mesquita LSS, do Amaral FMM, de Sousa Ribeiro MN, Malik S. Anticancer drugs from plants. In: Malik S, editor. *Biotechnology and Production of Anti-Cancer Compounds* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2017. p. 121–42. Available from: https://doi.org/10.1007/978-3-319-53880-8_5
28. Wang JY, Liu ZP. Alkaloid Accumulation in *Catharanthus roseus* Increases with Addition of Seawater Salts to the Nutrient Solution. *Pedosphere* [Internet]. 2010;20(6):718–24. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1002-0160\(10\)60062-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1002-0160(10)60062-8)
29. Preedy V V., Ross Watson R, Vinood P. Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention. *Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention*. 2011.
30. Gengmao Z, Yu H, Xing S, Shihui L, Quanmei S, Changhai W. Salinity stress increases secondary metabolites and enzyme activity in safflower. *Ind Crops Prod* [Internet]. 2015;64(1):175–81. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.10.058>
31. Çoban Ö, Göktürk Baydar N. Brassinosteroid effects on some physical and biochemical properties and secondary metabolite accumulation in peppermint (*Mentha piperita* L.) under salt stress. *Ind Crops Prod*. 2016;86:251–8.
32. Arora D, Rani A, Sharma A. A review on phytochemistry and ethnopharmacological aspects of genus *Calendula*. *Pharmacogn Rev* [Internet]. 2013;7(14):179. Available from: <http://www.phcogrev.com/text.asp?2013/7/14/179/120520>
33. Khalid KA, Teixeira da Silva JA. Yield, essential oil and pigment content of *Calendula officinalis* L. flower heads cultivated under salt stress conditions. *Sci Hortic (Amsterdam)* [Internet]. 2010;126(2):297–305. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2010.07.023>
34. Sharma M, Sharma A, Kumar A, Basu SK. Enhancement of secondary metabolites in cultured plant cells through stress stimulus. *Am J Plant Physiol*. 2011;6(2):50–71.

35. Rai R, Meena RP, Smita SS, Shukla A, Rai SK, Pandey-Rai S. UV-B and UV-C pre-treatments induce physiological changes and artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. - An antimalarial plant. *J Photochem Photobiol B Biol* [Internet]. 2011;105(3):216–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2011.09.004>
36. White NJ. Sulfadoxine-pyrimethamine for the treatment of malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1991;85(4):556–7.
37. Luis JC, Pérez RM, González FV. UV-B radiation effects on foliar concentrations of rosmarinic and carnosic acids in rosemary plants. *Food Chem.* 2006;101(3):1211–5.
38. Birtić S, Dussort P, Pierre FX, Bily AC, Roller M. Carnosic acid. *Phytochemistry.* 2015;115(1):9–19.
39. Alagawany M, Abd El-Hack ME, Farag MR, Gopi M, Karthik K, Malik YS, et al. Rosmarinic acid: Modes of action, medicinal values and health benefits. *Anim Heal Res Rev.* 2017;18(2):167–76.
40. Tripathi R, Agrawal SB. Evaluation of changes in lipid peroxidation, ROS production, surface structures, secondary metabolites and yield of linseed (*Linum usitatissimum* L.) under individual and combined stress of ultraviolet-B and ozone using open top chambers. *Indian J Biochem Biophys.* 2013;50(4):318–25.
41. Takshak S, Agrawal SB. Secondary metabolites and phenylpropanoid pathway enzymes as influenced under supplemental ultraviolet-B radiation in *Withania somnifera* Dunal, an indigenous medicinal plant. *J Photochem Photobiol B Biol* [Internet]. 2014;140:332–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.08.011>
42. Zu Y gang, Pang HH, Yu JH, Li DW, Wei XX, Gao YX, et al. Responses in the morphology, physiology and biochemistry of *Taxus chinensis* var. *mairei* grown under supplementary UV-B radiation. *J Photochem Photobiol B Biol* [Internet]. 2010;98(2):152–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2009.12.001>
43. Ramesh, H. L., Sivaram & Yogananda Murthy VN. *World Journal of Pharmaceutical Research.* 2014;3(6):320–43.
44. Augustine R, Bisht NC. Biotic elicitors and mechanical damage modulate Glucosinolate accumulation by co-ordinated interplay of glucosinolate biosynthesis regulators in polyploid *Brassica juncea*. *Phytochemistry* [Internet]. 2015;117(1):43–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.05.015>

45. de Costa F, Yendo ACA, Fleck JD, Gosmann G, Fett-Neto AG. Accumulation of a bioactive triterpene saponin fraction of *Quillaja brasiliensis* leaves is associated with abiotic and biotic stresses. *Plant Physiol Biochem* [Internet]. 2013;66:56–62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.02.003>
46. Lin L, Wu J, Ho KP, Qi S. Ultrasound-induced physiological effects and secondary metabolite (saponin) production in *Panax ginseng* cell cultures. *Ultrasound Med Biol*. 2001;27(8):1147–52.
47. Oh WY, Shahidi F. Antioxidant activity of resveratrol ester derivatives in food and biological model systems. *Food Chem*. 2018;261:267–73.
48. Rudolf JR, Resurreccion AVA. Elicitation of resveratrol in peanut kernels by application of abiotic stresses. *J Agric Food Chem*. 2005;53(26):10186–92.
49. HE X, HUANG W, CHEN W, DONG T, LIU C, CHEN Z, et al. Changes of main secondary metabolites in leaves of *Ginkgo biloba* in response to ozone fumigation. *J Environ Sci*. 2009;21(2):199–203.
50. Feng LL, Yang RY, Yang XQ, Zeng XM, Lu WJ, Zeng QP. Synergistic re-channeling of mevalonate pathway for enhanced artemisinin production in transgenic *Artemisia annua*. *Plant Sci*. 2009;177(1):57–67.
51. Narula A, Kumar S, Srivastava PS. Abiotic metal stress enhances diosgenin yield in *Dioscorea bulbifera* L. cultures. *Plant Cell Rep*. 2005;24(4):250–4.
52. Ten Hoopen HJG, Vinke JL, Moreno PRH, Verpoorte R, Heijnen JJ. Influence of temperature on growth and ajmalicine production by *Catharantus roseus* suspension cultures. *Enzyme Microb Technol*. 2002;30(1):56–65.
53. Jeong GT, Park DH. Enhanced secondary metabolite biosynthesis by elicitation in transformed plant root system: Effect of abiotic elicitors. *Appl Biochem Biotechnol*. 2006;130(1–3):436–46.
54. Conrath U, Beckers GJM, Flors V, García-Agustín P, Jakab G, Mauch F, et al. Priming: Getting Ready for Battle. *Mol Plant-Microbe Interact* [Internet]. 2006;19(10):1062–71. Available from: <http://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/MPMI-19-1062>
55. Borges AA, Jiménez-Arias D, Expósito-Rodríguez M, Sandalio LM, Pérez JA. Priming crops against biotic and abiotic stresses: MSB as a tool for studying mechanisms. *Front Plant Sci* [Internet]. 2014;5(November):1–4. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2014.00642/abstract>
56. Ibrahim EA. Seed priming to alleviate salinity stress in germinating seeds. *J Plant Physiol* [Internet]. 2016;192:38–46. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2015.12.011>

57. Gebremedhn Y, Berhanu A. The role of seed priming in improving seed germination and seedling growth of maize (*Zea mays* L.) under salt stress at laboratory conditions. *African J Biotechnol* [Internet]. 2013;12(46):6484–90. Available from: <http://academicjournals.org/journal/AJB/article-abstract/50168B541740>
58. Aloui H, Souguir M, Latique S, Hannachi C. Germination and Growth in Control and Primed Seeds of Pepper as Affected by Salt Stress. *Cercet Agron Mold* [Internet]. 2014;47(3):83–95. Available from: <http://content.sciendo.com/view/journals/cerce/47/3/article-p83.xml>