



Steviol glucosides production in *Stevia rebaudiana* bertonii root culture

Producción de glucosidos de esteviol a partir de raíces *in vitro* de *Stevia rebaudiana* bertonii

Itzel Vianney Alvarado-Orea^{1,2}, Mauro Montes-Palmeros^{1,2}, Ileana Vera-Reyes^{3,4}, Ricardo Hugo Lira-Saldívar⁴, Patricia Pavón-Orozco⁵, *Ariana Arlene Huerta-Heredia^{1,6}.

¹Laboratorio de Cultivo de Células Vegetales, Instituto de Biotecnología, ²División de Estudios de Posgrado, Universidad del Papaloapan, Tuxtepec, Oax. C. P. 68301.

³Catedrática CONACyT-CIQA, ⁴Departamento de Plásticos en la Agricultura, Centro de Investigación en Química Aplicada, Saltillo, Coah., CP 25294. ⁵Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Veracruzana, campus Coatzacoalcos, Ver., CP 96538., ⁶Catedrática CONACyT-UNPA.

*e-mail: aahuertahe@conacyt.mx

ABSTRACT

Stevia rebaudiana is a medicinal plant native to Brazil and Paraguay, it is well known for its high accumulation of steviol glucosides (SG), mainly stevioside (St) and rebaudioside A (Reb A), which are tastes about 300 times sweeter than sucrose. In this work was evaluated the growth and accumulation of SG in roots of *S. rebaudiana*. The maximum biomass and St production was 10.24 mg/L and 4 mg_{St}/g after 20 days of culture. Furthermore, the addition of 5 ppm (T1) and 15 ppm (T2) of ZnO nanoparticles (NPs ZnO) increased, both St and Reb A production by 1.5, 4.7-fold and 4.7-6.4-fold respectively in comparison to control cultures (2.7mg_{St}/g, and 6.1 mg_{RebA} /g).

Keywords: *Stevia rebaudiana*, root culture, NPs ZnO

RESUMEN

Stevia rebaudiana Bertoni es una planta medicinal originaria de Brasil y Paraguay, que se caracteriza por la acumulación de glucósidos de esteviol (GE), entre los que se encuentran el esteviósido (Est) y rebaudiósido A (Reb A), los cuales son hasta 300 veces más dulces que la sacarosa. En este trabajo se evaluó el crecimiento y acumulación de GE en raíces de *S. rebaudiana*. La biomasa y la producción máxima fueron de 10.24 mg/L y 4 mg/g. de Est a los 20 días de cultivo. Además, la adición de dos concentraciones 5 ppm (T1) y 15 ppm (T2) de nanopartículas de ZnO (NPs ZnO) incrementaron 1.5 y 4.7 veces Est; 4.7 y 6.4 veces Reb A respectivamente, comparadas al control (6.1 mg_{Reb A}/g y 2.7 mg_{Est}/g).

Palabras clave: *Stevia rebaudiana*, cultivo de raíces, NPs ZnO

1. INTRODUCCIÓN

Stevia rebaudiana Bertoni es una planta herbácea perenne, perteneciente a la familia de las Asteráceas, nativa de la región de Amambay, en el noreste de Paraguay, también se produce en las zonas limítrofes de Brasil y Argentina (Soejarto, 2002). La importancia comercial de *S. rebaudiana* es la acumulación de glucósidos de esteviol (GE) como el esteviósido (Est) y rebaudiosido A (Reb A), que son hasta 300 veces más dulces que la sacarosa (Das *et al.*, 2011). En la planta las mayores concentraciones de GE se acumulan en las hojas, reportándose del 5-10% de Est, 2-4% de Reb A, 1-2% de rebaudiósido C y 0.4-0.7% de dulcósido A (Soejarto *et al.* 1983; Melis *et al.*, 2009). Además de tener capacidad edulcorante, se han demostrado que los extractos de *Stevia rebaudiana* tienen propiedades medicinales regulando la glucosa en sangre, por lo que son aptos para consumo en personas diabéticas (Shivanna *et al.*, 2012). El esteviol y sus derivados tienen capacidad citotóxica contra leucemia (línea celular HL60), cáncer de pulmón (A549), cáncer de estómago (AZ521) y cáncer de mama en dos líneas celulares (SK-BR-3 y MCF-7) (Ukiya *et al.*, 2013 y Paul *et al.*, 2012). Sin embargo, la producción de estos compuestos en la planta no es constante, ya que, durante el proceso de floración, el contenido total de GE disminuye hasta en un 50%, siendo la principal limitación para la obtención de los metabolitos por cultivo tradicional. El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* son un conjunto de técnicas que permiten el cultivo, en condiciones asépticas, de órganos, tejidos, células o protoplastos de diversas plantas empleando medios nutritivos artificiales (Villalobos y Thorpe, 1991). Una estrategia para incrementar la producción de metabolitos secundarios en cultivos *in vitro* es el empleo de elicitores (Yukimune *et al.*, 1996; Zhao *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2004). El termino elicitor (biótico o abiótico) es cualquier tipo de estimulador de la producción de metabolitos secundarios, los cuales pueden activarse a través de producción de especies reactivas de oxígeno y de la respuesta hipersensible (Mittler, 2002; Edreva *et al.*, 2008). Por otro lado, el uso de nuevas tecnologías está teniendo cada vez más protagonismo en la vida cotidiana del ser humano, un ejemplo de ello es la nanotecnología, que es la encargada de la manipulación y aplicación directa de materiales de tamaño nanométrico, con el fin de construir productos y la explotación de fenómenos (RS & RAE, 2004). La nanotecnología (NT) tiene diversas aplicaciones en la agricultura y la biotecnología, en las que ya se incorporan a las disciplinas de agronanotecnología y nanobiotecnología; estas combinan el procesamiento químico, ciencia de los materiales, ingeniería de sistemas y disciplinas ambientales. El uso de nanopartículas (NPs) metálicas ha empezado a tener un efecto significativo en las principales áreas de la industria de alimentos. En la agricultura, su uso ha sido más teórico; sin embargo, en plantas, se han utilizado para combatir las infecciones patogénicas, como suplementos de nutrientes o como reguladores de crecimiento (Thul *et al.*, 2013). El objetivo de este trabajo fue evaluar el crecimiento, la producción de Est y Reb A por la adición de y la influencia de nanopartículas de ZnO (NPs ZnO) en cultivos de raíces de *Stevia rebaudiana* Bertoni.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Cultivo de Células Vegetales, en la Universidad del Papaloapan. Circuito Central #200, 68301, Colonia Parque Industrial, Tuxtepec, Oax.

2.1. Establecimiento del cultivo

Para el establecimiento de cultivo en medio líquido, se inocularon matraces Erlenmeyer con raíces provenientes de medio semisólido (Alvarado-Orea *et al.*, 2014), conteniendo 50 mL de medio MS al 50% (Murashige y Skoog, 1962), suplementado con 2% (p/v) de sacarosa y 0.5 mg/L de ácido indolbutírico (IBA). El pH del medio se ajustó a 6.3 previo a esterilizarse. Los cultivos se mantuvieron en fotoperiodo 16/8 h luz/oscuridad a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ y a 110 rpm en agitación orbital. Se realizaron subcultivos cada 15 días para el mantenimiento de la línea

2.2. Cinética de crecimiento

Se utilizó medio de cultivo MS a la mitad (Murashige y Skoog, 1962), suplementado con 2% (p/v) de sacarosa y 0.5 mg/L de ácido indolbutírico (IBA). El inóculo fue del 2% de peso fresco (p/v) de raíces. Los cultivos se mantuvieron a luz continua $30 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$, temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ y 110 rpm de agitación orbital. La toma de muestra se llevó a cabo separando la biomasa del medio del cultivo cada tercer día durante 25 días. Para la determinación del peso seco la muestra se colocó en una estufa de secado a 60°C hasta llegar a peso constante.

2.3. Tratamiento de elicitación

Las NPs ZnO se sintetizaron por un método de química verde descrito por Vera-Reyes *et al.*, 2015, en el CIQA. Las NPs ZnO se adicionaron a matraces Erlenmeyer con 50 mL de medio de cultivo líquido, en concentraciones finales de 5 ppm (T1) y 10 ppm (T2), los medios de cultivo después de adicionar las NPs ZnO se sonicaron durante 30 min, el pH se ajustó a 6.3 previo a esterilizarse. Los matraces se inocularon con 2% (p/v) de raíces, la toma de muestra se realizó 5 días después de la aplicación. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado.

2.4. Extracción de GE

Las raíces, tanto de la cinética como las tratadas con las NPs ZnO, se llevaron a sequedad y se pulverizaron. La extracción de GE se realizó con MeOH-H₂O (80:20) en una relación de 10 mL por gramo de biomasa (Bondarev *et al.*, 2001), la suspensión resultante se dejó incubar por 24h. Posteriormente, se centrifugó a 10 000 rpm por 5 min, los sobrenadantes obtenidos de cada una de las muestras fueron secados a peso constante, para su posterior cuantificación.

2.5. Cuantificación por HPLC

El extracto de raíces, se resuspendió en acetonitrilo-H₂O (70:30 v/v) (Dey *et al.*, 2013) previo a su cuantificación. Con este fin, se usó cromatografía en fase reversa y un detector de fotodiodos (Perkin-Elmer Flexar-10 PDA), usando una columna analítica C-18 (PerkinElmer). La identificación de Reb A y Est se comprobó comparando sus espectros de absorción UV y se cuantificaron usando una curva de calibración construida con estándares Reb A (1432- Sigma Aldrich) y Est (50956-Sigma Aldrich).

3. RESULTADOS

3.1. Cinética de crecimiento y producción

En la **Fig. 1** se muestra la cinética de crecimiento del cultivo *in vitro* de raíces *Stevia rebaudiana*, donde se observa que en los primeros 10 días la producción de Est se mantuvo estable, alrededor de 2.7 mg/g, mientras que la biomasa incrementó 1.3 veces con respecto al inoculo. La máxima biomasa obtenida fue a los 20 días con 10.24 mg/L. El incremento en la biomasa fue 5.5 veces mayor con respecto al inoculo inicial. Por otro lado, entre los 15-20 días se alcanzó la máxima producción de Est (4 mg/g.).

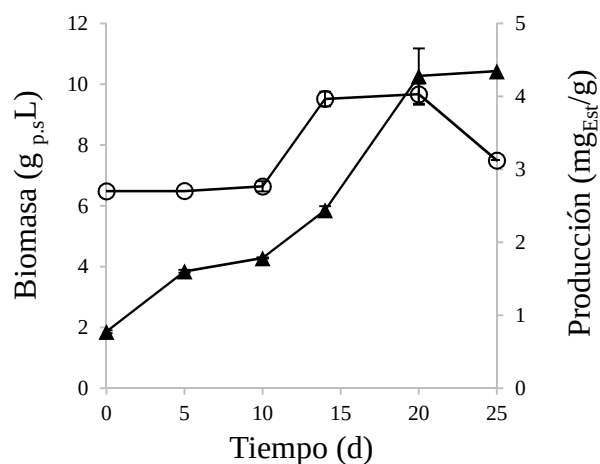


Fig. 1. Cinética de crecimiento (▲) y producción de Est (○) en un cultivo *in vitro* de raíces de *Stevia rebaudiana*.

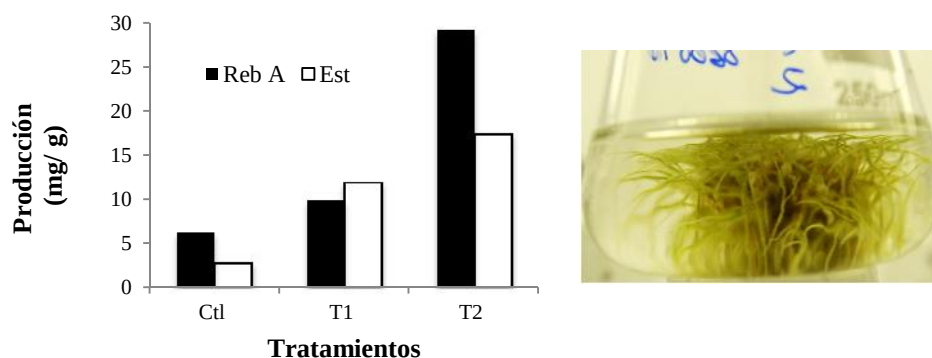


Fig. 2. A) Producción de GE: Reb A y Est. **B)** Cultivo de raíces *in vitro* de *Stevia rebaudiana*

3.2. Efecto de las NPs ZnO en la acumulación de GE.

El uso de elicitores bióticos o abióticos para estimular la producción de compuestos de interés se ha convertido en una estrategia importante ya que en poco tiempo se pueden alcanzar altas concentraciones de metabolitos secundarios (Cai *et al.*, 2011). En la **Fig. 2** se muestra el efecto de la acumulación de GE en el cultivo de raíces de *Stevia rebaudiana* observándose que con T1, la producción de Reb A y Est fueron 1.5 veces y 4.7 veces más que el control respectivamente. Mientras que, para T2, se acumuló 4.7 y 6.4 veces con respecto al control ($6.1 \text{ mg}_{\text{Reb A}}/\text{g}$ y $2.7 \text{ mg}_{\text{Est}}/\text{g}$).

4. DISCUSIÓN

El cultivo de raíces *in vitro* es un sistema biotecnológicamente atractivo para la producción de compuestos de interés comercial, debido a que por su grado de especialización y organización celular pueden acumular cantidades considerables de metabolitos secundarios (Doran, 2002; Srivastava y Srivastava, 2007).

Existen trabajos previos sobre la propagación de *Stevia*, Reis *et al.*, 2011 establecieron cultivos de raíces adventicias de *Stevia rebaudiana* en sistema de frasco-rotatorio, donde el crecimiento de las raíces incrementó 12 veces a la cuarta semana y 16 veces a la quinta. Sin embargo, las raíces presentaron coloración marrón, flacidez y eran quebradizas, concluyendo que a las 4 semanas era el periodo apropiado para realizar resiembras. Además, observaron que las raíces no fueron capaces de acumular Est y ningún otro GE. De igual forma, Yamazaki y Flores 1991, reportaron ausencia de GE en extractos metanólicos de cultivo de raíces pilosas de *S. rebaudiana*. Rajasekaran *et al.*, en 2007 compararon en cultivos *ex vitro* e *in vitro* de *Stevia rebaudiana* la acumulación de GE en hojas, brotes y raíces, teniendo como resultado que en hojas *ex vitro* la producción de Est fue 0.20 mg/g , en las hojas *in vitro* no encontraron Est, y en las raíces *ex vitro* como en las *in vitro* tampoco se encontró acumulación de Est. Kumar *et al.*, 2012 comparó la producción de GE en hoja, tallo y raíz de plantas de 1-6 meses de edad de *S. rebaudiana*, teniendo como resultado que la mayor producción fue en plantas de 3 meses con un 37% de

contenido de GE. La producción de GE tanto en tallo como en raíz, teniendo como referencia la producción en hoja, fue de 78% y 52% para Est respectivamente, el contenido de RebA en tallo fue de 7%, en la raíz no fue detectado.

Hasta el momento, en la literatura no se reportan trabajos de elicitation en cultivos *in vitro* de raíces de *Stevia rebaudiana*. Existen trabajos de elicitación en raíces de otros géneros, como Vera-Reyes *et al.*, (2013) reportaron que, en raíces de *Uncaria tomentosa*, la producción de alcaloides oxindol monoterpénicos, 3 α -dihidrocadambina y dolicanósido se incrementaron debido al estrés oxidativo provocado por la adición de H₂O₂. Al día 8 la producción reportada fue de 1.7, 2.1, y 2.3 veces más con respecto al control. Además, la adición de sulfoximina de la butionina (BSO) y ácido jasmónico (JA) incrementó la producción de alcaloides 2 veces más que los cultivos tratados con H₂O₂. Por otro lado, Zaker *et al.*, 2015, compararon el efecto de diferentes elicitors como: extracto de levadura, metil jasmonato, nitrato de plata y sorbitol; a distintas concentraciones, sobre la producción de criptotanshinona y tanshinona IIA, en cultivos de raíces adventicias de *Perovskia abrotanoides*, obteniendo la mayor producción de criptotanshinona con extracto de levadura (200 mg/L) y de nitrato de plata (25 μ M) a los 7 días de exposición de los elicitors. En cultivo de raíces de *Podophyllum peltatum*, se evaluó la adición de 10, 20 y 30 μ M de metil jasmonato; la mejor concentración utilizada para el incremento en la producción de podofilotoxina fue 20 μ M, con un incremento en la producción de 2 veces (0.588 mg/g). Anbazhagan *et al.*, (2008) concluyeron que la adición de metil jasmonato mejora notablemente la producción de podofilotoxina. En el caso de cultivo de raíces de *Panax ginseng* en biorreactor se estimuló la producción de ginsenósidos con la adición de cobre a 5, 10, 25 y 50 μ M, donde se observó que la síntesis de saponinas fue estimulada a concentraciones entre 5-25 μ M, pero a 50 μ M decreció a partir de los 20 días. Ali *et al.*, 2006 concluyeron que la tolerancia de las raíces de *Panax ginseng* al Cu⁺² es debido a su capacidad de absorber hasta cierto punto iones metálicos. Kim *et al.*, 2012 reportaron que las NPs metálicas aplicadas a *C. sativus* causan estrés oxidativo y disminución del crecimiento al incrementar la concentración de estas NPs. La adición de dos concentraciones de NPs ZnO a los cultivos de raíces de *Stevia rebaudiana* incrementaron la producción de Est y Reb A (Fig 2A), dicho incremento pudiera ser mediado via estrés oxidativo como un mecanismo de defensa para mantener el equilibrio redox.

En este trabajo se muestra que el cultivo de raíces de *Stevia rebaudiana* es un sistema capaz de acumular Est y Reb A, siendo un sistema atractivo para la producción de dichos metabolitos de interés comercial y medicinal. Además, las raíces fueron capaces de responder a condiciones de estrés al agregarse NPs ZnO, lo que provocó un incremento en la concentración de ambos compuestos.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca otorgada 571516 y a los proyectos 3212 Cátedra 183958, CB 183958 e INFRA 255514. A Estefania del Carmen Urdiana Arteaga por su apoyo técnico en el análisis y cuantificación de muestras en el HPLC.

CONFLICTO DE INTERESES

No existen conflictos de interés.

REFERENCIAS

Ali, M. B., Hahn, E. J., & Paek, K. Y. (2006). Copper-induced changes in the growth, oxidative metabolism, and saponin production in suspension culture roots of *Panax ginseng* in bioreactors. *Plant cell reports*, 25(10), 1122-1132.

Anbazhagan, V. R., Ahn, C. H., Harada, E., Kim, Y. S., & Choi, Y. E. 2008. Podophyllotoxin production via cell and adventitious root cultures of *Podophyllum peltatum*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 44(6), 494-501.

Bondarev N., Nosov A. & Reshetnyak O. 2001. Peculiarities of diterpenoid steviol glycoside production in in vitro cultures of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Plant Science*, 161: 155-163.

Cai, Z., Riedel, H., Thaw, S. N. M., Kutuk, O., Mewis, I., Jager, H., Knorr, D. & Smetanska, I. 2011. Effects of pulsed electric field on secondary metabolism of *Vitis vinifera* L. cv. *Gamay freaux* suspension culture and exudates. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 164, 443–453

Das A., Gantait S. & Mandal, M. 2011. Micropropagation of an Elite Medicinal Plant: *Stevia rebaudiana* Bert. *International Journal of Agricultural Research*. Mohanpur, India. 6 (1): 40-48.

Dey A, Kundu S, Bandyopadhyay A. & Bhattacharjee A. 2013. Efficient micropropagation and chlorocholine chloride induced stevioside production of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Comptes Rendus Biologies*, 336:17-28.

Doran, P. M. 2002. Properties and applications of hairy-root cultures. En: Oksman-Caldenty K.-M. y Barz W.H., eds. *Plant biotechnology and transgenic plants*. New York, Mercel Dekker Inc. 143-162.

Edreva A., Velikova V., Tsonev T., Dagnon S., Grüel A., L. Aktas L. & Gesheva E. 2008. Stress-protective role of secondary metabolites: diversity of functions and mechanisms. *Gen. Appl. Plant Physiol.* 34:67-78.

Ileana Vera-Reyes, Ariana A. Huerta-Heredia, Teresa Ponce-Noyola, Isvelt Josefina Flores-Sanchez and Fernando Esparza-García. 2013. Strictosidine-Related Enzymes Involved in the Alkaloid Biosynthesis of *Uncaria tomentosa* Root Cultures Grown Under Oxidative Stress. *Biotechnol. Prog.*, 2013, Vol. 29, No. 3.

Itzel V. Alvarado-Orea, Raquel M. Matias-Alvárez., Mauro Montes-Palmeros., Ángel Cárdenas-Cágal., Jacqueline Capataz-Tafur., David Paniagua-Vega., Ariana A. Huerta-Heredia. Establecimiento de cultivos *in vitro* de *Stevia rebaudiana* Bertoni. XI Simposio

Internacional de Biotecnología vegetal, Instituto de Biotecnología de las Plantas Universidad Central “Marta Abreu” cayo Santa María, Villa Clara, Cuba, 2014.

Kim, S., Lee, S. & Lee, I. 2012. Alteration of phytotoxicity and oxidant stress potential by metal oxide nanoparticles in *Cucumis sativus*. Water, Air, & Soil Pollution, 223: 2799-2806.

Kumar, H., Kaul, K., Bajpai-Gupta, S., Kaul, V. K., & Kumar, S. 2012. A comprehensive analysis of fifteen genes of steviol glycosides biosynthesis pathway in *Stevia rebaudiana* (Bertoni). Gene, 492(1), 276-284

Melis M. S., Rocha S. T. & Augusto A. 2009. Steviol effect, a glycoside of *Stevia rebaudiana*, on glucose clearances in rats. Braz. J. Biol. 69(2): 371-74.

Mittler R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends Plant Sci. 7:405-410.

Murashige T. & Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.

Paul S., Sengupta S., Bandyopadhyay T. K. & Bhattacharyya A. 2012. Stevioside induced ROS-mediated apoptosis through mitochondrial pathway in human breast cancer cell line MCF-7. Nutr Cancer. 64:1087-1094. doi: 10.1080/01635581.2012.712735.

Rajasekaran T., Giridhar P. & Ravishankar G. A. 2007. Production of Steviosides *in vitro* and *ex vitro* grown. J. Sci. Food Agric. 87: 420-424.

Reis, R. V., Borges, A. P. P. L., Chierrito, T. P. C., de Souto, E. R., de Souza, L. M., Iacomini, M., & Gonçalves, R. A. C. 2011. Establishment of adventitious root culture of *Stevia rebaudiana* Bertoni in a roller bottle system. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 106(2), 329-335.

RS & RAE (Royal society & The Royal Academy of Engineering). 2004. Nanoscience and Nanotechnologies opportunities and uncertainties, Londre, The Royal Society & The Royal Academy of Engineering.

Shivanna N., Naika M., Khanum F. & Kaul V. K. 2012. Antioxidant, anti-diabetic and renal protective properties of *Stevia rebaudiana*. J Diabetes Complications. 27(2):103-13

Soejarto, D. D., Compadre, C. M., Medon, P. J., Kamath, S. K. & Kinghorn, A. D. 1983. Potential sweetening agents of plant origin. II. Field search for sweet-tasting *Stevia* species. Econ. Bot., 37, 71–79.

Soejarto, D. 2002. Botany of *Stevia* and *Stevia rebaudiana*. In A. Kinghorn (Ed.), *Stevia: The genus Stevia* (pp. 18-39). London, New York: Taylor and Francis.

Srivastava S. & Srivastava A. K. 2007. Hairy root culture for mass production of high-value secondary metabolites. *Crit. Rev. Biotechnol.* 27, 29–43.

Thul, S., Sarangi, K., & Avatar, P. 2013. Nanotechnology in Agrosystem: Implications on Plant Productivity and its Soil Environment. *Expor Opin Environ Biol*, 2:

Ukiya M., Sawada S., Kikuchi T., Kushi Y., Fukatsu M. & Akihisa T. 2013. Cytotoxic and apoptosis-inducing activities of steviol and isosteviol derivatives against human cancer cell lines. *Chem Biodivers.* 10:177-188. doi: 10.1002/cbdv.201200406.

Vera-Reyes I, Ponce-Zambrano R; Lira-Saldívar RH.; Ruiz-Torres NA; Méndez-Arguello B; Mendoza-Mendoza, E.; García-Cerda, LA. 2015. Efecto de nanopartículas de óxido de zinc y cobre en germinación y crecimiento de plántulas de *Solanum lycopersicum* y *Cucumis melo*. In: Sánchez-Vázquez M., Sánchez-Castro M.E., Fernández-Luqueño F. (Eds.). *Encuentro de Química Inorgánica (EQI-2015)*. Cinvestav, México. Pp. 160.

Villalobos V. M., Thorpe T. A. 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. CIAT. Capítulo 6: 127-141.

Yamazaki T. & Flores H. E. 1991. Examination of steviol glycoside production by hair root and shoot cultures of *Stevia rebaudiana*. *J Nat Prod* 54:986–992

Yukimune Y., Tabata H., Higashi Y. & Hara Y. 1996. Methyl Jasmonate-induced overproduction of paclitaxel and baccatin III in *Taxus* cell suspension cultures. *Nature biotechnol.* 14:1129-1132.

Zaker, A., Sykora, C., Gössnitzer, F., Abrishamchi, P., Asili, J., Mousavi, S. H., & Wawrosch, C. (2015). Effects of some elicitors on tanshinone production in adventitious root cultures of *Perovskia abrotanoides* Karel. *Industrial Crops and Products*, 67, 97-102.

Zhang C., Yan Q., Cheuk W. & Wu J. 2004. Enhancement of tanshinone production in *Salvia miltiorrhiza* hairy root culture by Ag elicitation and nutrient feeding. *Plant med.* 70: 147-151.

Zhao J., Davis L. C. & Verpoorte R. 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances. Review.* 23: 283-333.