A. Parsaeimehr[1], B. Mousavi[2]

INFLUENCE OF ORGANIC FACTORS ON THE GROWTH OF *DATURA STRAMONIUM* IN *IN VITRO* TISSUE CULTURE

[1] *G.S.Davtyan Institute of Hydroponics Problems NAS RA*
[2] *Zabol University of Islamic Republic of Iran*

Introduction. The role of organic factors in tissue culture is so complicated. In some plant tissue cultures they are vital and in others they are not. *Dutura stramounium* L. from Solanaceae is one of the important plants which is used in the industrial drug because of its rich alkaloid substances. *Dutura stramounium* alkaloids have too many variable effects on eyes, nervous system, heart and blood circulation. So by the base of this information it's clear that organic factors have valid roles in callus culture for suspension and production of secondary metabolites in bioreactors and extracting substance like Atropine, Heuciamin and Scopolamine. Plant tissue and cell culture media are generally made up of some or all of the following components: macronutrients, micronutrients, vitamins, amino acids or other nitrogen supplements, sugar(s) and other undefined organic supplements, solidifying agents or support systems, and growth regulators. Several media formulations are commonly used for the majority of all cell and tissue culture work. Organic factors in *in vitro* tissue culture except sugar as a source of energy or agar as a supporter for tissue culture or 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid), NAA (1-naphthaleneacetic acid) as an auxin or 6-BA (6-benzyladenin) as a cytokine are essential for plant tissue culture but several organic factors have been considered necessary for tissue cultures. It is known by experts that the plant is able to biosynthesize the organic necessary substances for its vitality. This fact suggests that even cultured cells may not require any organic constituent except sugar as an energy source. Actually in the media so far available for tissue culture various organic constituents have been added such as vitamins, amino acids, nucleic acids, hormones and/or natural extracts such as yeast extract, coconut milk etc., besides an energy source and inorganic nutrients (Butenko, 1964; Murashige and Skoog, 1962; Shono, 1972; White, 1954; Yeoman, 1973). Addition of a wide variety of organic extracts to culture media often results in favorable tissue responses. Supplements that have been tested include protein hydrolysates, coconut milk, yeast extracts, malt extracts, ground banana, orange juice, and tomato juice. However, undefined organic supplements should only be used as a last resort, and only coconut milk and protein hydrolysates are used to any extent today (Demeyer, 1988). Protein (casein) hydrolysates are generally added to culture media at a concentration of 0,05-0,1%, while coconut milk is commonly used at 5-20% (v/v) (Demeyer, 1993).

Even in the medium by MS (Murashige and Skoog 1962) thiamine-HCl and myo-inositol are used as organic constituents. From the point of the original properties of the plant cells themselves, the thiamine-HCl and myo-inositol are not supposed to be required for tissue culture. In this aim we used these nutrients in our study in this experiment for *Datura stramonium* tissue culture.

Materials and Methods. Seed disinfection: Seeds of *Datura stramonium* L used in this experiment are sterilized in 0,1% $HgCl_2$ and 1,0% SDS for 3 min, and placed on half-strength MS (Murashing and Skoog 1962) medium with 0,8% agar for germination the incubation condition for *in vitro* culture, should be adjusted on 25± 1° C and 16 h photoperiod of approximately 28$\mu Em^{-2}s^{-1}$, the hypocotyls used as explants from the seeds with 3cm length.

Callus induction, subcultures & organic factors: The complete medium consisting of mineral salts of MS (1965), 100mg/l of myo-inositol, 0,5mg/l of thiamine-

HCl, 2,0mg 2,4-D, 3,0~o sucrose and 1,0~o agar was applied in this experiment. Cultured on the complete medium in the dark at 25°C for 5 months tissue was transplanted every month. Three pieces of callus 30±0,1g were transferred into a 100ml Erlenmeyer flask with 50ml of medium and incubated for one month in the dark at 25°C and the fresh weight of callus in each flask was determined after harvesting and comparing together for obtaining the results.

Results and Discussion. Results were presented as the average of 15 replications for each treatment. As it is shown in table 1, the absence of thiamine-HCl or myo-inositol caused the decrease amount in the growth of the *Datura stramonium* callus which was cultured on the complete medium with thiamine-HCl and myo-inositol for 8 months. Well according to this result it's suggested that thiamine-HCl and myo-inositol are thought to be necessary for the growth of the callus.

But the callus that was cultured on the medium without thiamine-HCl or myo-inositol for one month before the test could grow even on the medium without thiamine-HCl or myo-inositol at almost the same rate as the growth on the complete medium (table 1, 2). These results suggest that *Datura stramonium* callus originally requires neither thiamine-HCl nor myo-inositol for its growing process (Butenko, 1964).

Table 1

Effect of myo-inositol absence on the growth of Datura's callus

Medium used for test	Fresh weight of callus, g	In percent
Complete	3,45	100
Myo-inositol	3,35	97,1

Table 2

Effect of thiamin –HCl absence on the growth of Datura's callus

Medium used for test	Fresh weight of callus g	In percent
Complete	3,84	100
Thiamin –HCl	3,96	103,12

So in this aim, consequently the callus was cultured on a medium without either thiamine-HCl or myo-inositol for a term of about five months and growth was then compared with the one on the complete medium. As shown in table 4, the growth of this callus on the medium without thiamine-HCl and myo-inositol showed 89,5% of that on the complete medium. According to this result we can suggest that no organic factor is required for the growth of *Datura stramonium* callus except sugar as an energy source, agar as a tissue supporter and 2,4-D as an auxin. These three are thought to be essential for tissue culture for *Datura stramonium.*

From this fact, the results obtained in Table 3 are considered to be the degeneration of the ability to biosynthesize thiamine-HCl and myo-inositol which occurs in the callus during its long term subculture on the medium with thiamine-HCl and myo-inositol. These degenerated abilities are restored by culturing the callus in a medium without thiamine-HCl and/or myo-inositol. The callus becomes capable to grow without thiamine-HCl and/or myo-inositol as observed in fallowing tables.

Table 3

Effect of absence of thiamin-HCl or myo-inositol on the growth of Datura's callus

Medium used for test	Fresh weight of callus, g	In percent
Complete	3,40	100
Thiamine-HCl	0,82	24,11
Myo-inositol	0,78	22,94

The results described clearly show that organic nutrient requirements for growth of callus are closely related to the culture histories of the callus. This correlation may be understood by an interpretation based on the changing ability to biosynthesize organic nutrients during culture of the callus. For example, in the case of the thiamine nutrient, when the callus is cultured on the medium with thiamine, the callus does not need to biosynthesize thiamine. Then during the long term culture with thiamine, the ability to biosynthesize thiamine may become lower and in some cases completely degenerate. The callus which lost the ability cannot grow without thiamine and requires it. But when the callus continued to be cultured without thiamine, it must biosynthesize thiamine to continue to live. The ability may be restored and the callus begins to synthesize it. Once it is again supplied sufficiently by biosynthesis, the callus no longer requires added thiamine and continues to grow even without thiamine in the culture medium (Toyoyuki, 1974).

Table 4

Effect of absence of both thiamine-HCl and myo-inositol on the growth of Datura's callus

Medium used for test	Fresh weight of callus (g)	In percent
Complete	3,64	100
Thiamin –HCl and myo-inositol	3,26	89,5

Conclusion. According to our results it seems that by ascending the period time of callus vitality, the callus alleviates its requirements to the organic factors. For instance callus cultured in thiamine nutrient tissue culture on the medium with thiamine-HCl, the callus doesn't need to biosynthesize thiamine. Then during the long term culture with thiamine, the ability to biosynthesize thiamine is lost. The callus which lost the ability cannot grow without thiamine and requires it but after subculturing the callus of *Datura stramonium* L it can synthesize the organic factors which we apply in this experiment.

Ա. Փարսեյմեյր[1], Բ. Մուսավի[2]

ՕՐԳԱՆԱԿԱՆ ԳՈՐԾՈՆՆԵՐԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ՍՈՎՈՐԱԿԱՆ ԱՐՋԸՆԿՈՒՅԶԻ ԱՃԻ ՎՐԱ ՀՅՈՒՍՎԱԾՔԱՅԻՆ *IN VITRO* ՄՇԱԿՈՒՅԹՈՒՄ

[1]ՀՀ ԳԱԱ Գ.Ս.Դավթյանի անվան հիդրոպոնիկայի պրոբլեմների ինստիտուտ
[2]Իրանի Իսլամական Հանրապետության Զաբոլ համալսարան

Ամփոփում

In vitro կուլտուրայի սննդամիջավայրում օրգանական էքստրակտների հավելումները հաճախ առաջ են բերում հյուսվածքների ցանկալի ռեակցիա: Այդ նպատակով մենք փորձարկել ենք արջընկույզը (*Dutura stramounium* L.), բժշկական արդյունաբերության մեջ բույսի կարևոր նշանակության և ալկալոիդների պարունակության շնորհիվ: Այս գիտափորձում կիրառվել են երկու օրգանական գործոններ՝ թիամին-HCL և միո-ինոսիտոլը: Մեր նպատակն էր պարզել օրգանական գործոնների դերը և կարևորությունը հյուսվածքային մշակույթում: Այս առումով որպես էքսպլանտ օգտագործվել են արջընկույզի սերմերից ստացված 3սմ երկարությամբ հիպոկոտիլները, իսկ որպես օրգանական գործոններ՝ 100մգ/լ միո-ինոսիտոլ և 0,5մգ/լ թիամին-HCL: 30±0,1գ երեք կտոր կալուս տեղադրվել է 100մլ էրլենմեյերի կոլբաների մեջ, 50մլ սննդամիջավայրի պարունակությամբ և ինկուբացվել է մութ միջավայրում՝ 25°C-ում: Յուրաքանչյուր կոլբայի մեջ կալուսի մաքուր քաշը որոշվել է բերքից հետո և համեմատվել միմյանց հետ: Որպես արդյունքներ յուրաքանչյուր մշակման համար ներկայացվել են 15 կրկնողությունների միջին տվյալները: Սննդամիջավայրում թիամին-HCL և միո-ինոսիտոլի բացակայությունը հանգեցրել է արջընկույզի կալուսի աճի նվազեցմանը, որը 8 ամիս շարունակ մշակվել էր թիամին-HCL և միո-ինոսիտոլի լիարժեք

սննդամիջավայրում: Այս արդյունքների համաձայն առաջարկվեց, որ թիամին-HCL և մի-ինոսիտոլը անհրաժեշտ են կալուսի աճի համար: Բայց սկզբնական կալուսը, որը մեկ ամիս շարունակ, նախքան փորձը, մշակվել էր առանց թիամին-HCL և մի-ինոսիտոլ սննդամիջավայրում, աճել է գրեթե նույն արագությամբ, ինչպես լիարժեք միջավայրի մեջ աճածը, նույնիսկ այնպիսի սննդամիջավայրում, որտեղ չկար կամ թիամին-HCL, կամ մի-ինոսիտոլ: Այս առումով հաստատված արդյունքները համարվում են որպես թիամին-HCL և մի-ինոսիտոլի կենսասինթեզի կարողության դեգեներացիա, որոնք տեղի են ունենում կալուսի մեջ թիամին-HCL և մի-ինոսիտոլով սննդամիջավայրում երկարաժամկետ մշակման ընթացքում: Այս դեգեներացիոն կարողությունները վերականգնվում են առանց թիամին-HCL և մի-ինոսիտոլով սննդամիջավայրում կալուսի հետագա մշակման ժամանակ: Կարողությունը կորցրած կալուսը չի կարող աճել առանց թիամին-HCL և մի-ինոսիտոլի և պահանջում է այն: Բայց, երբ կալուսը շարունակում են մշակել առանց թիամին-HCL և մի-ինոսիտոլի, այն պետք է սինթեզի, որպեսզի շարունակի ապրել և կարողությունը կարող է վերականգնվել, երբ կալուսը սկսի սինթեզել այն: Քանի որ այն արդեն նորից մատակարարվում է կենսասինթեզով, կալուսին այլևս անհրաժեշտ չէ թիամին-HCL-ի հավելումները և այն շարունակում է աճել նույնիսկ առանց թիամին-HCL կուլտուրայի սննդամիջավայրում:

References

Alikaridis F., D. Papadakis, K. Pantelia, and T. Kephalas. Flavonolignan production from *Silybum marianum* transformed and untransformed root cultures / Fitoterapia, 2000, **71**: p. 379-384.

Anderson L.A., Hay C.A., Roberts M.F., and Phillipson J.D. Studies on *Ailanthus altissima* cell suspension cultures / Plant Cell Rep. 1986, **5**: p. 387-390.

.Butenko R.G. Nutrition of tissue culture. In: M. Artman, translated into English, *Plant Tissue Culture and Plant Morphogenesis,* Israel Program for Scientific Translations, Jerusalem, 1964, p. 23-53.

Demeyer, K., Dejaegere R., Influence of nitrogen on the alkaloid content of *Datura stramonium* / Acta Horticulture, 1993 , p: 331, 35- 38.

Demeyer K, Dejaegere R., Influence of the ion balance in the growth medium in the yield and alkaloid content of *Datura stramonium* plant and soil , 1989, 114 : 2 , p. 289- 294.

Demeyer K ., Dejaegere R., Influence of the mineral nutrition on yield and alkaloid content in *Datura stramonium*, medelingen van de Faculteit , 1988, 53 : Ta , p. 1723 - 1725 .

Gontier E, Sangwan B.S., Barbotin J .N., Effects of calcium, alginate and calcium – alginate immobilization on growth and tropane alkaloid levels of a stable suspension cell line of *Datura innoiax* / Plant cell Reports, 1994 ,13 : 9 , p. 533 - 536.

Lissinr E.M. and Skoog F. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures / Physiol. Plant. 1965, 18: 100-127.

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

Smith J.I., Smart N.J., Misawa M., Kurz W.G.W., Tallevi S.G., and DiCosmo F. Increased accumulation of indole alkaloids by some cell lines of *Catharanthus roseus* in response to addition of vanadyl sulphate / Plant Cell Rep. 1987, **6**: p. 142-145.

Smollny T., Wichers H., De Rijk T., Van Zwam A., Shasavari A., and Alfermann A.W. Formation of lingams in suspension cultures of *Linum album* / Planta Med. Suppl. 1992, **58**: A622

Shono K. Constituents of medium for plant tissue culture. *In:* Takeuchi M., Ishihara I. and Furuya T., ed., *Plant Tissue Culture,* Asakura-shoten Co. Ltd., Tokyo (In Japanese), 1972, p. 50-85.

Toyoyuki N., Requirement of Organic Factors for the Growth of *Ephedra* Tissues Cultured *in Vitro* / *Bot. Mag.* Tokyo 1974, 87: p. 337-340.

Yeoman M.M. Tissue (callus) cultures techniques. *In:* H.E. Street, ed., *Plant Tissue and Cell Culture.* Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1973, p. 31-58.

White P.K. Nutrients. In: *The Cultivation of Animal and Plant Cells,* The Ronald Press Company, New York. 1954, p. 71-96.