

КУЛТУРА ТКИВА И КРИОПРЕЗЕРВАЦИЈА КАО МЕТОДЕ ЗА ПОВЕЋАЊЕ ПРОДУКЦИЈЕ МАНГИФЕРИНА КОД БАЛКАНСКЕ ПЕРУНИКЕ (*IRIS REICHENBACHII* HEUFFEL)

Слађана Јевремовић¹, Дијана Крстић-Милошевић¹, Anna de Carlo², Carla Benelli², Lambardi M.², Драгана Антонић¹, Милана Трифуновић Момчилов¹, Милена Лојић¹, Ангелина Суботић¹

¹Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, Универзитет у Београду,
Булевар деспота Стефана 142, 11060 Београд, Србија

²CNR, National Research Council of Italy, IVALSA (Istituto per la Valorizzazione del Legno e Specie Arboree), 50019 Sesto Fiorentino, Firenze, Italy

Abstract

JEVREMOVIĆ Slađana, DIJANA KRSTIĆ-MILOŠEVIĆ, ANNA DE CARLO, CARLA BENELLI, M. LAMBARDI, DRAGANA ANTONIĆ, MILANA TRIFUNOVIĆ MOMČILOV, MILENA LOJIĆ, ANGELINA SUBOTIĆ: PLANT TISSUE CULTURE AND CRYOPRESERVATION AS A METHODS FOR IMPROVEMENT OF MANGIFERIN PRODUCTION OF BALKAN IRIS (*IRIS REICHENBACHII* HEUFFEL) [¹University of Belgrade, Institute for Biological Research “Siniša Stanković”, Despota Stefana 142, 11060 Belgrade, Serbia; ²CNR, National Research Council of Italy, IVALSA (Istituto per la Valorizzazione del Legno e Specie Arboree), 50019 Sesto Fiorentino, Firenze, Italy]

We analysed the content of C-glycosylxanthone, mangiferin (1,3,6,7-tetrahydroxyxanthone-C2-β-D-glycoside) in different plant material of Balkan endemic iris (*Iris reichenbachii* Heuffel) by high performance liquid chromatography (HPLC) in plant material collected from natural habitat, regenerated by tissue culture, after cryopreservation and acclimatization in greenhouse and garden conditions. Mangiferin content in plant material collected from natural habitat (mountains Maljen, Suvobor and Rtanj) depended on geographic origin, as well as part of the plant. The highest content was recorded in arial part of the plants. Mangiferin production during zygotic embryo culture on media supplemented with 2,4-dichlorophenoxy acetic acid as the sole plant growth regulator tissue culture depended on the medium composition and level of tissue differentiation. The highest content of mangiferin during tissue culture *I. reichenbachii* was recorded in shoot cultures during induction of shoot organogenesis while in embryogenic callus cultures mangiferin were synthesized only in traces. Mangiferin content in shoot cultures regenerated after cryopreservation with droplet vitrification procedure were at the same level as in shoot cultures before cryopreservation. In plantlets acclimatized in the *ex vitro* conditions the highest content of mangiferin was recorded in arial part of the plant. Significantly higher amount of mangiferin was recorded than initial plants collected from natural habitat. In this paper we present results about possibilities of tissue culture and cryopreservation for mangiferin production in *I. reichenbachii* plants for their possible use as a raw material in the pharmaceutical industry without destroying natural habitat.

Key words: Iris, somatic embryogenesis, organogenesis, secondary metabolites, cryopreservation, HPLC

Сажетак

У раду су приказани резултати анализе садржаја мангиферина, (1,3,6,7-тетрахидроксиксантон-С2-β-D-гликозид) у различитом биљном материјалу балканске ендемичне перунике (*Iris reichenbachii* Neuffel). Помоћу методе течне хроматографије под великим притиском (HPLC), садржај мангиферина анализиран је у биљном материјалу сакупљеном на природним стаништима, током гајења у култури *in vitro*, као и у регенерисаним биљкама гајеним у условима *ex vitro* (стакленик и башта института). Код биљака сакупљених са природних станишта садржај мангиферина у биљном ткиву зависио је од биљног органа, као и од места где су биљке сакупљене. Током индукције регенерације биљака у култури *in vitro* применом културе зрелих зиготских ембриона на хранљивим подлогама обогаћеним са 2,4-дихидрофенокси сирћетном киселином продукција мангиферина у биљном ткиву зависила је од састава хранљиве подлоге као и од степена диференцијације ткива. Највећа продукција мангиферина током гајења у условима *in vitro* постигнута је током индукције формирања изданака док је најмања продукција мангиферина добијена у ембриогеним калусним културама где је забележена синтеза мангиферина само у траговима. После криопрезервације врхова изданака методом витрификације у капљици добијен је исти ниво синтезе мангиферина у изданцима, као и пре криопрезервације. Највећи садржај мангиферина уочен је у надземним деловима биљака регенерисаних у култури ткива и аклиматизованих на спољашње услове. Садржај мангиферина код биљака добијених применом ове методе био је знатно већи него код биљака сакупљених из природних станишта. У овом раду представљен је потенцијал техника културе ткива и криопрезервације у циљу *ex situ* заштите једне ендемичне биљне врсте као и потенцијал ових техника за производњу секундарних метаболита као што је мангиферин. Применом ових техника може се произвести овај секундарни метаболит за потребе фармацеутске индустрије, без уништавања биљног материјала са природног станишта.

Кључне речи: ирис, соматска ембриогенеза, органогенеза, секундарни метаболити, криопрезервација, HPLC

УВОД

Биљке су сесилни организми које поред основних једињења свог примарног метаболизма синтетишу и секундарне метаболите. Ови метаболити представљају велику групу органских једињења које производе биљке, а који нису неопходни за растење и развиће, већ је њихова улога значајна у интеракцији коју биљке имају са спољашњим факторима животне средине (Verpoorte и сар., 2002). Најзаступљенији секундарни метаболити биљака су фенолна једињења која се у зависности од структуре деле на С6 (једноставни феноли), С6-С1 (фенолне киселине и алдехиди), С6-С2 (ацетофенони, фенилсирћетне киселине), С6-С3 (хидроксициметна киселина, кумарини, полифенол-пропани, хромони), С6-С4 (нафтокинони), С6-С1-С6 (ксантони), С6-С2-С6 (стилбени, антрахинони), С6-С3-С6 (флавоноиди, изофлавоноиди, неофлавоноиди), (С6-С3-С6) 2,3 (би-, три-флавоноиди, проантоцијанидински димери, тримери), (С6-С3)₂ (лигнани, неолигнан), (С6-С3)_п (лигнини), (С6)_п (катехол-меланини, флоротанини), (С6-С3-С6)_п (кондезовани танини, Cheung и сар., 2013). Ова једињења имају различите функције код биљака у циљу превазилажења различитих видова биотичког и абиотичког стреса којима су биљке изложене током свог живота. Тако је на пример доказана улога флавоноида у заштити од сунчевог зрачења (Agati и сар., 2012) или салицилне киселине у имуном одговору биљака на напад патогена (An и Mou, 2011).

Поред функције које имају у биљкама многобројни секундарни метаболити показују и различите биолошке активности као што су лековита или алелопатска дејства

или се користе као боје или додаци храни (Wink, 1988, David и сар., 2015). Производња секундарних метаболита применом плантажног гајења биљака има много недостатака, а један од њих је слаб принос. Садржај посматраног метаболита такође може да варира због сезонских, географских или услова спољашње средине. Због свега тога, у последње време примењују се различите методе култура ткива за производњу биљака и методе криопрезервације за дуготрајно чување биљног материјала, чиме се омогућава континуално гајење и производња секундарних метаболита (Murthy и сар., 2014).

Врсте рода *Iris* (перунике) богате су секундарним метаболитима, пре свега флавоноидима и изофлавоноидима а на другом месту се налазе флавонони, кинони и ксантони (Kaššák, 2012, Kukula-Koch и сар., 2015). Продукција секундарних метаболита перуника применом метода културе ткива проучавана је до сада најчешће код хортикултурних врста као што су *I. pallida*, *I. germanica*, *I. pseudacorus*, *I. sibirica* и *I. ensata*, али у последње време проучавана је и продукција секундарних метаболита код неких ендемичних врста (Al-Gabbiesh и сар., 2006). Прва истраживања од пре више од 20 година показала су да је продукција ирона, тритерпенских кетона, значајних за производњу парфема могућа у култури ћелија код *I. sibirica* (Para и Baratti 1992). Код *I. germanica* и *I. pallida* Jéhan и сар. (1994) су показали да и у регенерисаним биљчицама долази до синтезе ирона, тако да су екстрахована етарска уља била истог састава као и код донорских биљака. Akashi и сар., (2005) показали су да у културама адвентивних коренова *I. germanica* долази до синтезе изофлавоноида, а у културама *I. ensata* пронађена су једињења која нису присутна у интактној биљци (Boltenkov и сар., 2005).

Главни ксантон, присутан често код перуника је жути С-гликозилксантон, мангиферин, (1,3,6,7-тетрахидроксиксантон-С2-β-D-гликозид), који је најчешће присутан заједно са изомангиферином и другим О-гликозидима (Iwashina и Ootani, 1998). Мангиферин и његови гликозиди карактеристично су присутни код „брадатих“ перуника које припадају подроду *Iris*, ретко се јављају у неким секцијама подрода *Limniris* док се у осталим подродовима не јављају (Bate-Smith и Harborne, 1963; Williams и сар., 1997; Shu и сар., 2009). Мангиферин је присутан у листовима код већине врста перуника, а код *I. nigricans* регистрован је у ризомима (Al-Khalil и сар., 1995) или као главни копигмент у цветовима (Bate-Smith и Harborne, 1963, Iwashina и сар., 1996). Препарат под називом Алпизарин користи се у Русији као антивирусно лековито средство за третман инфекције вирусом херпеса. Основна компонента је мангиферин пореклом из перуника (Minina и сар., 1999, 2001). Мангиферин се у лековите сврхе примењује као антиоксидант, имуномодулатор и антивирусни лек. Основна функција мангиферина лежи у његовој способности да уклони слободне радикале и на тај начин покаже свој протективни утицај на ткиво срца, бубрега, јетре и мозга од оксидативног оштећења изазваног претераном продукцијом реактивних кисеоничних молекула које производе перитонеалне макрофаге (Jiang и сар., 2004; Pinto и сар., 2005; Fotie и Bohle, 2006).

Објекат нашег истраживања је зеџја ружица, *Iris reichenbachii* Heuffel 1853, ендемична перуника на балканском полуострву (Стјепановић-Веселинчић, 1976, Шилић, 1990). У литератури се може наћи под синонимима *I. serbica* Pančić, 1856, *I. bosniaca* G. Back 1960, *I. balkana* Janka, 1960, *I. skorpilii* Velenovsky. У питању је вишегодишња патуљаста врста перунике која припада групи малих „брадатих“ перуника које су добиле такав назив због специфичних израштаја на својим цветовима. Присуство мангиферина у

листовима биљака сакупљених са природних станишта *I. reichenbachii* показано је у радовима Williams и сар., (1997), Iwashina и Ootany, (1998). Садржај мангиферина код биљака сакупљених са природних станишта са балканског полуострва (планина Суворор) зависи од биљног органа као и вегетативне фазе растења (Шавикин-Фодуловић и сар., 2000).

Досадашњи резултати на регенерацији биљака *I. reichenbachii* у култури *in vitro* представљени су у неколико радова Јевремовић и сар., (2000, 2006 а,б, 2015). За индукцију процеса морфогенезе *in vitro* код ове биљне врсте зиготски ембриони добар су избор почетних експлантата (Јевремовић и сар., 2000). Регенерација биљака успешно је добијена процесима соматске ембриогенезе и органогенезе у исто време и на истом индукционом третману (Јевремовић и сар., 2006 а,б). Биљке које су настале овим морфогенетским процесима већином су клонално идентичне, уз постојање неких промена у морфологији цветова биљака добијених процесом органогенезе и нивоа плоидности код биљака добијених процесом соматске ембриогенезе (Јевремовић и сар., 2015).

Висок садржај мангиферина код ове ендемичне врсте био нам је мотив за истраживање примене методе културе ткива и криопрезервације у циљу анализе продукције мангиферина и могуће употребе као сировине за добијање мангиферина без уништавања биљака из природних станишта.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Биљни материјал

Као биљни материјал за анализу садржаја мангиферина коришћени су листови, коренови и ризоми *I. reichenbachii* сакупљени са различитих локалитета у Србији (планине Суворор, Маљен и Ртањ). За истраживања регенерације биљака применом културе *in vitro* коришћена су семена биљака сакупљена на локалитету Дивчибаре, планина Маљен.

Регенерација биљака у култури ткива *in vitro*

Као полазни биљни материјал за успостављање асептичних култура коришћена су сува семена *I. reichenbachii*, која су прво испрана текућом водом а затим стерилисана према процедури објављеној у Јевремовић и сар., (2013). Као почетни експлантат за индукцију морфогенезе *in vitro* коришћени су зрели зиготски ембриони који су после изолације гајени на хранљивој подлози са 2,4-дихидрофенокси сирћетном киселином (2,4-D, 0-10 mg/l на светлости или у мраку када је дошло до формирања белог ембриогеног, зеленог органогеног и жутог неембриогеног калусног ткива. Индуковани ембриогени калус даље је гајен на хранљивој подлози са 2,4-D и кинетиним (KIN, 1,0 mg/l, сваки). Органогени калус затим је гајен на хранљивој подлози за индукцију изданака обогаћеном са α -нафтил-сирћетном киселином (NAA) и 6-бензиладенином (BA, 0,1 односно 1,0 mg/l). Соматски ембриони и изданци гајени су на хранљивој подлози без регулатора растења где је долазило до клијања ембриона односно оживљавања изданака. Потпуно формиране биљчице балканске патуљасте перунике даље су гајене до цветања у условима стакленика и башти Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ (ИБИСС) у Београду.

Криопрезервација врхова изданака

Криопрезервација врхова изданака вршена је коришћењем методе витрификације у капљици (droplet vitrification) применом хемијске дехидратације ткива помоћу витрификационог раствора 2 (plant vitrification solution, PVS2, Sakai и сар., 1990). Изданци су гајени две недеље у хладним условима (4°C) пре изолације врхова, а затим изоловани врхови су још два дана гајени на истој температури. Детаљна процедура криопрезервације овом методом описана је у раду Антонић и сар., (2014). После отапања врхова изданака изложених температури течног азота (-196°C), регенерисани изданци даље су гајени на подлози за умножавање изданака обогаћеној са NAA и BA.

Одређивање садржаја мангиферина у биљном материјалу

Концентрација мангиферина у биљном материјалу одређивана је помоћу методе течне хроматографије под великим притиском (HPLC). Узорци биљног материјала сушени су на собној температури и лиофилизовани и хомогенизовани пре екстракције метанолом у трајању од 48 сати на собној температури. Супернатант је филтриран кроз филтер са мембраном од 0,45 µm. Анализа је урађена на HPLC апарату Agilent series 1100 са DAD детектором, на Zorbax SB-C18 (Agilent) аналитичкој колони (150 mm x 4.6 mm, 5 µm). Мобилна фаза састојала се од раствора А (1 %, v/v раствор ортофосфорне киселине у води) и раствора В (ацетонитрил) уз кориштење следећег градијент елуирања: 95-90 % А 0-3 min, 90 % А 3-7 min, 90-60 % А 7-15 min, 60-0 % А 15-22 min. Апсорпциони спектар мангиферина карактеришу 4 апсорпциона максимума: 240, 258, 318 и 366 nm. Спектри су снимани на 260 и 320 nm са протоком 1 ml/min. Садржај мангиферина у узорцима одређен је упоређивањем са стандардном кривом и изражен као mg/g суве масе (с.м).

Анализа података

Приказани резултати представљају средњу вредност садржаја мангиферина добијену на основу три понављања. Сви подаци статистички су обрађени коришћењем ANOVA, а главне вредности поређене коришћењем теста најмање значајности (LSD тест).

РЕЗУЛТАТИ

Садржај мангиферина у биљном материјалу сакупљеном у природи

Анализиран је садржај мангиферина у биљном материјалу сакупљеном на природним стаништима са три локације, планина Маљен, Сувобор и Ртањ. Резултати анализе садржаја мангиферина у надземном делу стабла (изданака), подземном делу стабла (ризом) и корену биљака сакупљених са ова три локалитета приказани су у Табели 1.

Табела 1. Садржај мангиферина (mg/g с.м.) у различитим биљним деловима балканске ендемичне перунике, *I. reichenbachii* сакупљеним на природним стаништима

Биљни материјал	Географско порекло		
	Маљен	Сувобор	Ртањ
Изданци	21,52 ± 0,11 ^{a*}	8,13 ± 0,12 ^a	43,87 ± 0,38 ^b
Ризом	3,78 ± 0,05 ^b	-	39,79 ± 0,09 ^c
Коренови	1,62 ± 0,01 ^c	8,41 ± 0,02 ^a	53,46 ± 0,50 ^a

* Вредности представљају средњу вредност ± стандардну грешку. Вредности у оквиру једне колоне означене истим словом статистички се не разликују, p<0,05.

Из резултата се може видети да се садржај мангиферина драстично разликује у зависности од станишта биљака тј. њиховог географског порекла. Поред тога садржај мангиферина у биљном ткиву зависи и од биљног органа. Надземни делови биљака садрже највећу количину мангиферина (8,1-43,8 mg/g с.м) док је мања концентрација уочена у кореновима и ризому (Табела 1).

Садржај мангиферина у биљном материјалу током гајења у условима *in vitro*

Мангиферин се синтетише у малим количинама у ембрионом калусном ткиву током индукције морфогенезе *in vitro* на хранљивој подлози обогаченој са 2,4-D (1,0 mg/l, Табела 2, Слика 1А).

Табела 2. Садржај мангиферина у различитим биљним деловима балканске ендемичне перунике, *I. reichenbachii* током гајења у условима *in vitro*

Биљни материјал	Фаза <i>in vitro</i> културе	Састав хранљивих подлога	Услови гајења	Садржај мангиферина (mg/g с.м.)
Ембриогени калус	Индукција	2,4-D 1,0*	мрак	0,14 ± 0,03 ^{a**}
	Индукција	2,4-D 1,0	светлост	0,42 ± 0,02 ^a
	Умножавање	2,4-D + KIN 1,0, сваки	светлост	0,72 ± 0,02 ^a
Органогени калус	Диференцијација	2,4-D 0,1 → НАА 0,1+ ВА 1,0	светлост	2,35 ± 0,01 ^b
	Диференцијација	2,4-D 1,0 → НАА 0,1+ ВА 1,0	светлост	8,18 ± 0,04 ^d
	Диференцијација	2,4-D 2,0 → НАА 0,1+ ВА 1,0	светлост	10,45 ± 0,02 ^e
Култура изданака	Умножавање	НАА 0,1 + ВА 1,0	светлост	4,64 ± 0,07 ^c
Култура изданака	Умножавање после криопрезервације	НАА 0,1 + ВА 1,0	светлост	4,01 ± 0,02 ^c

*регулатори растења у mg/l, 2,4-D, 2,4-дихидрофенокси сирћетна киселина); KIN, кинетин; НАА α-нафтил-сирћетна киселина; ВА 6-бензиладенин; ** Вредности представљају средњу вредност ± стандардну грешку. Вредности у оквиру једне колоне означене истим словом статистички се не разликују, p≤0,05.

Мангиферин се у калусном ткиву синтетише у знатно мањој количини (0,14 mg/g с.м.) када се калусне културе гаје у условима мрака, него када се гаје на светлости (0,42 mg/g с.м.). Током фазе умножавања калуса на подлози са 2,4-D и Кинетин (1,0 mg/l сваки) долази до повећања синтезе мангиферина у калусима (0,72 mg/g с.м.). Током индукције морфогенезе *in vitro* долази и до формирања органогеног калуса у коме долази до синтезе мангиферина само у траговима док се гаји на подлогама које садрже 2,4-D. Значајно повећање синтезе мангиферина је уочено после месец дана гајења органогеног калуса на подлогама за индукцију пупољака које садрже НАА и ВА (Табела 2). Резултати показују да је добијена јасна зависност продукције мангиферина и хранљиве подлоге односно степена диференцираности органа. Синтеза мангиферина смањена је током гајења на подлози са 2,4-D док у органогеном калусу гајеном на подлози са НАА и ВА на којој долази до формирања пупољака, долази и до повећане синтезе мангиферина (Табела 2, Слика 1Б). Највећа продукција мангиферина (10,45 mg/g с.м) током гајења у условима *in vitro* балканске патуљасте перунике уочена је у органогеном калусу гајеном месец дана на подлози са НАА и ВА после индукције на хранљивој подлози са 2,0 mg/l 2,4-D. Садржај мангиферина у изданцима током фазе умножавања износио је 4,64 mg/g с.м. Способност производње мангиферина очувана је после криопрезервације, јер је утврђена слична

концентрација и у изданцима регенерисаним после криопрезервације врхова изданака и дуготрајног чувања на температури течног азота (Табела 2, Сlike 1Ц-Е).

Садржај мангиферина у биљном материјалу током гајења у условима *ex vitro*

Анализа мангиферина урађена је и код биљака регенерисаних соматском ембриогенезом и органогенезом после годину дана гајења у условима стакленика (Сlike 1Ф и 1Г) као и у башти ИБИСС (Сlike 1 Х). Резултати ових анализа приказани су у Табели 3.

Табела 3. Садржај мангиферина у различитим биљним деловима балканске ендемичне перунике, *I. reichenbachii* током гајења у условима *ex vitro*

Биљни материјал	Део биљке	Садржај мангиферина (mg/g с.м.)
<i>Ex vitro</i> биљке гајене у условима стакленика регенерисане соматском ембриогенезом	Изданак	17,04 ± 0,11 ^{f*}
	Корен	2,34 ± 0,05 ^b
	Ризом	0,49 ± 0,07 ^a
<i>Ex vitro</i> биљке гајене у условима стакленика регенерисане органогенезом	Изданак	15,21 ± 0,04 ^e
	Корен	15,79 ± 0,08 ^f
	Ризом	8,75 ± 0,12 ^a
<i>Ex vitro</i> биљке гајене у башти Института ИБИСС	Изданак	11,19 ± 0,07 ^d
	Корен	8,75 ± 0,33 ^c
	Ризом	0,45 ± 0,05 ^a

* Вредности представљају средњу вредност ± стандардну грешку. Вредности у оквиру једне колоне означене истим словом статистички се не разликују, $p \leq 0,05$.

Садржај мангиферина највећи је у изданцима затим кореновима док је најмањи садржај мангиферина уочен у ризомима. Код свих анализираних биљака уочено је повећање продукције мангиферина у изданцима у односу на биљке које су сакупљене у природи (Табеле 1 и 3).



Слика 1. Умножавање биљака културом ткива *in vitro* и криопрезервација балканске перунике.

А Култура зрих зиготских ембриона и формирање ембриогеног калуса.

Б Органогени калус са изданцима Ц Врхови изданака у капљици PVS2 раствора током осмотске дехидратације ткива пре криопрезервације Д Регенерација попољака месец дана после одмрзавања из течног азота Е Културе изданака после криопрезервације Ф Регенерисане биљчице током гајења у условима стакленика Г Биљке гајене у стакленику пре анализе мангиферина Х Цветале биљке током гајења у башти ИБИСС.

ДИСКУСИЈА

Из података у литератури познато је да се мангиферин карактеристично јавља код брадатих перуника (Iwashina и Ootani, 1998). У првим објављеним радовима наводи се да се код *I. reichenbachii* мангиферин синтетише само у листовима (Bate-Smith и Harborne, 1963; Williams и сар., 1997). На основу прве фитохемијске анализе биљака сакупљених са подручја Балкана (Сувобора) Шавикин-Фодуловић и сар., (2000) показано је да се мангиферин код *I. reichenbachii* синтетише и у другим деловима биљке (цвет, плод и

ризом) као и да садржај мангиферина варира током сезоне са највећим садржајем у биљкама сакупљеним у јуну. У овом раду смо показали да се мангиферин синтетише и у кореновима. Поред тога, садржај мангиферина у биљкама *I. reichenbachii* варира и у зависности од географског порекла тј. услова станишта где су биљке расле. Значајно највећи садржај мангиферина уочен је у свим деловима биљака сакупљеним на планини Ртањ. Сама чињеница да је садржај мангиферина толико варијабилан код биљног материјала сакупљеног из природе, где се концентрација мангиферина може разликовати и до пет пута у надземним деловима, док је у осталим деловима тај однос и већи, указује на потребу развијања новог начина за производњу биљака са константним и предвидљивијим садржајем секундарног метаболита кога желимо да истражујемо. Као добра алтернатива јавља се култура ћелија, ткива и органа као метод за масовну производњу биљака, а самим тим и добрим извором сировина за изоловање активних компоненти секундарних метаболита (Murthy и сар., 2014).

Према нашим сазнањима, резултати приказани у овом раду представљају прве резултате истраживања садржаја мангиферина у биљном материјалу током гајења у условима *in vitro* неке врсте перуника. Процес индукције морфогенезе *in vitro* као и комплетне регенерације биљака процесима соматске ембриогенезе и органогенезе код *I. reichenbachii* детаљно је описан у раду Јевремовић и сар., (2006 а, б). Током индукције долази до формирања три типа калуса који се разликују по структури и боји (Јевремовић и сар., 2015). Садржај мангиферина анализиран је у сва три типа формираних калуса и показано је да присуство 2,4-D у хранљивој подлози снажно инхибира синтезу мангиферина у калусним културама. Слични резултати добијени су код калусних култура кантариона (*Hypericum perforatum*), где је добијена знатно мања синтеза када је калус гајен на подлогама са 2,4-D него на подлогама са NAA (Dias и сар., 2001). Синтеза мангиферина код *I. reichenbachii* повезана је и са формирањем изданака јер је знатно већа синтеза мангиферина (више од 20 пута), уочена после гајења зеленог органогеног калуса месец дана на подлогама са NAA и BA где долази до формирања изданака. Овај феномен показан је и код калусних култура врста рода *Cyclopia* код којих су у калусима пронађени само трагови мангиферина (Kokotkiewicz и сар., 2009). Повећане концентрације 2,4-D у хранљивим подлогама током индукције доводе до веће дедиференцијације ћелија преко стимулације ћелијских деоба, док је у исто време синтеза мангиферина минимална. Уклањањем 2,4-D из хранљиве подлоге повећава се и синтеза мангиферина. Сличан ефекат 2,4-D на продукцију секундарних метаболита уочен је у културама *Catharanthus roseus* где је показано да када су цитокинини присутни у хранљивој подлози долази до стимулације синтезе секундарних метаболита тек када се 2,4-D уклони из хранљиве подлоге (DiCosmo и Masawa, 1995). После 3-4 субкултуре органогеног калуса *I. reichenbachii* на подлози са NAA и BA умножавање изданака одвија се активацијом аксиларних пупољака без калусне фазе. Синтеза мангиферина у овим изданцима стабилна је и мања него у калусним културама са изданцима. После излагања екстремно ниским температурама течног азота и потпуне регенерације биљака успостављене културе изданака имају исти садржај мангиферина као и пре криопрезервације. Ова чињеница врло је значајна јер омогућава дуготрајно чување одабраних високопродуктивних линија, а самим тим и лакше планирање производње током године.

Садржај мангиферина анализиран је и у биљкама добијеним процесима соматске ембриогенезе и органогенезе и показано је да код свих регенерисаних биљака долази до синтезе мангиферина без обзира на начин регенерације. Надземни делови биљака добијени културом ткива и гајени у условима стакленика синтетички око два пута више мангиферина него биљке сакупљене са станишта са кога је узет почетни биљни материјал. Код биљака гајених у спољашњим условима мангиферин се доминантно синтетисао у надземним деловима у концентрацијама мањим него код биљака гајених у условима стакленика. Ови резултати потврђују да на синтезу мангиферина утичу и средински фактори. Синтеза секундарних метаболита код биљака генерално гледано зависи од степена диференцијације ткива, али и од срединских фактора. У неким случајевима, потребно је да се у потпуности достигну фактори спољашње средине из природних станишта да би се постигао одговарајући ниво синтезе секундарних метаболита (Matkowski, 2008). Wawrosch и сар., (2005) показали су да је синтеза мангиферина код *Swertia chirata* гајене у плантажама потпуно различита него код култура *in vitro*. Разлог томе лежи у чињеници да се услови гајења у култури *in vitro* и *ex vitro* (стакленици или плантаже) много међусобно разликују. Пре свега, мангиферин, као и остали ксантони код биљака се синтетички као реакција биљака на стрес (Cheynier и сар., 2013). У условима гајења у култури *in vitro* у којима су строго контролисани услови гајења продукција мангиферина је најмања. Са друге стране, постоји и разлика и у односу на услове средине где биљке природно живе. Одсуство стресних фактора као што су велико варирање температуре, суша, наводњавање, недостатак патогена и хранљивих материја могу бити основни разлози за постојање разлика у садржају мангиферина у биљкама *I. reichenbachii* гајеним у условима *in vitro* и *ex vitro*. Такође, фактори средине као што су влажност ваздуха и земљишта и квалитет светлости могу бити неки од разлога повећане продукције мангиферина у биљкама гајеним у условима стакленика него када се биљке гаје у спољашњим условима.

ЗАКЉУЧАК

У раду су приказани резултати примене културе ткива и криопрезервације као метода за повећање садржаја мангиферина код ендемичне балканске перунике. На основу резултата приказаних у овом раду може се закључити да је потребно са посебном пажњом одабрати географско подручје са кога ће се узети почетни биљни материјал јер се садржај мангиферина у биљкама може значајно разликовати у зависности од географског порекла. Као почетни материјал за успостављање асептичних култура коришћена су семена биљака тј. зиготски ембриони што представља велику предност јер нема уништавања биљака у природном станишту. Продукција мангиферина у култури *I. reichenbachii* повезана је са формирањем и диференцијацијом изданака. Током гајења у култури *in vitro* производи се мања количина мангиферина у биљкама него током гајења у условима *ex vitro*, тако да би била неопходна велика продукција изданака да би се постигла задовољавајућа продукција мангиферина. Овај проблем може се успешно превазићи масовном производњом изданака у биореакторима када је могуће добити велику продукцију биомасе која није зависна од временских услова и сезонског варирања. Поред тога, криопрезервацијом високопродуктивних линија могло би да се омогући дуготрајно чување и планирање производње мангиферина код *I. reichenbachii*.

Захвалница

Резултати приказани у овом раду финансирало је Министарство просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије (пројекти број ОИ17015 и ТР31019). Захваљујемо се др Теодори Јанковић и др Небојши Менковићу са Института за проучавање лековитог биља „Јосиф Панчић“ из Београда на помоћи приликом вишегодишњег рада на анализи мангиферина код перуника.

ЛИТЕРАТУРА

1. Al-Gabbiesh, A., Hassawi, D.S., Afifi, F.U. : *In vitro* propagation of endangered *Iris* species. *J Biol Sci* 6: 1035–1040, 2006.
2. Agati G., Brunneti C., di Ferdinando M., Ferrini F., Polastre S., Tattini M. : Functional roles of flavonoids in photoprotection: New evidence, lessons from the past. *Plant Physiol. Biochem.* 72: 35-45, 2013
3. Akashi, T., Ishizaki, M., Aoki, T., Ayabe, A. : Isoflavonoid production by adventitious-root cultures of *Iris germanica* (Iridaceae). *Plant Biotech* 22: 207–215, 2005.
4. An, C., Mou Z. : Salicylic acid and its function in plant immunity. *J. Integr. Plant Biol.* 53: 412-428, 2011.
5. Bate-Smith, E.C., Harborne, J.B. : Mangiferin and other glicophenolics in *Iris* species. *Nature* 198: 1307–1308, 1963.
6. Al-Khalil, S., Tosa, H., Iinuma, M. : A xanthone C-glycoside from *Iris nigricans*. *Phytochemistry* 38: 729–731, 1995.
7. Antonić, D., Bohanec, B., De Carlo, A., Benelli, C., Lambardi, M., Subotić, A., Jevremović, S. : Ploidy level stability of *Iris reichenbachii* plants regenerated after cryopreservation. **Book of paper of V Congress of Serbian Genetic Society**, 1-6, Beograd, 2014.
8. Boltenev, E.V., Rybin, V.G., Yarembo, E.V. : Flavones from callus tissue of *Iris ensata*. *Chemistry of Natural Compounds* 41 (5): 539–541, 2005.
9. Cheynier, V., Comte, G., Davies, K.M., Lattanzio, V., Martens S. : Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant Physiol. Biochem.* 72:1-20, 2013.
10. David B., Wolfender J. L., Dias D.A. : The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends. *Phytochemical Rev.* 14: 299-315, 2015.
11. Dias, A.C.P., Seabra, R.M., Andrade, P.B., Ferreres, F., Ferreira, M.F. : Xanthone production in calli and suspended cells of *Hypericum perforatum*. *J Plant Physiol* 158: 821–827, 2001.
12. DiCosmo, F., Masawa, M. : Plant cell and tissue culture: alternatives for metabolite production. *Biotechnology advances* 13 (3): 425–453, 1995.
13. Fotie, J., Bohle, D.S. : Pharmacological and biological activities of xanthones. *Anti-infective agents in medicinal chemistry* 5:15–31, 2006.
14. Iwashina, T., Kamenosono, K., Yabuza, T. : Isolation and identification of flavonoid and related compounds as copigments from the flowers of *I. ensata*. *J Jap Bot* 71: 281–287, 1996.

15. Iwashina, T., Ootani, S. : Flavonoids of genus *Iris*: structures, distribution and function (review). *Ann Tsukuba Bot Gard* 17: 147–183, 1998.
16. Jiang, D.J., Dai, Z., Li, Y.J. : Pharmacological effects of xanthenes as cardiovascular protective agents. *Cardiovascular Drug Rev* 22 (2): 91–102, 2004.
17. Jehan, H., Courtois, D., Ehret, C., Lerch, K., Petiard, V. : Plant regeneration of *Iris pallida* Lam. and *Iris germanica* L. via somatic embryogenesis from leaves, apices and young flowers. *Plant Cell Rep* 13: 671–675, 1994.
18. Jevremović, S., Radojević, Lj. : Morphogenesis *in vitro* of *Iris reichenbachii* Heuff. **Second Balkan Botanical Congress**, In: N. Gözükmirmizu (ed) Proc., Vol II, 293–297, 2000.
19. Jevremović, S., Subotić, A., Radojević, Lj. : *In vitro* plant regeneration in zygotic embryo culture of *Iris reichenbachii*. *Acta Hort* 725: 169–173, 2006a.
20. Jevremović, S., Subotić, A., Radojević, Lj. : *In vitro* morphogenesis of dwarf irises. **Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: Advances and Topical Issues**, In: Teixeira da Silva, J.A. (ed), 1st edn., Vol I Global Science Books, Isleworth, United Kingdom, 551-557, 2006b.
21. Jevremović, S., Jeknić, Z., Subotić, A. : Micropropagation of irises. **Protocols for micropropagation of selected economically-important horticultural plants**. Editors: Maurizio Lambardi, Elif Aylin Ozudogru, Shri Mohan Jain, Humana Press-Springer, 291-304, 2013.
22. Jevremović, S., Lojić, M., Jeknić, M., Trifunović, M., Antonić, M., Petrić, M., Subotić, A., Radojević, Lj. : *In vitro* propagation of *Iris reichenbachii* Heuff. and clonal fidelity of regenerated plants. *Botanica Serbica vol 40*, 2015.
23. Kaššák, P. : Secondary metabolites of the choosen genus iris species. *Acta Universitatis Agriculturae et silviculturae Mendelianae Brunensis Vol LX*, 8, 2012.
24. Kukula-Koch, W., Sieniawska, E., Widelski, J., Urjin, O., Głowniak, P., Skalicka-Woźniak, K. : Major secondar metabolites of *Iris* spp. *Phytochem Rev* 14: 51-80, 2015.
25. Kokotkiewicz, A., Wnuk, M., Bucinski, A., Luczkiewicz, M. : *In vitro* cultures of *Cyclopia* plants (Honeybush) as a source of bioactive xanthenes and flavones. *Zeitschrift fur Naturforschung-Section C Journal of Biosciences* 64 (7-8): 533–540, 2009.
26. Matkowski, A. : Plant *in vitro* culture for the production of antioxidants-a review. *Biotechnol advances* 26: 548–560, 2008.
27. Minina, S.A., Abu-Skhela, G.R.I., Astakhova, T.V., Pryakhina, N.I., Zenkevich, I.G., Kosman, V.M. : Technology of dry extract production from the above-ground part of milk-white iris herbs (*Iris lactea* Pall.). *Pharm Chem J* 33 (4): 211–213, 1999.
28. Minina, S.A., Astakhova, T.V., Pryakhina, N.I., Abu-Skela, G. : Selecting the optimum composition and developing the technology for tablets of milk-white iris extract. *Pharm Chem J* 35 (2): 85–87, 2001.
29. Murthy, H.N., Lee, E.J., Paek, K.Y. : Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 118 (1): 1-16, 2014.
30. Para, G., Baratti, J. : Irones and precursors synthesized by *Iris sibirica* tissue culture. *Biosci Biotech Biochem* 56 (7): 1132–1133, 1992.

31. Pinto, M.M.M., Sousa, M.E., Nascimento, M.S.J. : Xanthone derivatives: new insight in biological activities. *Current Med Chem* 12: 2517–2538, 2005.
32. Sakai, A., Kobayashi, S., Oiyama, I. : Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. Var. *brasiliensis*) by vitrification. *Plant Cell Rep.*, 9:30-33, 1990.
33. Stjepanović-Veselinčić, L. : *Iris reichenbachii* Heuff. **Flora SR Srbije VIII**, SANU, Beograd, 1976.
34. Shu, P., Qin M.K., Shen W.J., Wu G. : A new coumaronochromone and phenolic constituents from leaves from *Iris bungei* Maxim. *Biochemical Systematics and Ecology* 37:20–23, 2009.
35. Šavikin-Fodulović, K., Stojanović, D., Menković, N. : Fitohemijaska i anatomska analiza vrste *Iris reichenbachii* Heuff. *Lekovite sirovine* 20: 21–26, (abstract in English), 2000.
36. Šilić, Č. : **Endemične biljke**. Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Beograd, 1990.
37. Verpoorte, R., Contin, A., Memelink, J. : Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochem Rev* 1: 13-25, 2002.
38. Wawrosch, C., Bloch, A.H.B., Hostettman, K., Kopp, B. : *Swertia chirata* Buch.-Ham.ex Wall. (*Gentianaceae*), an endangered Himalayan medicinal plant: comparative study of the secondary compound patterns in market drug, *in vitro*-cultivated, and micropropagated field grown samples. *Sci Pharm* 73: 127–137, 2005.
39. Williams, C.A., Harborne, J.B., Colasante, M. : Flavonoid and xanthone patterns in bearded iris species and the pathway of chemical evolution in the genus. *Biochem System Ecol* 25 (4): 309–325, 1997.
40. Wink, M. : Plant breeding: importance of plant secondary metabolites for the protection against pathogens and herbivores. *Theor Appl Genet* 75: 225-233, 1988.

Примљено: 19.10.2015.
Одобрено: 20.04.2016.