

UDK: 581.165.7.086:582.998.1

Оригинални научни рад

DOI: 10.2298/GSF1511099M

МИКРОПРОПАГАЦИЈА *ACHILLEA MILLEFOLIUM* L. НА РЕДУКОВАНОЈ MS ПОДЛОЗИ И МОГУЋНОСТ АКЛИМАТИЗАЦИЈЕ ИЗДАНАКА ДОБИЈЕНИХ *IN VITRO* ИСТОВРЕМЕНО СА ОЖИЉАВАЊЕМ У ХИДРОПОНСКОЈ КУЛТУРИ

др Марија Марковић, доцент, Универзитет у Београду - Шумарски факултет
др Драгана Скочајић, асистент, Универзитет у Београду - Шумарски факултет
др Михаило Грбић, редовни професор, Универзитет у Београду - Шумарски факултет
др Матиљда Ђукић, редовни професор, Универзитет у Београду - Шумарски факултет
др Драгица Обрагов-Петковић, редовни професор, Универзитет у Београду - Шумарски факултет
др Данијела Ђунисијевић-Бојовић, доцент, Универзитет у Београду - Шумарски факултет
мастер инж. Милица Боровица, Универзитет у Београду - Шумарски факултет

Извод: Како би се успоставио ефикасан систем производње лековите врсте *A. millefolium*, циљ овог истраживања је био испитивање могућности њене микропропагације на редукованој MS подлози и затим директне аклиматизације добијених изданак у хидропонској култури. Коришћена су два типа експаната - вршне и базалне резнице, а повољнији резултати су постигнути са вршним резницама. Развој изданак у фази мултипликације је био успешан, а проценат регенерације висок (100%). Ожиљавање *ex vitro* истовремено са аклиматизацијом у модификованом Хогландовом раствору је било успешно (83%), али је проценат ожиљавања вршних резница *in vitro* на редукованој MS подлози био већи (95%). С обзиром да се изостављањем фазе ожиљавања *in vitro* поступак производње *A. millefolium* знатно скраћује, потребно је додатним истраживањима оптимизирати састав хранљивог раствора у хидропонској култури, његову ЕС и рН, за потребе плантажног узгоја селекционисаних генотипова.

Кључне речи: хајдучка трава, микропропагација, ожиљавање *ex vitro*, хидропонски узгој

УВОД

Врста *Achillea millefolium* L. представља евроазијски флорни елемент, распрострањена је у Европи, Сибиру, на западним Хималајима, Кавказу, као и у северном Ирану. Интродукована је у Северну Америку, Нови Зеланд и јужну Аустралију (Гајић, 1975). То је вишегодишња, зељаста биљка висине до 80 cm, са пузећим и разгранатим ризомом. Стабљика је усправна са доста листовата, а листови су двоструко до тро-

струко перасто дељени. Цвета од јуна до августа, а главице су 3-5 mm у пречнику и налазе се у густим, равним, разгранатим гроњастим цвастима. Средишњи цветови су сивкасто беле боје, а језичасти цветови су бели и обично их је 5 (Гајић, 1986). Одговарају јој сунчана станишта.

A. millefolium је лековита и медоносна врста. Садржи етерична уља (*Millefolii aetheroleum*), флавоноиде, алкалоиде (ахилеин), танине, органске киселине (*Gelenčir, Gelenčir, 1991, Saeidnia et al., 2011, Willfort, 1989*). У фарма-

когнозији и народној медицини користи се код различитих болести гастроинтестиналног тракта, проблема везаних за крвоток и циркулацију, крварења, проблема са бубрезима, код бронхијалне астме, као и код почетних стадијума дијабетеса (Gelenčir, Gelenčir, 1991, Willfort, 1989). Поред тога, Stanojković et al. (2008) су утврдили антибактеријско дејство екстрата (воденог, алкохолног и етил-ацетатног) хербе *A. millefolium* код *Agrobacterium radiobacter* pv. *tumefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Ps. fluorescens*, *Sarcina lutea* и *Staphylococcus aureus*.

Због свог привредног значаја, односно за потребе фармацеутске и козметиче индустрије, хајдучка трава се данас плантажно узгаја. Биљка се комерцијално размножава директном сетвом семена приликом заснивања плантаже, а код мањих обима производње примењује се и подела бокора (Stojčevski, 2011). Одговарају јој лака и плодна земљишта, али не и висок садржај азота у земљишту, па самим тим ни легуминозе нису пожељне као преткултура (Stepanović et al., 2009).

Поред класичних метода, *A. millefolium* може да се размножава и културом ткива (Figueiredo et al., 1995, Shatnawi, 2013, Turker et al., 2009, Wawrosch et al., 1992). Примена ове методе, осим за масовну производњу здравих биљака, ослобођених патогена, током целе године, омогућава њихову униформност у погледу продукције секундарних метаболита.

Turker et al. (2009) су детаљно истражили могућност микропропагације ове врсте користећи Linsmaier & Skoog (1965) медијум, који заправо представља модификацију медијума Murashige & Skoog (1962), па се често може наћи и под ознаком MSMO (MS са минималним органским компонентама). У медијуму MSMO, тиамин HCl се додаје у 4 пута већој концентрацији у односу на MS медијум, али су зато остале органске компоненте (пиридоксин HCl, никотинска киселина, глицин) изостављене (Linsmaier, Skoog, 1965). С обзиром да се култура *A. millefolium* успешно развијала на подлози са редукованим органским компонентама, поставило се питање како би на развој култура утицала редукација MS минералних соли, тим пре што поједини аутори сматрају да су концен-

трације соли у MS медијуму релативно високе у поређењу са другим формулацијама подлога за раст биљака (Vinterhalter, Vinterhalter, 1996). Стога је решено да се изврши микропропагација ове врсте на редукованом MS медијуму.

Такође, иако размножавање културом ткива има бројне предности, још увек нема значајну примену у производњи *A. millefolium* за добијање секундарних метаболита. Figueiredo et al. (1995) су истраживали састав и количину есенцијалних уља која се може добити у култури ћелија ове врсте, међутим, садржај есенцијалних уља је био знатно нижи (0,001%) у односу на садржај уља у интактним биљкама (0,2%) (Figueiredo et al., 1992a,b). Са друге стране, Pedneault et al. (2014) су испитивали квалитет биљака *A. millefolium* гајених у хидропонској култури у односу на биљке гајене на отвореном, у класичном супстрату. Они су пратили садржај више секундарних метаболита у различитим биљним деловима, током 5 фенолошких фаза (од 35 до 102 дана након сетве) и закључили да коришћење хидропонског система значајно редукује време потребно да биљка достигне одређену фенофазу у којој је акумулација посматраних метаболита највиша, а при том је свежа и сува маса биљака гајених у хидропоници била десетак пута већа у односу на биљке гајене класичним путем. Слично, у хидропонски гајеним биљкама *Thymus spp.*, претходно произведених културом *in vitro*, садржај есенцијалних уља је био виши у односу на садржај у конвенционално гајеним биљкама (Sargsyan et al., 2011).

На основу свега наведеног намеће се закључак да би се оптимални резултати постигли применом микропропагације у размножавању одабраних генотипова, који би се даље гајили у хидропонској култури. Због тога је решено да се испита могућност аклиматизације изданака *A. millefolium* произведених *in vitro* истовремено са оживљавањем, у хидропонској култури, како би се повећала ефикасност производње. Такав узгој *A. millefolium* би омогућио стандардизацију производње, што би значајно редуковало сакупљање биљака у природи и проблеме који се при том могу јавити (претерано сакупљање на појединим локалитетима, нехигијенско руковање и сл.).

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД РАДА

Култура *in vitro* је успостављена коришћењем семена. Сакупљање семена *A. millefolium* је обављено на обронцима планине Космај (координате планине су 44°27'56" северне географске ширине и 20°33'56" источне географске дужине). Семе је сакупљено на неколико локалитета, помешано и чувано у папирним кесима, на сувом месту и на собној температури до употребе. Дезинфекција случајно одабраног узорка семена је извршена коришћењем 4% NaOCl са додатком две до три капи препарата Tween 20, у трајању од 20 минута, након чега је семе испирано стерилном дестилованом водом 3 пута по 2 минута. Семе је постављено на основну MS хранљиву подлогу (*Murashige, Skoog, 1962*) са додатком 30 g/L сахарозе и 6 g/L агара, а рН вредност подлоге подешена је на 5,8 пре аутоклавирања на температури 121°C у трајању од 20 минута.

Након 30 дана, са исклијалих биљчица исецане су вршне и базалне резнице (дужине 1 - 2 cm) и постављене на нове медијуме. Сви медијуми у фази мултипликације садржали су упола редуковану концентрацију MS соли и органских компоненти, уз додаток 3g/L сахарозе, 6 g/L агара, као и фитохормона BAP (бензил аминопурин) и IBA (индол бутерна киселина), чије су концентрације приказане у табели 1. Ожиљавање *in vitro* је обављено на редукованој MS подлози истог састава као у фази мултипликације, без хормона.

Табела 1. Ознака третмана са концентрацијама додатих фитохормона

Ознака третмана	BAP (mg/L)	IBA (mg/L)
1	3,0	0,5
2	2,0	0,5
3	1,0	1,0
4	0,5	0,5
контрола	0,0	0,0

Током иницијалне фазе, фазе мултипликације и током ожиљавања *in vitro*, културе су га-

јене у стакленим посудама запремине 200 mL, са по 30 mL медијума, у условима дугог дана (16h/8h), при температури 25 ± 2 °C. У фази мултипликације и фази ожиљавања *in vitro* постављано је 5 експаната по посуди у три понављања. Мерења одговарајућих параметара (број аксиларних пупољака и дужина листова, број и дужина коренова) извршена су 30 дана након постављања експаната на медијуме.

Ожиљене биљке су стављене на аклиматизацију у супстрат који се састојао од мешавине песка, тресета и вермикулита у односу 1:1:1, а неожиљени изданци, након фазе мултипликације, су стављени у хидрокултуру, у модификован Хогландов раствор са упола редукованом концентрацијом соли (Ђунисијевић Војовић et al., 2012), на аклиматизацију истовремено са ожиљавањем *ex vitro*.

Добијени подаци су статистички обрађени коришћењем програма STATGRAPHICS Plus ver. 2.1., а значајност разлика између средњих вредности утврђена је анализом варијансе (ANOVA) и методом најмање значајне разлике, при нивоу значајности $p < 0,05$.

РЕЗУЛАТИ

Успостављање културе *in vitro* и мултипликација изданака

Култура *in vitro* је успешно успостављена, а клијавост је износила 76%. У фази мултипликације, регенерација правилно развијених изданака из вршних резница је била висока на свим подлогама (93,3 - 100%), док је проценат регенерације базалних резница био приметно нижи на свим подлогама изузев у контролном третману (табела 2). Витрификација није била присутна ни у једном третману.

Просечан број аксиларних пупољака који су се формирали код вршних резница кретао се од 4,5 на подлози са 2 mg/L BAP и 0,5 mg/L IBA до максималних 7,5 у контролном третману (табела 3). Просечан број пупољака који се формирао код базалних резница био је готово упола нижи у односу на вршне резнице, али је такође максимална вредност била забележена у контролном третману (табела 3).

Табела 2. Процент регенерације избојака из вршних и базалних резница

ВАР (mg/L)	ІВА (mg/L)	вршне резнице		базалне резнице	
		Ср. вред. ± Станд. грешка $\bar{X} \pm se$	Ср. вред. ± Станд. грешка $\bar{X} \pm se$	Ср. вред. ± Станд. грешка $\bar{X} \pm se$	Ср. вред. ± Станд. грешка $\bar{X} \pm se$
3,0	0,5	100 ^a ± 0,0	73,3 ^a ± 11,55		
2,0	0,5	93,3 ^a ± 11,55	66,7 ^a ± 23,09		
1,0	1,0	100 ^a ± 0,0	80,0 ^a ± 20,0		
0,5	0,5	100 ^a ± 0,0	73,3 ^a ± 46,19		
0,0	0,0	100 ^a ± 0,0	100 ^a ± 0,0		

Напомена: Вредности означене различитим словима се статистички значајно разликују на основу анализе варијансе и методе најмање значајне разлике, при нивоу значајности $P < 0.05$;

Табела 3. Просечан број аксиларних пупољака формираних код вршних и базалних резница

ВАР (mg/L)	ІВА (mg/L)	вршне резнице		базалне резнице	
		Ср. вред. ± Станд. грешка $\bar{X} \pm se$	Ср. вред. ± Станд. грешка $\bar{X} \pm se$	Ср. вред. ± Станд. грешка $\bar{X} \pm se$	Ср. вред. ± Станд. грешка $\bar{X} \pm se$
3,0	0,5	5,8 ^{bc} ± 2,83	2,0 ^{bc} ± 1,46		
2,0	0,5	4,5 ^c ± 2,50	1,7 ^c ± 1,40		
1,0	1,0	5,4 ^{bc} ± 1,96	3,1 ^{ab} ± 2,45		
0,5	0,5	6,5 ^{ab} ± 1,60	3,1 ^{ab} ± 2,33		
0,0	0,0	7,5 ^a ± 1,85	3,5 ^a ± 1,54		

Напомена: Вредности означене различитим словима се статистички значајно разликују на основу анализе варијансе и методе најмање значајне разлике, при нивоу значајности $P < 0.05$;

Посматрајући просечну дужину формираних листова, код оба типа резница најповољнији резултати су добијени у контролном третману, на медијуму без хормона, где су добијене знатно више вредности него на подлогама са хормонима (табела 4). Код базалних резница се

на подлогама са хормонима формирала само једна хомогена група, а код вршних резница су присутна преклапања између хомогених група, али се код оба типа резница може уочити да се са порастом концентрације ВАР просечна дужина листова смањује (табела 4).

Табела 4. Просечна дужина листова формираних код вршних и базалних резница

ВАР (mg/L)	ІВА (mg/L)	вршне резнице (mm)		базалне резнице (mm)	
		Ср. вред. ± Станд. грешка $\bar{X} \pm se$	Ср. вред. ± Станд. грешка $\bar{X} \pm se$	Ср. вред. ± Станд. грешка $\bar{X} \pm se$	Ср. вред. ± Станд. грешка $\bar{X} \pm se$
3,0	0,5	10,4 ^d ± 5,72	6,9 ^b ± 4,14		
2,0	0,5	13,5 ^{cd} ± 4,75	7,7 ^b ± 3,71		
1,0	1,0	16,4 ^{bc} ± 8,57	9,4 ^b ± 6,53		
0,5	0,5	17,5 ^b ± 9,91	10,9 ^b ± 6,08		
0,0	0,0	26,1 ^a ± 18,45	25,4 ^a ± 15,57		

Напомена: Вредности означене различитим словима се статистички значајно разликују на основу анализе варијансе и методе најмање значајне разлике, при нивоу значајности $P < 0.05$;

Табела 5. Просечан број и дужина коренова формираних код вршних и базалних резница

	број коренова	дужина коренова
	Ср. вред. ± Станд. грешка $\bar{X} \pm se$	Ср. вред. ± Станд. грешка $\bar{X} \pm se$
вршне резнице	3,3 ^a ± 2,34	47,01 ^a ± 30,76
базалне резнице	1,25 ^a ± 1,02	41,61 ^a ± 28,48

Напомена: Вредности означене различитим словима се статистички значајно разликују на основу анализе варијансе и методе најмање значајне разлике, при нивоу значајности $P < 0.05$;

Ожиљавање *in vitro* и аклиматизација ожиљених биљака у класичном супстрату

Процент ожиљавања базалних резница на редукованој MS подлози без хормона износио је 65%, а вршних - 95%.

Просечан број коренова је био већи код вршних (3,3 mm) у односу на базалне резнице (1,2 mm), али обе вредности припадају истој хомогеној групи (табела 5). Слично, ни просечна дужина коренова се није статистички значајно разликовала код вршних и базалних резница, с тим да је код вршних резница добијена нешто већа вредност (табела 5).

Ожиљавање изданака у хидрокултури истовремено са аклиматизацијом

Током наших истраживања, изданци постављени у модификовани Хогландов раствор су се ожилили и аклиматизовали у релативно високом проценту - 83%.

ДИСКУСИЈА

Успостављање културе *in vitro* и мултипликација изданака

Посматрајући проценат регенерације вршних резница *A. millefolium* (90%) који су добили *Turker et al. (2009)* на MSMO подлогама и резултате добијене током наших истраживања (93,3-100%), можемо сматрати да је регенерација на редукованом MS медијуму била успешна.

Просечан број аксиларних пупољака разликовао се зависно од типа експланта и концентрације хормона. Слично, *Evenor, Reuveni (2004)* су приликом микропропагације *A. filipendulina* св. *Parker* на подлогама са BAP и NAA (α -нафтил сирћетна киселина) највећи просечан број пупољака по експланту (5,8) добили на подлогама са релативно високим садржајем фитохормона (3 mg/L BAP и 1 mg/L NAA), у односу на подлоге са 1 и 2 mg/L BAP, али је сувише висока концентрација BAP деловала инхибиторно на развој културе и на подлози са 4,5 mg/L BAP није се развио ниједан аксиларни пупољак. Међутим, резултати њихових истраживања показују да врста ауксина која се користи у комбинацији са BAP такође значајно утиче на развој експланата, па су највише вредности просечног броја аксиларних пупољака добијене на подлози са 0,5 mg/L IAA (индол сирћетне киселине) - 9,1 у односу на подлогу са 0,5 mg/L NAA (3,7), при истој концентрацији BAP (1 mg/L).

Ожиљавање *in vitro* и аклиматизација ожиљених биљака у класичном супстрату

Процент ожиљавања вршних резница је био висок (95%) на подлози без хормона. На супрот томе, *Shatnawi (2013)* је висок проценат ожиљавања (95 - 100%) вршних резница *A. millefolium* добио на MS подлози са додатком ауксина (0,6- 2 mg/L IBA, NAA или IAA), док је у контролном третману свега 10% резница било ожиљено. С друге стране, у истраживањима која су спровели *Turker et al. (2009)* на MSMO подлози проценат ожиљавања је био максималан (100%) и у контроли и на подлогама са 0,5-1,0 mg/L ауксина (IAA, NAA или IBA), али су

високе концентрације (3 mg/L) IAA и NAA деловале инхибиторно, па је проценат ожиљавања био знатно нижи (40-60%). Међутим, треба имати у виду и да су вршне резнице које је Shatnawi (2013) директно из фазе мултипликације постављао на ожиљавање биле дужине до 15 mm, док су Turker et al. (2009) убацили међуфазу издуживања изданака на MSMO медијуму без хормона у трајању од 2 недеље, након чега су на ожиљавање постављене вршне резнице дужине 3-4 cm.

Просечан број коренова је био релативно низак (1,2 - 3,3) у односу вредности које су добили други аутори, код вршних резница на MSMO медијуму - 10,8 (Turker et al., 2009), код вршних резница на MS медијуму - 7,4 (Shatnawi, 2013). Међутим, просечне дужине коренова измерене током истраживања која је спровео Shatnawi (2013) се нису значајно разликовале зависно од концентрације хормона, али јесу зависно од врсте додатог хормона, па су у контролном третману и на подлогама са IBA (0,3-1,5 mg/L) формиран краћи коренови (35,3 - 40,8 mm) него на подлогама са истим концентрацијама NAA (52,5 - 60,9 mm).

На основу свега наведеног, можемо тврдити да, поред врсте и концентрације додатих ауксина, на ожиљавање значајно утиче и концентрација MS соли у подлози, као и димензије коришћених експланата. Међутим, иако је коренов систем биљака ожиљених током наших истраживања слабије развијен у односу на коренов систем биљака формиран током истраживања других аутора (Turker et al., 2009, Shatnawi, 2013), све ожиљене биљке су успешно аклиматизоване (100%) у мешавини песка, тресета и вермикулита (1: 1: 1). Процент аклиматизације који су добили Turker et al. (2009) у вермикулиту је такође био висок (98%), а аклиматизација биљака добијених у истраживањима која је спровео Shatnawi износила је свега 70% у мешавини песка и перлита (1: 1). Због тога можемо да претпоставимо да развијеност кореновог система није имала значајнијег утицаја на аклиматизацију *A. millefolium*, али је могућ утицај састава супстрата за аклиматизацију. Томе у прилог говоре и резултати које су добили Marković i Porović (2012) испитујући факторе који утичу на аклиматизацију врсте *D. deltoides*.

Они су показали да порекло ожиљених биљака (вршна или нодусна резница), број формираних коренова, као и састав подлоге за ожиљавање (концентрација NAA) немају значајног утицаја на аклиматизацију, али је зато утицај састава супстрата био изражен.

Ожиљавање изданака у хидрокултури истовремено са аклиматизацијом

До сада је публикован велики број истраживања везаних за аклиматизацију ожиљених *in vitro* биљака у хидропонској култури. У већини случајева добијени су бољи резултати у односу на директну аклиматизацију у класичним супстратима (Al-Khalifah et al., 2010, Clapa et al., 2009, Fira, Clapa, 2009, Nhut et al., 2004, Palee et al., 2012, Silva et al., 2007, 2011, Zapata et al., 2003). Међутим, код неких врста, као што су *Nidularium procerum* Lindm. и *N. innocentii* Lem., аклиматизација је била успешнија у класичном супстрату (100%) него у хидропонској култури (50% и 83,3%) (Silva et al., 2012). Осим наведених, спровођена су и истраживања везана за *ex vitro* ожиљавање у хидропонској култури (Dewir et al., 2005, Fira et al., 2011, 2012, Hahn et al., 2000, Wang et al., 2012). Тако је, на пример, проценат ожиљавања изданака боровнице 'Loch Ness' добијених микропропагацијом, у условима *ex vitro*, у води, у хидропонској култури, без додатка минералних соли, износио 74% (Fira et al. 2011), у мешавини воде и перлита - преко 90%, док у аеропонском систему није било ожиљених изданака већ је дошло до њиховог пропадања (Fira et al., 2012).

Узимајући у обзир да је ожиљавање *A. millefolium* у условима *in vitro* износило 95% и аклиматизација 100%, онда добијена вредност *ex vitro* ожиљавања у хидропонском систему није висока (83%). Међутим, уколико се планира хидропонски узгој биљака *A. millefolium*, у том случају је пожељно да се изостављањем фазе ожиљавања *in vitro* сам процес размножавања поједностави и скрати и тада се може сматрати да је добијени проценат ожиљавања сасвим задовољавајући. Међутим, не треба заборавити да ризогенеза и уопште развој биљака у хидропонској култури зависи од састава

раствора, његове ЕС и рН вредности (Dewir et al., 2005, Hahn et al., 2000, Wang et al., 2012), због чега је важно оптимизирати ове факторе у случају плантажног узгоја одабраних генотипова врсте *A. millefolium*.

ЗАКЉУЧАК

Резултати спроведених истраживања су показали да се микропропагација *A. millefolium* успешно може обавити на редукованој MS подлози без хормона, уз коришћење вршних резница (дужине 1 - 2 cm) као експаната. У том случају, проценат регенерације избојака у фази мултипликације је био максималан (100%), а просечан број аксиларних пупољака је износио 7,5. На истој подлози, такође без хормона,

успешно је обављено *in vitro* ожиљавање вршних резница (95% ожиљених), а све добијене биљке (100%) су аклиматизоване у мешавини песка, тресета и вермикулита (1: 1: 1). За потребе хидропонског узгоја *A. millefolium*, поступак производње биљака се може скратити директним ожиљавањем избојака истовремено са аклиматизацијом. Успешност аклиматизације и ожиљавања у модификованом Хогландовом раствору износила је 83%, што се може побољшати даљим истраживањима везаним за оптимизацију састава раствора, као и његове ЕС и рН вредности.

Напомена: Рад је финансиран од стране Министарства просвете и науке републике Србије у оквиру пројекта бр. 43007 за период 2011-2015.

MICROPROPAGATION OF *ACHILLEA MILLEFOLIUM* L. ON HALF-STRENGTH MS MEDIUM AND DIRECT ROOTING AND ACCLIMATIZATION OF MICROSHOOTS IN HYDROPONIC CULTURE

dr Marija Marković, doc., University of Belgrade – Faculty of Forestry (marija.markovic@sfb.bg.ac.rs)

mr Dragana Skočajić, ass., University of Belgrade – Faculty of Forestry

dr Mihailo Grbić, full profesor, University of Belgrade – Faculty of Forestry

dr Matilda Đukić, full profesor, University of Belgrade – Faculty of Forestry

dr Dragica Obratov – Petković, full profesor, University of Belgrade – Faculty of Forestry

dr Danijela Đunisijević Bojović, doc., University of Belgrade – Faculty of Forestry

Master ing. Milica Borovica, University of Belgrade – Faculty of Forestry

Abstract: The aim of this study was to determine the possibility of micropropagation of the medicinal plant *A. millefolium* on half-strength MS medium and *ex vitro* rooting and acclimatization of the obtained microshoots in hydroculture in order to establish an efficient production method. Two explant types were used: basal and terminal cuttings, and better results were achieved when terminal cuttings were used. The development of shoots in the multiplication phase was successful with a regeneration percentage of 100%. *Ex vitro* rooting in a modified Hoagland nutrient solution was successful (83%), but the percentage of *in vitro* rooting on half-strength MS medium without hormones was higher (95%). However, bearing in mind that mass production of *A. millefolium* is more efficient when the phase of *in vitro* rooting is excluded, this method could be recommended for commercial propagation of this medicinal plant. It is necessary to conduct additional research in order to optimize the composition, EC and pH value of the hydroponic nutrient solution.

Key words: yarrow, *in vitro* culture, *ex vitro* rooting, hydroponic production

INTRODUCTION

The species *Achillea millefolium* L. belongs to the Eurasian floristic region, and it is distributed in Europe, Siberia, in the *western Himalayas*, in the *Caucasus Mountains*, as well as in northern Iran. It has been introduced to North America, New Zealand and South Australia (Gajić, 1975). It is a herbaceous perennial species, producing stems reaching up to 80 cm in height, with a spreading rhizomatous growth form. Leaves are arranged spirally on the stems, bipinnate or tripinnate. The plant is in flower from June to August, and the inflorescence is produced in a flat-topped cluster. The inflorescence contains ray and disk flowers. Generally, 5 ray flowers are white, and disk flowers are off-white (Fajuh, 1986). This species prefers full sun.

A. millefolium is a medical and melliferous species. It contains essential oils (*Millefolii aetheroleum*), flavonoids, alkaloids (*achillein*), tannins and organic acids (*Gelenčir*, *Gelenčir*, 1991, *Saeidnia et al.*, 2011, *Willfort*, 1989). It is used in pharmacology and herbal medicine in the treatment of a very wide range of disorders, particularly for gastrointestinal disorders, as a tonic for blood, stimulating the circulation, as well as for high blood pressure (hypertension), and *asthma*. In addition, it can be used for treating wounds, and as a remedy for diabetes (*Gelenčir*, *Gelenčir*, 1991, *Willfort*, 1989). In addition, *Stanojković et al.* (2008) reported an antibacterial activity of the water, ethanol and ethyl acetate extract of macerated *A. millefolium* plants on *Agrobacterium radiobacter* pv. *tumefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Ps. fluorescens*, *Sarcina lutea* and *Staphylococcus aureus*.

Because of its economic importance, and its significance for the pharmaceutical and cosmetics industries, yarrow is now grown in plantations. It is commercially propagated by sowing seeds during the establishment of plantations, and by division for small-scale production (Stojčevski, 2011). It prefers light and fertile soils which are not rich in nitrogen, so legumes as previous crop should be avoided (Stepanović et al., 2009).

Besides the above methods of propagation, *A. millefolium* can be propagated using *in vitro* culture (Figueiredo et al., 1995, Shatnawi, 2013, Turker et al., 2009, Wawrosch et al., 1992). This method enables mass propagation of healthy,

pathogen-free plants, during the whole year, and he obtained plants contain a constant level of secondary metabolites.

Turker et al. (2009) investigated in detail the possibility of micropropagation of this species using the Linsmaier & Skoog (1965) medium, which is a modified Murashige & Skoog (1962) medium, so it can often be found as MSMO (MS with *Minimal Organics*). MSMO Medium contains a 4 times higher concentration of Thiamine HCl than MS medium, but other organic components (*pyridoxine* HCl, nicotinic acid, glycine) are omitted (Linsmaier, Skoog, 1965). Considering that the growth of *A. millefolium* on the medium with reduced organic components was successful, this brings up the question of what effect reducing of MS mineral salts will have on culture growth. Additionally, some researchers deem that MS medium has a high concentration of mineral salts compared to other tissue culture media formulations (Vinterhalter, Vinterhalter, 1996). For that reason, we decided to conduct a micropropagation of *A. millefolium* on a reduced MS medium.

Furthermore, although tissue culture is a propagation method with many advantages, it still does not have any significant application in the cultivation of *A. millefolium* for secondary metabolites production. Figueiredo et al. (1995) investigated the composition and quantity of essential oils. They found that the amount of essential oils which can be obtained in a cell suspension culture of this species was significantly lower (0,001%) in comparison to their amount in intact plants (0.2%). On the other hand, Pedneault et al. (2014) examined the quality of *A. millefolium* plants grown in hydroponics compared to plants grown in field conditions. They recorded the contents of several secondary metabolites in different plant parts, during five phenological phases (from 35 to 102 days after sowing) and concluded that the use of a hydroponic system significantly reduces the time required for a plant to reach an appropriate phenophasis with the largest accumulation of monitored metabolites. Besides, the fresh and dry weights of plants grown in hydroponics were ten times higher than in plants grown conventionally. Similarly, in *Thymus* spp. plants propagated *in vitro* and grown hydroponically, the content of essential oil was

higher than in the plants grown conventionally (Sargsyan et al., 2011).

Based on the above, it can be concluded that optimal results could be achieved by using micropropagation in the propagation of selected genotypes and by further growing of plants obtained in hydroponics. Therefore, we decided to investigate the possibility of rooting and acclimatization of *in vitro* produced plantlets of *A. millefolium* in hydroponics in order to increase production efficiency. This method of cultivation of *A. millefolium* could be standardized, thus reducing yarrow collection in the wild and associated problems (e.g. over-collection, unhygienic handling, etc.).

MATERIAL AND METHOD

An *in vitro* culture was established using seeds collected on Mt. Kosmaj (coordinates 44.4656° N, 20.5656° E). The seeds were collected in summer in several localities around the mountain, mixed and stored in paper bags in a dry place at room temperature until use in September. A randomly selected sample of seeds was disinfected using 4% NaOCl with the addition of 2-3 drops of "Tween 20", for 20 minutes, and rinsed three times for two minutes using sterile distilled water. The seeds germinated on basal MS medium (Murashige, Skoog, 1962) with the addition of 30 g/L sucrose and 6 g/L agar. The pH value of the medium was adjusted to 5.8 before autoclaving at a temperature of 121°C for 20 minutes.

Thirty days later, terminal and basal cuttings (1-2 cm long) were taken from plantlets and placed on fresh media. All multiplication media contained half-strength MS salts and organic components, with the addition of 3g/L sucrose, 6 g/L agar, and BAP (6-Benzylaminopurine) and IBA (indole butyric acid) phytohormones, in different concentrations, as shown in Table 1. *In vitro* rooting was performed on half-strength MS medium with the same composition as in the multiplication, but without hormones.

During the initial stage, the multiplication and *in vitro* rooting stages, the cultures were grown in glass vessels (volume 200 mL) each containing 30 mL of medium, in long-day conditions (16h/8h), at a temperature of 25 ± 2°C. During the multiplication

stage and the *in vitro* rooting stage, 5 explants were placed per vessel with three replications. The measurements of appropriate parameters (number of axillary buds and leaf length, number and length of roots) were performed 30 days after placing the explants on the media.

Table 1. Concentrations and combinations of plant growth regulators

Treatment	BAP (mg/L)	IBA (mg/L)
1	3,0	0,5
2	2,0	0,5
3	1,0	1,0
4	0,5	0,5
control	0,0	0,0

The rooted plants were acclimatized in a substrate consisting of a mixture of sand, peat and vermiculite in the 1:1:1 ratio. After the multiplication stage, unrooted shoots were placed in a modified *Hoagland* hydroponic nutrient solution with half-reduced concentration of mineral salts (Đunisijević Bojović et al., 2012), in order to be acclimatized with the *ex vitro* rooting at the same time.

The obtained data were statistically analyzed using the program Statgraphics Plus ver. 2.1., the significance of differences between the means was determined using the analysis of variance (ANOVA) and the LSD method, at the significance level of $p < 0,05$.

RESULTS

In vitro culture establishment and multiplication

The *in vitro* culture was successfully established. The germination rate was 76%. During the multiplication stage, the regeneration rate of terminal cuttings was high on all media (93,3 - 100%), whereas the regeneration of basal cuttings was noticeably lower on all media except in the control treatment (Table 2). Vitrification was not recorded in any of the treatments.

Table 2. Regeneration rate of terminal and basal cuttings

BAP (mg/L)	IBA (mg/L)	terminal cuttings	basal cuttings
		$\bar{X} \pm se$	$\bar{X} \pm se$
3,0	0,5	100 ^a ± 0,0	73,3 ^a ± 11,55
2,0	0,5	93,3 ^a ± 11,55	66,7 ^a ± 23,09
1,0	1,0	100 ^a ± 0,0	80,0 ^a ± 20,0
0,5	0,5	100 ^a ± 0,0	73,3 ^a ± 46,19
0,0	0,0	100 ^a ± 0,0	100 ^a ± 0,0

Note: Values followed by different letters are significantly different at the P < 0.05 level according to the LSD test.

The mean number of axillary buds which were developed from terminal cuttings ranged from 4.5 on the medium containing from 2 mg/L BAP and 0.5 mg/L IBA to a maximum of 7.5 in the control treatment (Table 3). The mean number of buds

which developed from basal cuttings was almost halved compared to the terminal cuttings, but also the maximum value was observed in the control treatment (Table 3).

Table 3. Regeneration rate of terminal and basal cuttings

BAP (mg/L)	IBA (mg/L)	terminal cuttings	basal cuttings
		$\bar{X} \pm se$	$\bar{X} \pm se$
3,0	0,5	5,8 ^{bc} ± 2,83	2,0 ^{bc} ± 1,46
2,0	0,5	4,5 ^c ± 2,50	1,7 ^c ± 1,40
1,0	1,0	5,4 ^{bc} ± 1,96	3,1 ^{ab} ± 2,45
0,5	0,5	6,5 ^{ab} ± 1,60	3,1 ^{ab} ± 2,33
0,0	0,0	7,5 ^a ± 1,85	3,5 ^a ± 1,54

Note: Values followed by different letters are significantly different at the P < 0.05 level according to the LSD test.

The highest values of the mean length of leaves of both types of cuttings were obtained in the control treatment without hormones (Table 4). The results obtained with basal cuttings belonged to only one homogenous group, and the results

obtained with terminal cuttings belonged to several overlapping homogenous groups. However, it can be observed that in both cuttings types the average length of leaves decreased with an increasing BAP concentration (Table 4).

Table 4. Mean length of leaves developed from terminal and basal cuttings

BAP (mg/L)	IBA (mg/L)	terminal cuttings (mm)	basal cuttings (mm)
		$\bar{X} \pm se$	$\bar{X} \pm se$
3,0	0,5	10,4 ^d ± 5,72	6,9 ^b ± 4,14
2,0	0,5	13,5 ^{cd} ± 4,75	7,7 ^b ± 3,71
1,0	1,0	16,4 ^{bc} ± 8,57	9,4 ^b ± 6,53
0,5	0,5	17,5 ^b ± 9,91	10,9 ^b ± 6,08
0,0	0,0	26,1 ^a ± 18,45	25,4 ^a ± 15,57

Note: Values followed by different letters are significantly different at the P < 0.05 level according to the LSD test.

Table 5. Mean number and length of roots developed from terminal and basal cuttings

	Number of roots	root length (mm)
	$\bar{X} \pm se$	$\bar{X} \pm se$
terminal cuttings	3,3 ^a ± 2,34	47,01 ^a ± 30,76
basal cuttings	1,25 ^a ± 1,02	41,61 ^a ± 28,48

Note: Values followed by different letters are significantly different at the $P < 0.05$ level according to the LSD test.

In vitro rooting and acclimatization of the obtained plants to soil conditions

The rooting rate on half-strength MS medium was 65% for basal cuttings, and 95% for terminal cuttings. Terminal cuttings formed a higher mean number of roots (3.3) than basal cuttings (1.2), but both values belong to the same homogenous group (Table 5). Similarly, there was no significant statistical difference between the mean lengths of roots formed on terminal and basal cuttings, but the value obtained at terminal cuttings was higher (Table 5). The acclimatization was 100% successful.

obtained the highest mean number of axillary buds per explant (5.8) on the media supplied with relatively high concentrations of BAP and NAA (3 mg/L BAP and 1 mg/L NAA) compared to the media with 1 or 2 mg/L BAP. However, they observed that too high a concentration of BAP had an inhibitory effect on the development of culture and on the medium containing 4.5 mg/L since no axillary buds developed. Yet, their research also showed that auxin type in a medium can also influence culture development. Therefore a higher value of the mean number of axillary buds was obtained on the medium supplied with 0.5 mg/L IAA than on the medium with 0.5 mg/L NAA at the same concentration of BAP in both media (1 mg/L).

Ex vitro rooting and acclimatization in hydroponics

The percentage of rooted and acclimatized shoots in a modified *Hoagland* hydroponic nutrient solution was relatively high - 83%.

In vitro rooting and acclimatization of the obtained plants to soil conditions

In our research, rooting was successful on the half-strength MS medium without hormones (95%). On the other hand, *Shatnawi (2013)* obtained a high rooting percentage (95-100%) of terminal cuttings of *A. millefolium* on MS media with auxins (0.6-2 mg/L IBA, NAA or IAA), while only 10% of the cuttings were rooted in the control treatment. However, in the research conducted by *Turker et al. (2009)*, on MSMO media, the highest rooting percentage (100%) was obtained in the control and on the media supplemented with 0.5-1.0 mg/L auxins (IAA, NAA or IBA), but a higher concentrations of IAA or NAA (3 mg/L) had an inhibitory effect leading to a lower rooting rate (40-60%). However, it should be noted that *Shatnawi (2013)* used terminal cuttings of up to 15 mm in length, after the multiplication stage, while *Turker et al. (2009)* cultivated shoots in the intermediate stage for shoot elongation on the MSMO medium without hormones, for 2 weeks before obtaining terminal cuttings of up to 40 mm in length for rooting.

DISCUSSION

In vitro culture establishment and multiplication

The regeneration rate obtained in our research (93,3- 100%- terminal cuttings) on half-strength MS media was very high compared to the regeneration rate of terminal cuttings of *A. millefolium* (90%) obtained on MSMO media, in a research conducted by *Turker et al. (2009)*.

Our research showed that there were differences among the mean numbers of axillary buds depending on the hormone concentration and cutting type. During the micropropagation of *A. filipendulina* cv., *Parker, Evenor and Reuveni (2004)*

The mean number of roots in terminal cuttings obtained in the research conducted by *Turker et al.*, (2009) on the MSMO medium (10.8), and by *Shatnawi* (2013) on the MS medium (7.4) were higher than the values obtained in our research on half-strength MS medium. Also, *Shatnawi* (2013) showed that the mean length of roots did not depend on hormone concentration, but on hormone type, and therefore, the roots were shorter (35.3 - 40.8 mm) in the control and on the media with IBA (0.3-1.5 mg/L) than the roots (52.5 - 60.9 mm) on the media with the same concentration of NAA.

Based on the foregoing, we can state that, besides the type and concentration of auxins, the concentration of MS salts in the medium and the size of explants also has an impact on the rooting of cuttings. In addition, although in our research the root system of cuttings was poorly developed compared to the results obtained in other researchers (*Turker et al.*, 2009, *Shatnawi*, 2013), the acclimatization rate of the rooted plantlets was maximal (100%) in the mixture of sand, peat and vermiculite (1: 1: 1). *Turker et al.* (2009) also obtained a high acclimatization rate in vermiculite (98%), but *Shatnawi* (2013) obtained poorer results - only 70% acclimatized plants in the mixture of sand and perlite (1: 1). Therefore, we can assume that the development of the root system had no effect on the acclimatization of *A. Millefolium*. However, it is possible that there is an impact of the composition of substrate. This is supported by the results obtained by *Marković and Popović* (2012) during the investigation of the factors that influence the acclimatization rate of *D. deltoides* plantlets. They showed that the origin of rooted plantlets (terminal or nodal cuttings), the number of formed roots, as well as the composition of rooting medium (NAA concentration) had no significant effect on acclimatization, but the influence of the substrate was observed.

Ex vitro rooting and acclimatization in hydroponics

To date, a large number of papers related to the acclimatization of in vitro plants in hydroponics were published. In most cases, the obtained

results were better than those obtained by direct acclimatization in a conventional substrate (*Al-Khalifah et al.*, 2010, *Clapa et al.*, 2009, *Fira, Clapa*, 2009, *Nhut et al.*, 2004, *Palee et al.*, 2012, *Silva et al.*, 2007, 2011, *Zapata et al.*, 2003). However, in some plants, such as *Nidularium procerum* Lindm. and *N. innocentii* Lem., acclimatization was more successful in the conventional substrate (100%) than in the hydroponics (50% and 83.3%) (*Silva et al.*, 2012).

Ex vitro rooting and acclimatization have been investigated on different plants (*Dewir et al.*, 2005, *Fira et al.*, 2011, 2012, *Hahn et al.*, 2000, *Wang et al.*, 2012). Thus, for example, the *ex vitro* rooting of shoots of the 'Loch Ness' blueberry obtained by micropropagation in hydroponics, without the addition of mineral salts (only water) was 74% (*Fira et al.* 2011), in a mixture of water and perlite - more than 90%, while in aeroponics rooting it was not observed and the shoots were necrotized (*Fira et al.*, 2012). If we consider that in our research the *in vitro* rooting of *A. millefolium* was 95% and the acclimatization rate 100%, then the value obtained during *ex vitro* rooting in a hydroponic system is not high (83%). However, for the cultivation of *A. millefolium* in hydroponics, the propagation procedure could be simplified and shortened. In that case, the obtained value of 83% may be considered satisfactory. Further, the fact that rhizogenesis and generally the development of plants in hydroponics depend on EC, pH and the composition of the solution, should not be neglected (*Dewir et al.*, 2005, *Hahn et al.*, 2000, *Wang et al.*, 2012). For that reason, it is important to optimize all those factors in order to achieve a successful large scale cultivation of the selected genotypes of *A. millefolium*.

CONCLUSIONS

The research results have shown that the micropropagation of *A. millefolium* can be successfully conducted on the half-strength MS medium without hormones, when terminal cuttings (1-2cm in length) are used as explants. In that case, the expected regeneration rate is 100%, with a mean number of 7.5 axillary buds per explant. In vitro rooting of terminal cuttings

can also be successful (95%) if the same medium composition is used, and the acclimatization of the obtained plants can be successful in a mixture of sand, peat and vermiculite (1:1:1). In the cultivation of *A. millefolium* in hydroponics, the propagation procedure can be shortened by *ex vitro* rooting and the acclimatization of microshoots, with a survival rate of 83%, in a modified Hoagland solution, so that this method could be recommended for mass propagation of this medicinal plant. However, survival rate can be increased through additional research in order to optimize the composition, EC and pH of the hydroponic solution.

Note: This paper was supported by the Ministry of Education and Science of the Republic of Serbia within the project no. 43007 for the period 2011-2015.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Al-Khalifah N.S., Shanavaskhan A.E., Khan F. (2010): Utilizing Hydroponics Technique for Acclimatizing Tissue Culture Derived Plantlets under Desert Environment. *Acta Horticulturae (ISHS)* 865 (163-170)
- Ammirato P.V. (1989): Control and expression of morfogenesis in culture. Chapter "Plant Tissue Culture and its Agricultural Applications" eds. Withers L.A., Alderson P.G., Butterworths, London (23-45)
- Clapa D., Fira A., Plopa C. (2009): Ex-vitro Acclimation Methods for the Black Currant. *Bulletin UASVM Horticulture* 66(1) (645)
- Dewir Y.H., Chakrabarty D., Ali M.B., Hahn E.J., Paek K.Y. (2005): Effects of Hydroponic Solution EC, Substrates, PPF and Nutrient Scheduling on Growth and Photosynthetic Competence During Acclimatization of Micropropagated *Spathiphyllum* plantlets. *Plant Growth Regulation* (46):3 (241-251)
- Đunisijević Bojović D., Đukić M., Maksimović V., Skočajić D., Suručić Lj. (2012): The Effects of iron deficiency on lead accumulation in *Ailanthus altissima* (Mill.) Swingle Seedlings. *Journal of Environmental Quality* 41 (1517-1524)
- Evenor D., Reuveni M. (2004): Micropropagation of *Achillea filipendulina* cv. Parker. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 79 (91-93)
- Figueiredo A.C., Barroso J.G., Pais M.S.S., Scheffer J.J.C. (1992a): Composition of the Essential Oils from Leaves and Flowers of *Achillea millefolium* L. ssp. *millefolium*. *Flavour and Fragrance Journal*, 7 (219-222)
- Figueiredo A.C., Barroso J.G., Pais M.S.S., Scheffer J.J.C. (1992b): Composition of the essential oils from two populations of *Achillea millefolium* L. ssp. *millefolium*. *Journal of Chromatographic Science* 30 (392-395)
- Figueiredo A.C., Pais M.S.S., Scheffer J.J.C. (1995): Composition of the essential oil from cell suspension cultures of *Achillea millefolium* ssp. *millefolium*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 40 (113-118)
- Fira A., Clapa D. (2009): Ex-Vitro Acclimation of some Horticultural Species in Hydroculture. *Bulletin UASVM, Horticulture* 66(1) (44-51)
- Fira A., Clapa D., Rakosy-Tican E. (2011): In vitro Propagation of the Thornless Blackberry Cultivar 'Loch Ness'. *Bulletin UASVM Horticulture*, 68 (1)
- Gajić, M. (1975): Rod *Achillea* L., "Flora SR Srbije VII", ured. Sarić M., SANU Beograd, (90-108)
- Gajić M. (1986): Flora i vegetacija Subotičko-horgoške peščare, Šumarski fakultet Univerzitet u Beogradu, Beograd - Šumsko gazdinstvo, Subotica
- Gelenčir J., Gelenčir J. (1991): Atlas ljekovitog bilja, Prosvjeta, Zagreb
- Hahn E.J., Bae J.H., Lee Y.B. (2000): Growth and photosynthetic characteristics of chrysanthemum plantlets as affected by pH and EC of the nutrient solution in microponic culture. *Journal of Korean Society for Horticultural Science* 41 (12-15)
- Josifović M. (1975): Flora SR Srbije VII. Srpska Akademija Nauka i Umetnosti, Odeljenje prirodno – matematičkih nauka, Beograd
- Linsmaier E.M., Skoog F. (1965): Organic Growth Factor Requirements of Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 18 (100-127)
- Marković, M., Popović, M. (2012) Uticaj tipa eksplantata, sastava hranljive podloge i

- supstrata na ožiljavanje i aklimatizaciju vrste *Dianthus deltooides* L. Glasnik Šumarskog fakulteta, br. 105, str. 117-126
- Murashige T., Skoog F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15 (473-497)
- Nhut D. T., Dieu Huong N. T., Khiem D. V. (2004): Direct microtuber formation and enhanced growth in the acclimatization of in vitro plantlets of taro (*Colocasia esculenta* spp.) using hydroponics, *Scientia Horticulturae* 101 (207-212)
- Palee J., Dheeranupattana S., Jatisatienr A., Wangkarn S., Mungkornasawakul P., Pyne S., Ung A., Sastraruji T. (2012): Influence of Plantlet Age and Different Soilless Culture on Acclimatization of *Stemona curtisii* Hook. *Asian Journal of Plant Sciences*, 11 (294-299)
- Pedneault K., Dorais M., Leonhart S., Angers P., Gosselin A. (2014): Time-course accumulation of flavonoids in hydroponically grown *Achillea millefolium* L., *Canadian Journal of Plant Science* 94 (383-395)
- Saeidnia S., Gohari AR., Mokhber-Dezfuli N., Kiuchi F. (2011): A review on phytochemistry and medicinal properties of the genus *Achillea*. *Daru* 19(3) (41-44)
- Sargsyan E., Vardanyan A., Ghalachyan L., Bulgadarya S. (2011): Cultivation of *Thymus* by In Vitro And Hydroponics Combined Method. *Engineering and Technology* 5 (119-122)
- Shatnawi M. (2012): Multiplication and cryopreservation of yarrow (*Achillea millefolium* L., Asteraceae). *Journal of Agricultural Science and Technology* 15(1) (163-173)
- Silva A.L.L., Costa J.L., Alcantara G.B., Carvalho D.C., Schuck M.R., Biasi L.A., Scheidt G.N., Soccol C.R. (2012): Micropropagation of *Nidularium innocentii* Lem. and *Nidularium procerum* Lindm. (Bromeliaceae). *Pakistan Journal of Botany* 44 (1095-1101)
- Silva A.L.L., Dornelles E.B., Bisognin D.A., Franco E.T.H., Horbach M.A. (2007): Micropropagation of *Dyckia agudensis* Irgang & Sobral – an extinction threatened bromeliad. *Iheringia, Série Botânica* 62 (39-43)
- Silva A.L.L., Oliveira Y., Costa J.L., Scheidt G.N., Carvalho D.C., Santos J.D., Guerra E.P. (2011): Pre-acclimatization and hydroponic acclimatization of micropropagated plants of *Eucalyptus saligna* Sm. *Revista Acadêmica : Ciências Agrárias e Ambientais* (9) (179-184)
- Stanojković A., J. Ceković, L. Čomić, R. Pivić, Stanojković A. (2008): Antibacterial properties of some plants from the family Asteraceae growing wild in Serbia. *Lekovite sirovine* (26-27) (11-20)
- Stepanović B., Radanović D., Turšić I., Nemčević N., Ivanec J. (2009): Uzgoj ljekovitog i aromatičnog bilja, Jan Spider, Pitomača
- Stojčevski K. (2011): Priručnik za gajenje lokovitog i aromatičnog bilja, Udruženje za lekovito bilje Dr Jovan Tucakov- Sokobanja, DO Film Publik Art
- Turker A.U., Yucesan B., Gurel E. (2009): In vitro Regeneration of *Achillea millefolium* L. from Shoot - tips and Root Segments of Seedlings. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 18 (65-69)
- Vinterhalter, D., Vinterhalter, B., (1996): Kultura in vitro i mikropropagacija biljaka. Axial, P.O., Beograd
- Wang S.M., Piao X.C., Park S.Y., Lian M.L. (2013): Improved micropropagation of *Gypsophila paniculata* with bioreactor and factors affecting ex vitro rooting in microponic system. *In Vitro Cellular & Developmental Biology- Plant*, 49(1) (70-78)
- Wawrosch C., Kopp B., Kubelka W. (1992): Micropropagation of species of the *Achillea millefolium* Agg., *Planta Medica* 58 (suppl.7) (627)
- Willfort R. (1989): Ljekovito bilje i njegova upotreba, Mladost, Zagreb
- Zapata E. V., Morales G.S., Lauzardo A.N.H., Bonfil B.M., Tapia G.T., Sánchez A., Del Valle M.V., Aparicio A.J. (2003): In vitro regeneration and acclimatization of plants of Turmeric (*Curcuma longa* L.) in a hydroponic system. *Biotecnología Aplicada*, 20 (1) (25-31)