

Kultura animalnih i biljnih stanica

KULTURA BILJNOG TKIVA (KBT)

Prof.dr.sc. Nataša Bauer
nbauer@biol.pmf.hr

- Predavanja utorkom 16-18 h (6 termina)
- Praktikum u kondenziranom obliku
 - P1: 4 sata
 - P2: 4 sati
 - P3: 4 sata

Pohađanje predavanja i praktikuma je obavezno.

Polaganje ispita:

Kolokvij iz biljnog dijela biti će početkom svibnja, a nakon zadnje vježbe (prema dogovoru).

Studentima koji izađu na kolokvij ocjena postignuta (1-5) se računa za biljni dio na ispitnom roku koji se prvi puta prijavljuje, pa na tom roku student piše samo animalni dio kolegija.

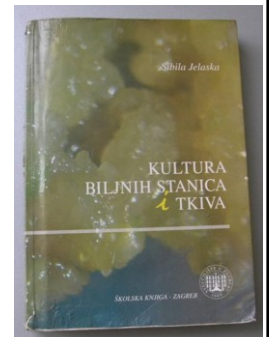
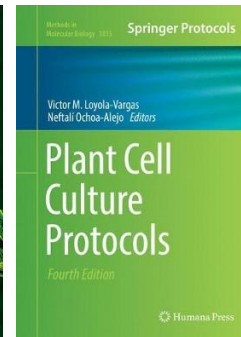
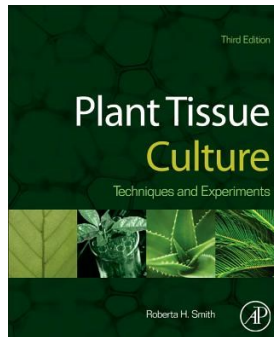
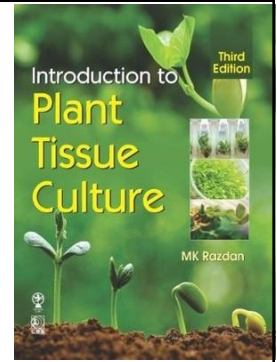
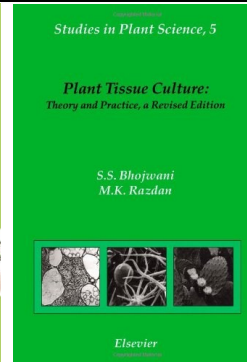
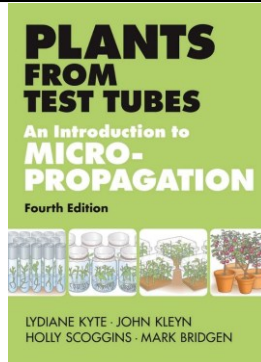
Na svim ostalim rokovima pišu se 2 testa – biljni i animalni dio, a završna ocjena je srednja vrijednost postignutih ocjena.

Ukoliko profesorice procjene, student može usmeno odgovarati za višu ocjenu.

Na usmenom student odgovara dio koji je na pismenom lošije ocijenjen.

Literatura

- Trevor Thorpe, History of Plant Tissue Culture, PDF dostupan na Intranetu
- Momoko Ikeuchi, Yoichi Ogawa, Akira Iwase and Keiko Sugimoto, Plant regeneration: cellular origins and molecular mechanisms. doi:10.1242/dev.134668, PDF dostupan na Intranetu
- <https://plantcelltechnology.com/blogs/blog/tagged/tissue-culture>



- **Kultura biljnog tkiva je aseptična kultura stanica, tkiva, organa i njihovih dijelova, uzgajana u definiranim fizikalno-kemijskim uvjetima *in vitro*.**
(*in vitro*=u staklu)



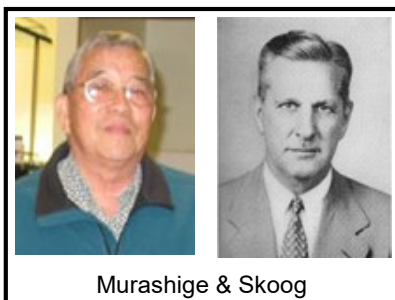
Gottlieb Haberlandt
1854-1945

Teorijsku osnovu za kulturu biljnog tkiva dao je Gottlieb Haberlandt još 1902.g. predlažući uzgoj pojedinačnih stanica u kulturi.

Predvidio je da se iz vegetativnih stanica mogu uspješno uzgojiti „umjetni” embriji. Time je jasno postavio koncept totipotentnosti.

Haberlandtova teorija totipotentnosti potvrđena je 1965.g. kada su Vasil i Hildebrandt regenerirali biljku duhana iz jedne izolirane stanice

1922 g. prvi uspješan uzgoj biljnog tkiva: Kotte je kultivirao vršak korijena graška, a Robbins vršak korijena kukuruza
 1929 g. Laibach je uveo metodu **spašavanja embrija** nastalih međuvrsnim križanjem i postavio osnovu za prvu komercijalizaciju kulture biljnog tkiva
 1934 g. White je **postavio i održavao** prvu uspješnu kulturu korijena rajčice
 1934 g. Gautheret je **postavio i održavao** prvu uspješnu kulturu kalusa mrkve
 1954 g. Muir je izolirao jednu biljnu stanicu i postavio kulturu biljnih stanica iz nje



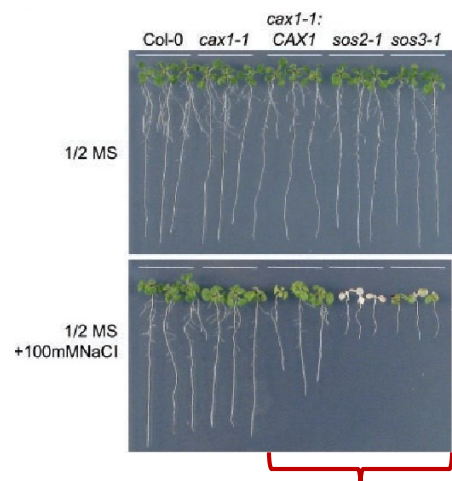
Murashige & Skoog

- Murashige and Skoog (MS) su nakod dugog istraživanja predložili sastav medija koji će, osim cjelovitih biljaka i većih biljnih eksplantata (nodalni segmenti, listovi) osiguravati i podupirati rast pojedinačnih stanica i malih nediferenciranih eksplantata.
- Ipak, **za pojedinu vrstu/genotip/tip eksplantata medij za uzgoj i regeneraciju je potrebno standardizirati metodom pokušaja i pogreške!**

Primjena kulture biljnog tkiva

Kultura tkiva je osnovni alat u biljnoj biologiji i ima različita područja primjene

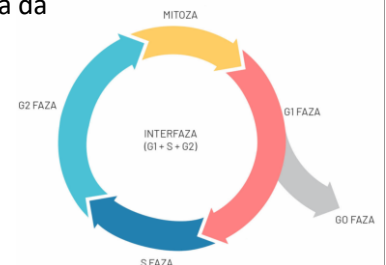
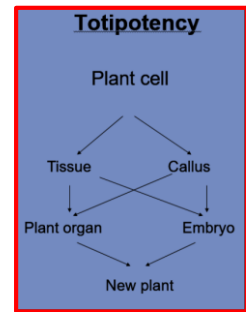
- (1) Proučavanje fiziologije i metabolizma pojedinačnih stanica
- (2) Modifikacija i poboljšanje svojstava biljaka
- (3) Regeneracija biljaka bez patogena
- (4) Čuvanje/skladištenje germplazme (vrste/genotipa) kroz dulje vrijeme
- (5) Klonsko razmnožavanje biljaka u kratkom vremenu i tijekom cijele godine
- (6) Proizvodnja korisnih metabolita



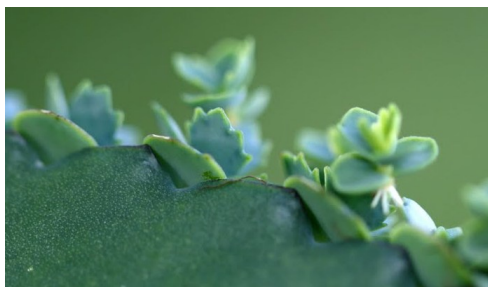
ISTRAŽIVANJE FUNKCIJE GENA
 Mutacije u ovim genima
 uzrokuju pojačanu osjetljivost
 biljke na slanost

Temeljne karakteristike biljnih stanica važne za kulturu *in vitro*

- **Totipotencnost** – inherentni kapacitet i potencijal biljne stanice za regeneraciju cijele biljke
 - Tijekom rasta i razvoja stanice se diferenciraju, no mnoge biljne stanice nisu terminalno diferencirane i mogu se rediferencirati!
 - Zahvaljujući tom svojstvu, tkivo i/ili kompletna biljka se može regenerirati iz samo jedne ili nekoliko stanica kotiledona, hipokotila, lista, korijena, plodnice, antera...
- **Dediferencijacija** – kapacitet i sposobnost diferenciranih biljnih stanica da se vrate u osnovno stanje i da se počnu dijeliti. U pogodnim uvjetima stanice se mogu rediferencirati i stvoriti novi razvojni oblik (npr. razvoj korijenja na eksplantatu lista)
- **Kompetentnost** – endogeni potencijal stanice ili tkiva da se razvije na točno određeni način.
 - Kad se iz meristema počne razvijati korijen ili izdanak, obrazac razvoja je fiksiran
- **Plastičnost** - sposobnost adaptacije biljke na različite uvjete okoliša, promjenama metaboličke aktivnosti, rasta i razvoja



TOTIPOTENTNOST



Razvoj somatskih embrija iz
lisne plojke *Kalanchoë*

DEDIFERENCIJACIJA



Indukcija kalusa
na kotiledonu

KOMPETENTNOST



Indukcija izdanka iz
bočnog pupa



PLASTIČNOST

Sposobnost biljaka da obrazac rasta prilagode okolišnim uvjetima



Životni ciklus biljaka

- Klijanje
- Klijanac
- Vegetativni rast
 - Vegetativni organi
- Germinativni rast
 - Germinativni organi
- Proizvodnja sjemena
- Starenje i smrt



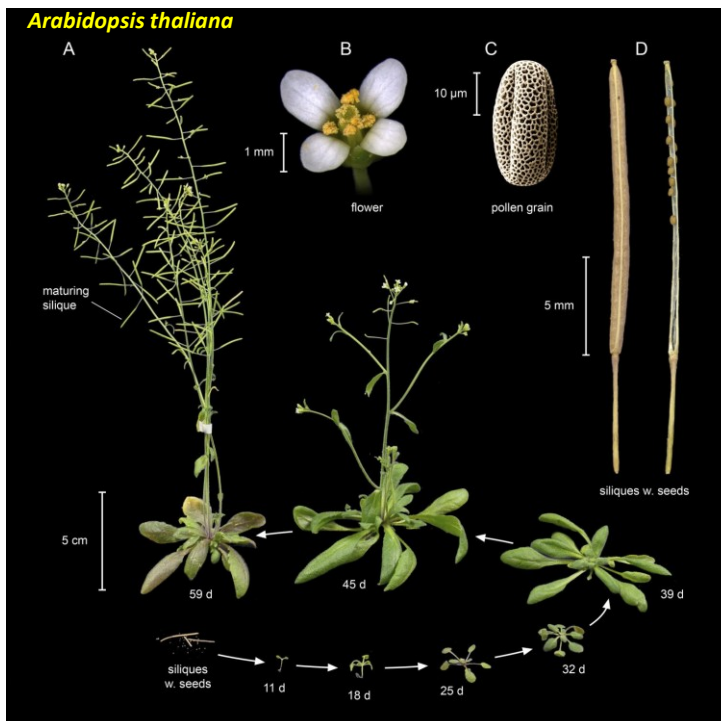
Tkiva biljaka

TVORNO TKIVO ILI MERISTEM iz kojeg se diferenciraju trajna, specijalizirana tkiva

- Zahvaljujući meristemu, biljka neprekidno raste u duljinu (primarni meristem), i/ili u širinu (sekundarni meristem).

Trajna tkiva nastaju diferenciranjem stanica meristema čime gube sposobnost staničnih dioba.

- Provodna tkiva: **KSILEM** (provodi vodu i mineralne tvari) i **FLOEM** (provodi asimilate kroz biljku)
- Pokrovno tkivo (epiderma i rizoderma),
- **OSNOVNO TKIVO ILI PARENHIM** čini većinu unutrašnjosti biljnog organizma, stanice mogu ponovno pokrenuti meristematsku aktivnost ili mogu diferencirati u potporno tkivo
- Žljezdano tkivo
- Potporno tkivo: **KOLENHIM** (stanice s debelim primarnim stjenkama koje mogu ponovno pokrenuti meristematsku aktivnost i početi se dijeliti) i **SKLERENHIM** (čvrste stjenke, mrtve stanice).



Vegetativni organi

Korijen učvršćuje biljku za podlogu, opskrbljuje vodom i mineralima.

Stabljika nosi biljne organe poput listova i cvjetova, sadrži provodne žile koji osiguravaju protok tvari kroz čitavo tijelo biljke.

List je organ u kojem se odvija fotosinteza i transpiracija.

Cvijet sadrži reproduktivne organe

Prašnici – u peludnici mejozom nastaju mikrospore

Tučak – u sjemenim zamecima mejozom nastaju megaspore

Nakon oplodnje se dijelovi cvijeta razvijaju u **plod sa sjemenkama**

Sjemenke predstavljaju novu generaciju potomaka.

Što je glavni pokretač biljnog rasta i razvoja?

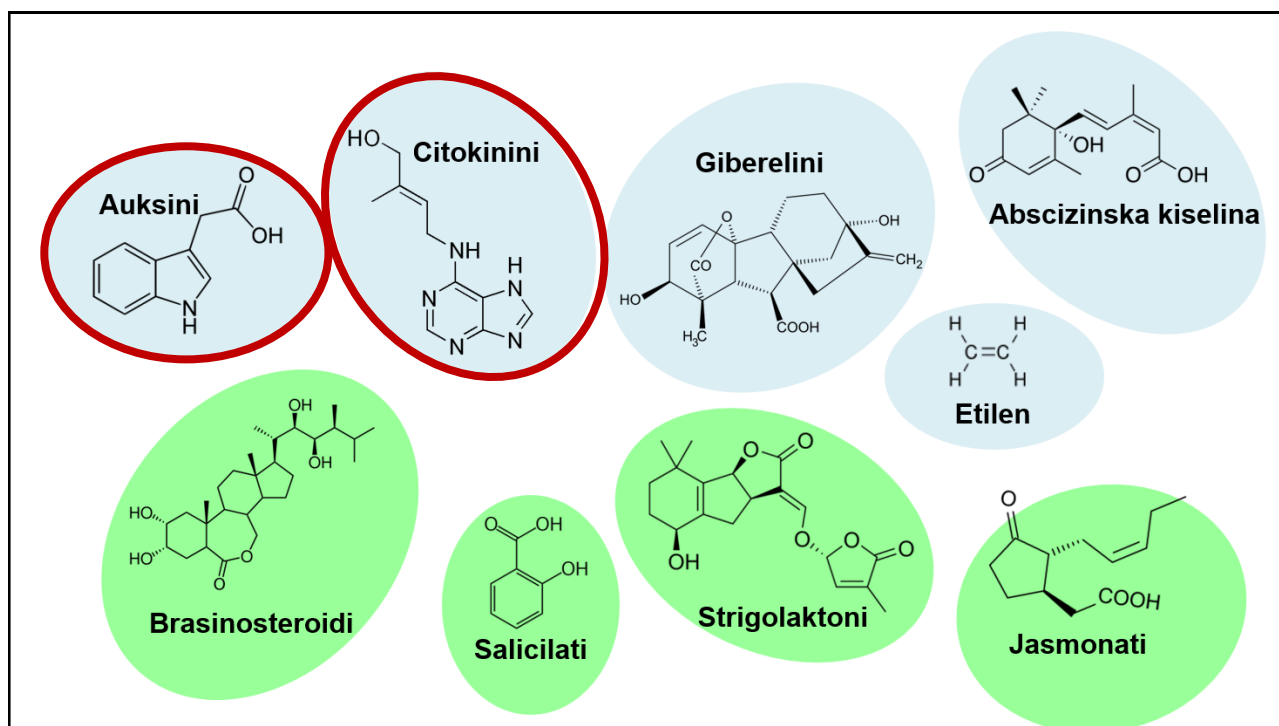
Što je glavni pokretač biljnog rasta i razvoja?

FITOHORMONI

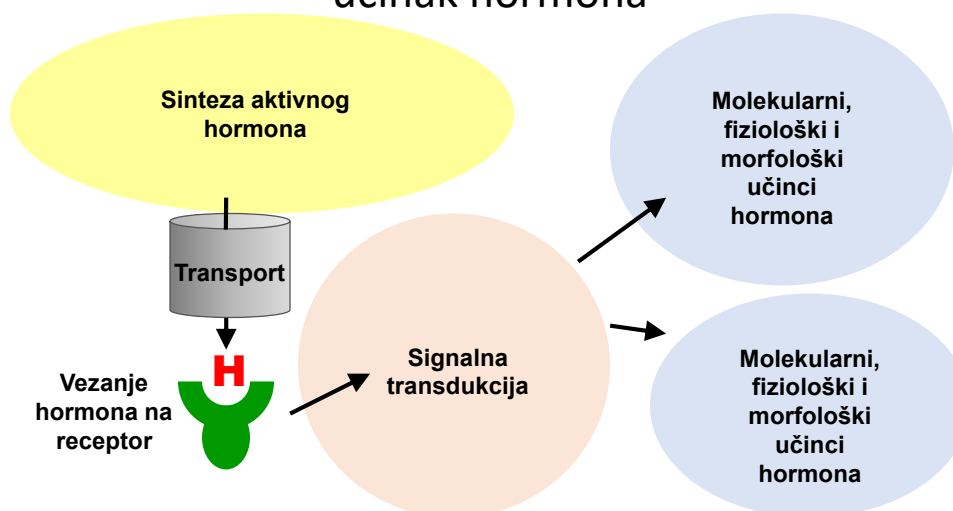
Fitohormoni reguliraju:

- stanične aktivnosti - diobu, produljenje (rast) stanice i diferencijaciju,
- formiranje tijela biljke,
- organogenezu,
- reprodukciju,
- određivanje spola,
- odgovore na abiotički i biotički stres.

<https://academic.oup.com/plcell/pages/hormones>

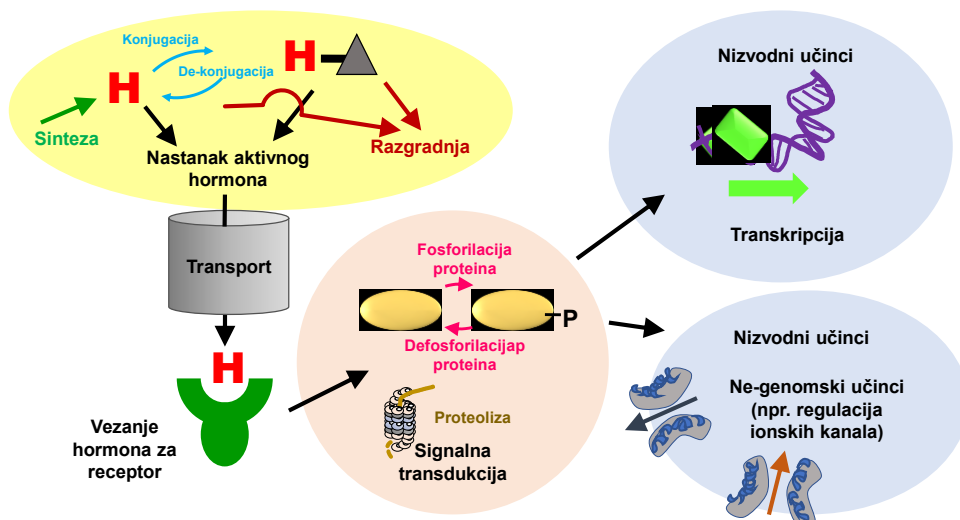


Sinteza, transport, percepcija, transdukcija signala i učinak hormona



Hormoni u stanici/organu/tkivu/biljci mogu djelovati istovremeno pa je za konačne biokemijske/fiziološke/morfološke učinke važno međudjelovanje hormona

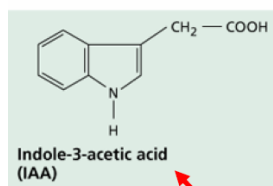
Sinteza, transport, percepcija, transdukcija signala i učinak hormona



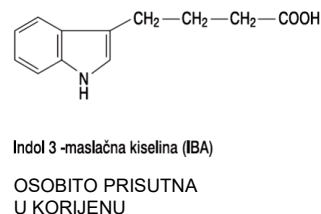
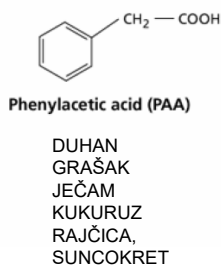
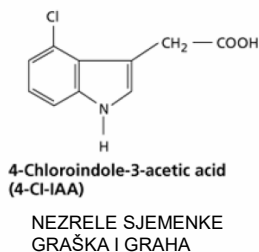
Auksini (grč. auexin-rast)

- Prirodne i sintetske molekule koje stimuliraju **elongaciju stanica koleoptile i stabljike, potiču stvaranje korijena, koče rast korijena u dužinu** (osim u vrlo niskim koncentracijama), **potiču stvaranje bočnog korijenja**
- Potiču **dormanciju bočnih pupova** (sprečava grananje izdanka)
- Induciraju stanične diobe i diferencijaciju provodnih tkiva

PRIRODNI AUKSINI

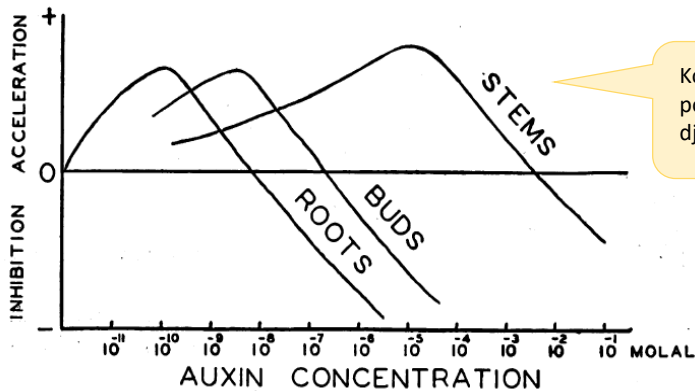


Najvažniji prirodni auksin



Različita tkiva imaju različitu osjetljivost na auksin

Aktivni u malim koncentracijama: 10^{-6} do 10^{-10} M



Koncentracije auksina koje potiču izduživanje stabljike djeluju inhibicijski na korijenje

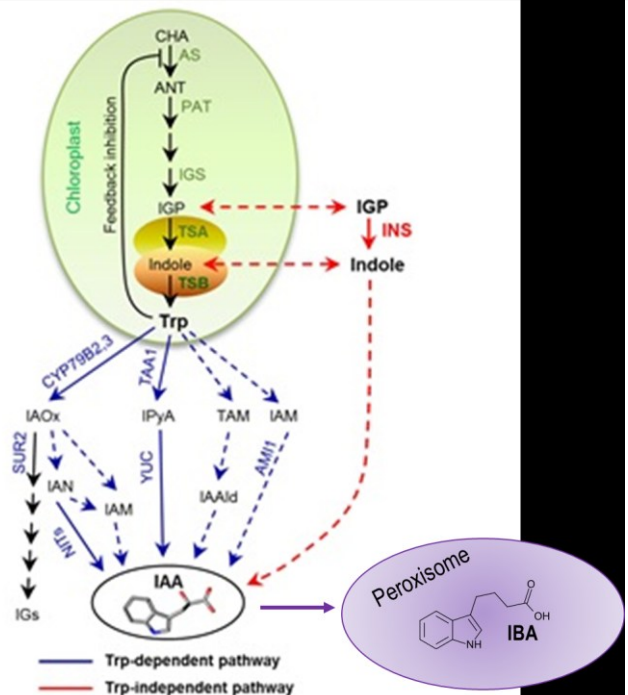
Thimann, K.V. (1938). Hormones and the analysis of growth. Plant Physiol. 13: 437-449.

Sinteza auksina u biljkama

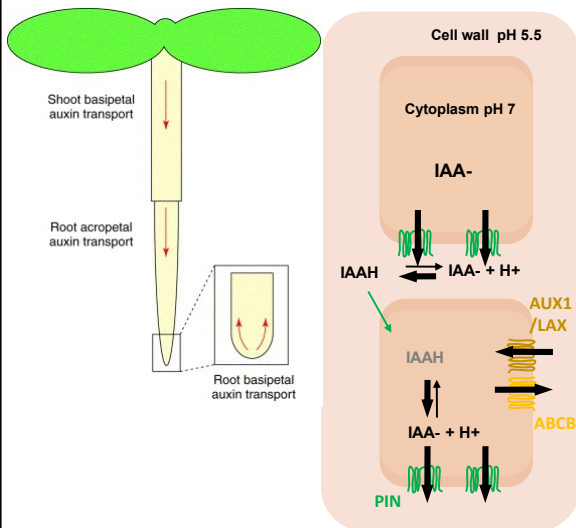
Sinteza auksina kontrolirana je okolišnim i razvojnim faktorima koji utječu na regulaciju ekspresije gena važnih za biosintezu IAA i IBA

Glavna mjesta sinteze auksina u biljci:

- Vršni i bočni meristemi
- Embriji
- Mladi listovi
- Plodovi
- Polen



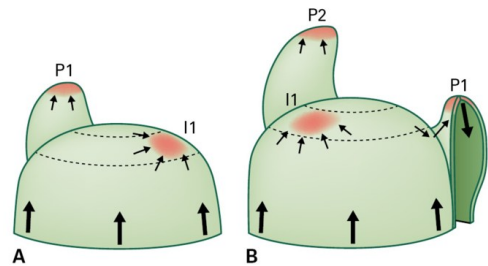
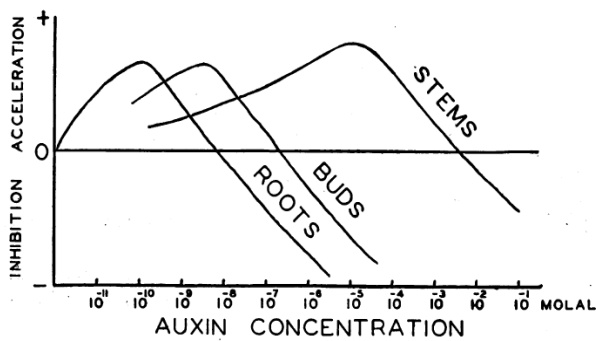
TRANSPORT AUKSINA



- Konjugati i slobodna IAA se transportiraju bazipetalno floemom iz izdanka u korijen i akropetalno centralnim cilindrom prema vrhu korijena.
- Za transport je osobito važan polarni transport slobodne IAA
- Prijenos auksina izvan stanice kontroliraju tri obitelji transportnih proteina (PIN, ABCB i AUX1/LAX). PIN proteini osobito kontroliraju usmjerenost kretanja auksina i asimetrična raspodjela transportera je zaslužna za polarni transport auksina.
- **Najveća koncentracija auksina u biljci je u vršku korijena** (maksimum u stanicama tihog centra)

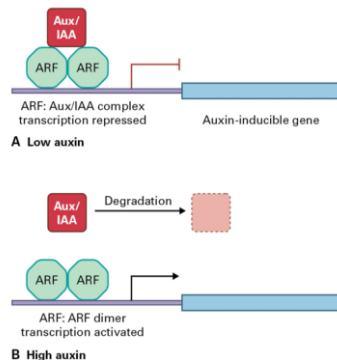
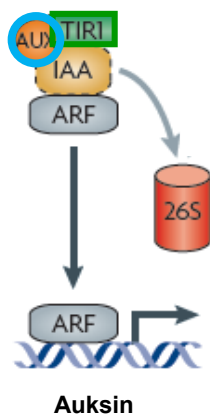
Redrawn from Robert, H.S., and Friml, J. (2009) Auxin and other signals on the move in plants. *Nat. Chem. Biol.* 5: [325-332](#).

- Različita tkiva imaju različitu osjetljivost na auksin i dodatak istog hormona uzrokuje drugačije efekte, ovisne o tipu stanica/tkiva koje tretiramo



- Polarnim transportom (strelice) auksin se nakuplja u stanicama epiderme iz kojih će inicirati razvoj lista

Vezanje auksina na hormonski receptor (TIR) uzrokuje degradaciju u stanici prisutnih regulatornih proteina (Aux/IAA), te transkripciju gena (*de-novo* sintezu novih proteina)

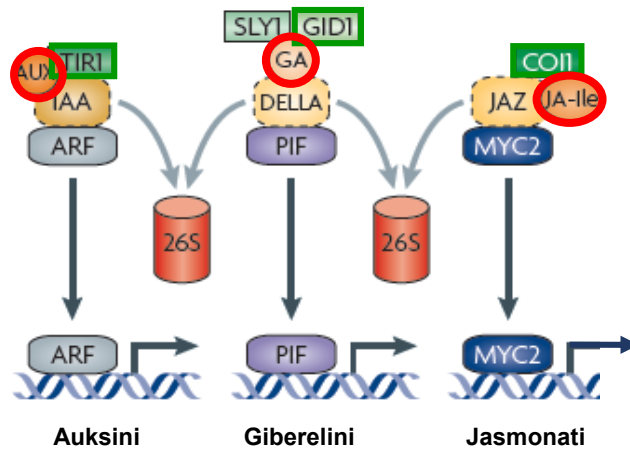


- Visoka koncentracija auksina inducira proteolitičku degradaciju Aux/IAA proteina i omogućava aktivaciju transkripcije
- Auksin može inducirati stanice pericikla na stvaranje adventivnog ili bočnog korijenja, no u stanicama koleoptile potiče produžni rast.
- U ove različite procese su uključeni različiti signalni proteini (ARF) diferencijalno zastupljeni u različitim tipovima stanica.

Aux/IAA genes: 29 from *Arabidopsis*, 55 from *Brassica rapa*, 119 from *Brassica napus*, 26 from *Citrus*, 26 from *Eucalyptus grandis*, 26 from *Solanum lycopersicum*, 26 from *Solanum tuberosum*, 26 from *Vitis vinifera*, and 35 from *Populus trichocarpa*

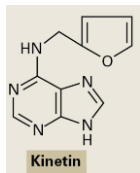
- Hormoni i hormonski receptori: vezanje hormona na hormonski receptor može uzrokovati degradaciju u stanici prisutnih regulatornih proteina, te transkripciju gena (*de-novo* sintezu novih proteina)

Fitohormoni (crveno) se vežu na receptore (zeleno) i aktiviraju proteolitičku degradaciju represora (žuto), čime se oslobađa aktivator transkripcije (plavo)



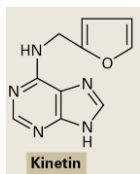
Reprinted by permission from Macmillan Publishers, Ltd: NATURE Wolters, H., and Jürgens, G. (2009). Survival of the flexible: Hormonal growth control and adaptation in plant development. Nat. Rev. Genet. 10: 304–317. Copyright 2009.

Citokinini = spojevi koji potiču diobe stanica (citokinezu)



Kinetin je prvi korišteni citokinin u kulturi biljnog tkiva (1950-tih), a nastaje autoklaviranjem ekstrakta DNA

Citokinini = spojevi koji potiču diobe stanica (citokinezu)



Kinetin je prvi korišteni citokinin u kulturi biljnog tkiva (1950-tih), a nastaje autoklaviranjem ekstrakta DNA

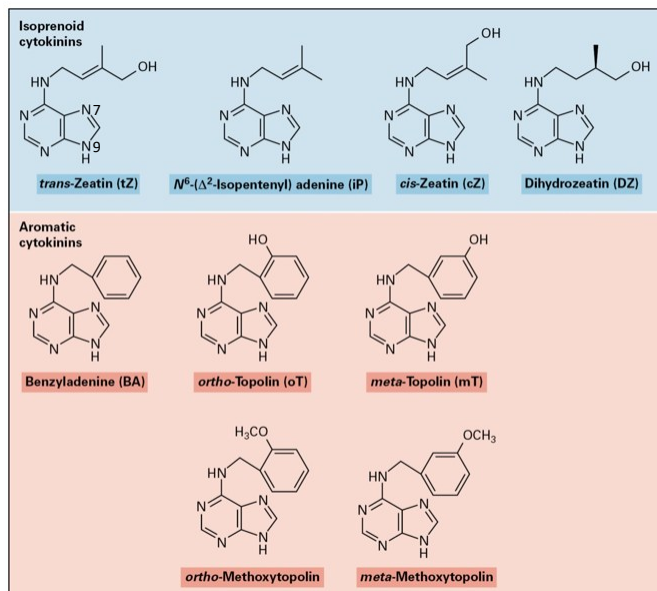
Svi prirodni citokinini su derivati N6 supstituiranog **adenina**

(1) SLOBODNE BAZE

(2) VEZANI CITOKININI

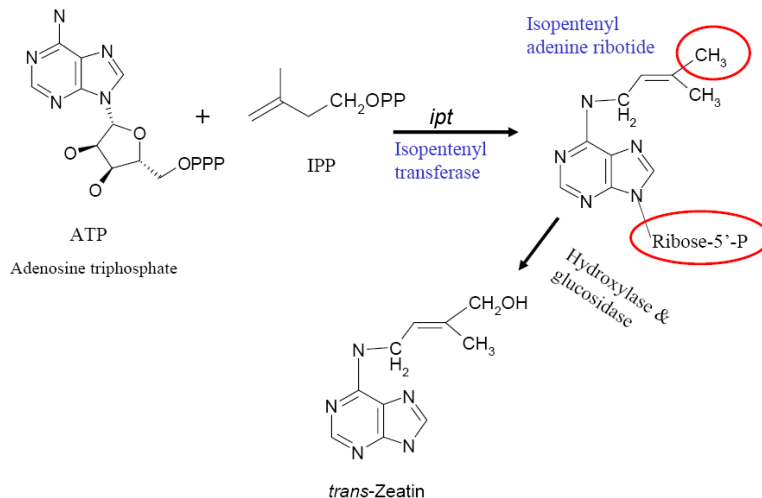
Ribozidi, ribotidi, glikozidi (glukoza vezana na N⁷ ili N⁹ purinskog prstena ili na atom kisika u bočnom lancu zeatina)

(3) MODIFICIRANE BAZE ODREĐENIH MOLEKULA tRNA (nakon hidrolize neke od tih baza djeluju kao citokinini)



Biosinteza citokina

- Floem izdanka i korijena
- Nezrele sjemenke
- Primordiji bočnog korijenja
- Sintezu u korijenu induciraju nitrati



Razgradnja citokina

- Enzimski razgradnja pomoću **citokinin oksidaza** (CKX) ima ključnu ulogu u regulaciji citokininske aktivnosti. CKX pretvara zeatin, zeatin-ribozid i izopentenil-adenin u adenin ili njegove derivate
- Ne djeluje na sintetske citokinine (kinetin i 6-benzilaminopurin: BAP)!

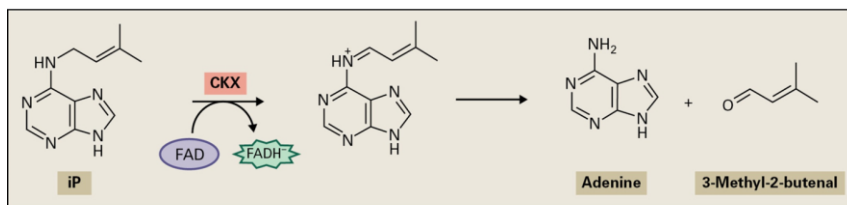
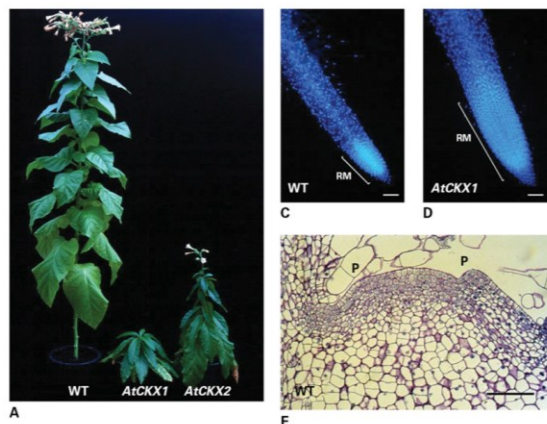


FIGURE 17.34 CKX removes the side chain from CK molecules. CKX catalyzes the oxidation of the secondary amine group on the side-chain of the adenine ring. The resulting imine product is nonenzymatically hydrolyzed, producing adenine and an aldehyde.

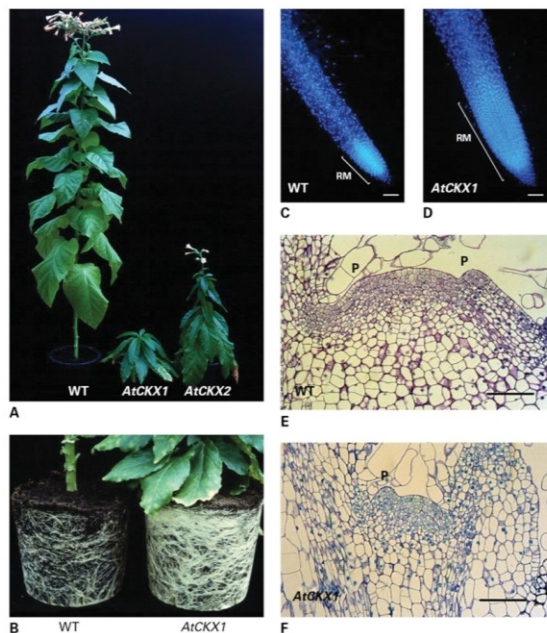
Transport citokina

- Većina citokina se u biljnim tkivima brzo pretvara u nukleozide, nukleotide i glikozide – imaju značajno smanjenu hormonsku aktivnost i važan su rezervni i transportni oblik jer ih ne cijepa CKX
- Iz korijena u izdanak transportiraju se ksilemom (u obliku ribozida), a iz izdanka u korijen floemom u formi nukleotida, a na mjestu djelovanja prelaze u nukleozid ili glikozilirane forme

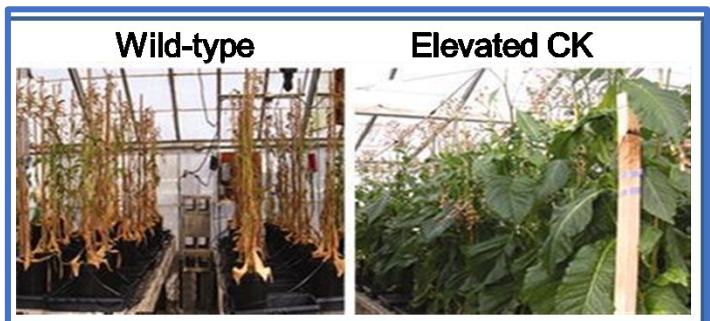


- Pojačana ekspresija CKX dovodi do smanjene razine citokinina u biljci i uzrokuje zastoj u razvoju izdanka zbog reduciranih staničnih dioba, no djeluje na bolji rast korijena i pojačane diobe stanica u meristemu korijena

FIGURE 17-35 Opposite phenotypes resulting from reduction of CKs in *N. tabacum* shoot and root. (A) Shoot phenotype of wild-type (WT) and transgenic lines overexpressing two different constructs of the Arabidopsis CKX genes: AtCKX1 and AtCKX2. (B) Root phenotype of WT and AtCKX1. (C, D) Root apices of WT and AtCKX1 stained with DAPI. (E, F) Longitudinal section through shoot apical meristem (SAM) of WT and AtCKX1. The SAM is reduced in CK-deficient plants (AtCKX1). RM, root meristem; P, leaf primordia. Bar represents 100 μm .



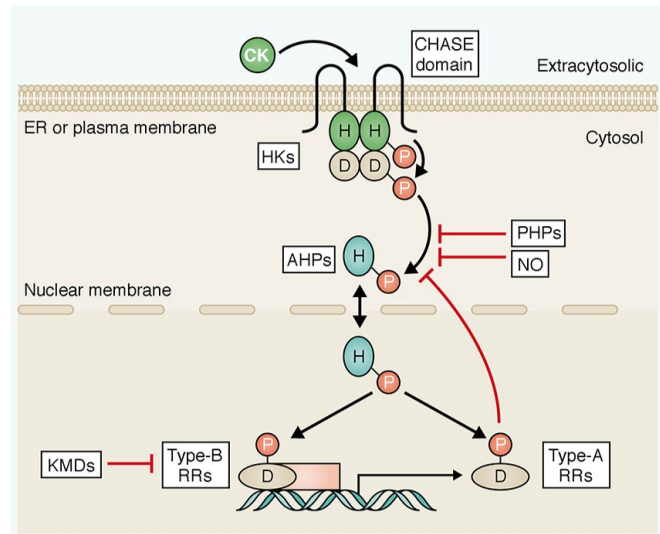
- Pojačana ekspresija CKX dovodi do smanjene razine citokinina u biljci i uzrokuje zastoj u razvoju izdanka zbog reduciranih staničnih dioba, no djeluje na bolji rast korijena i pojačane diobe stanica u meristemu korijena



- Biljke duhana s povišenom razinom citokinina su otpornije na sušu

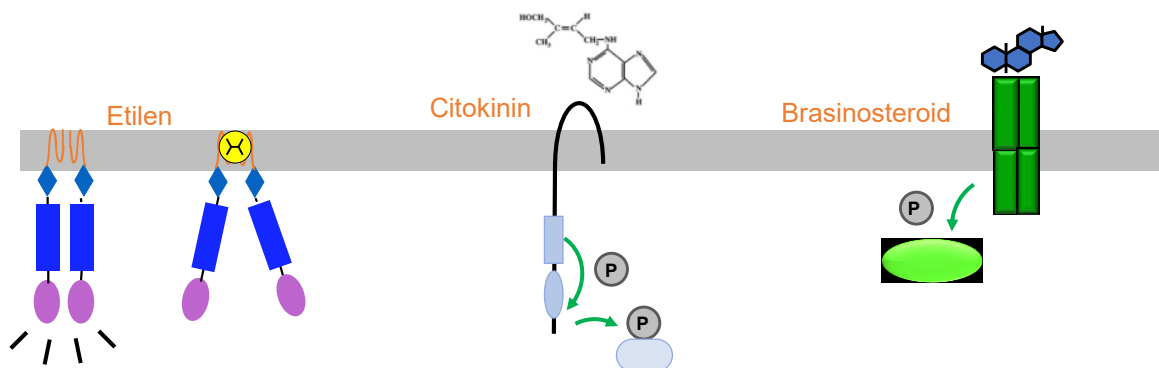
Receptori za citokinine vezani za membranu

Vezanje citokinina za receptor uzrokuje autofosforilaciju membranskog receptora (histidin kinaze HK), signal se dalje prenosi na autentične histidin fosfotransferaze (AHPs) koje u jezgri fosforilacijom aktiviraju regulatore tipa B receptor koji zatim aktivira sintezu receptora tipa A (također fosforiliranog s AHP)



<https://journals.biologists.com/dev/article/145/4/dev149344/48589/Cytokinin-signaling-in-plant-development>

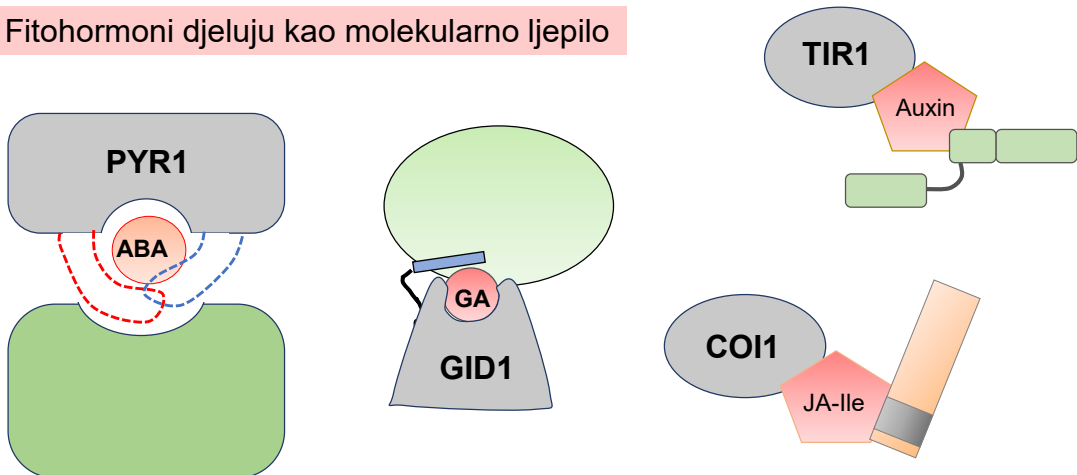
Drugi hormoni također djeluju preko receptora vezanih za membranu



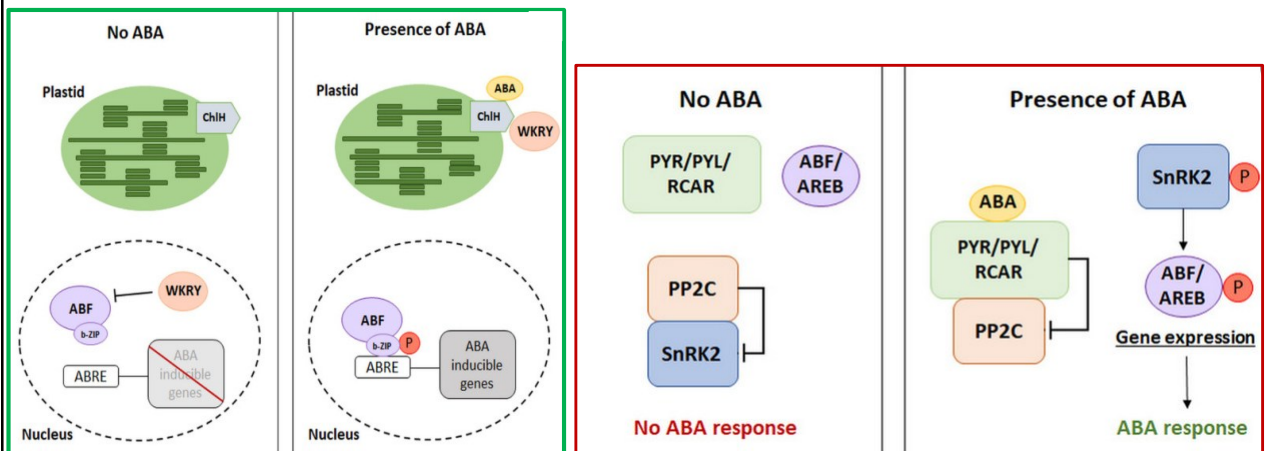
Vezanje hormona na receptor potiče nizvodno, unutarstanično signaliziranje

Vezanje hormona na topive receptore olakšava proteinske interakcije

Fitohormoni djeluju kao molekularno ljepilo

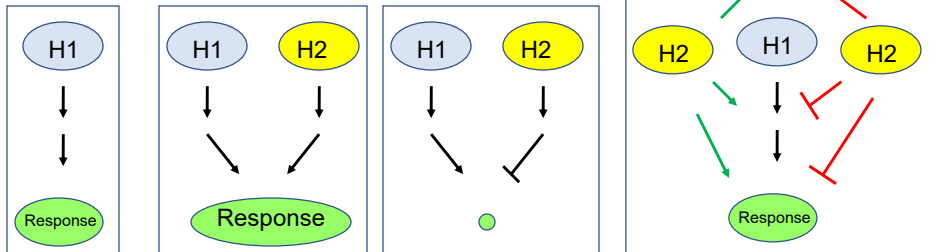


Više načina djelovanja istog hormona



- Proteini WKRY su represori ABF transkripcijskih faktora. Hormon ABA uzrokuje vezanje WKRY represora, te vezanje i inhibiciju protein fosfataze 2C, što omogućava fosforilaciju SnRK2 i ABF te aktivaciju transkripcije gena

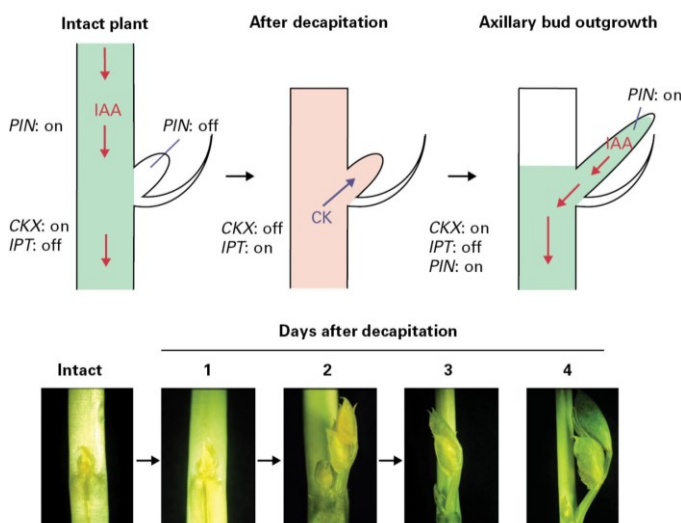
Međudjelovanje hormona



Međudjelovanje (*crosstalk*) hormona može biti pozitivno (aditivno, sinergističko) ili negativno

Međudjelovanje hormona: hormoni mogu djelovati na sintezu, transport i signalne putove drugog hormona.

Međudjelovanje hormona

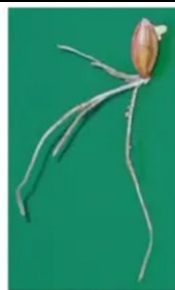
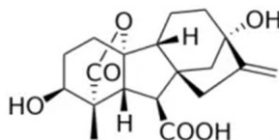


KONTROLA APIKALNE DOMINACIJE I RAZVOJ IZDANAKA IZ BOČNIH PUPOVA

- U intaktnoj biljci auksini iz apikalnog meristema induciraju PIN proteine (transport auksina) i CKX (degradacija citokinina), a inhibiraju IPT (sinteza citokinina) čime smanjuju razinu citokinina i sprečavaju razvoj izdanka iz bočnog pupa.
- Nakon odstranjivanja vršnog meristema smanjuje se količina auksina što dovodi do represije CKX i aktivacije IPT, te se povećava razina citokinina koji potom induciraju razvoj izdanka iz bočnog meristema
- Vršni meristem bočnog izdanka počinje sintetizirati auksin koji djeluje inhibitorno na razvoj sekundarnih bočnih izdanaka....

Giberelini

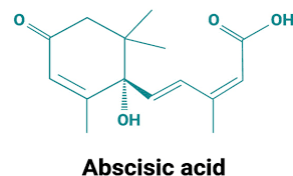
Gibberellins



- Tetraciklički diterpeni, karakterizirano oko 130 spojeva no samo nekoliko ima hormonsko djelovanje
- Sinteza iz gliceraldehid trifosfata u mladim tkivima izdanka.
- Transport ksilemom i floemom
- Potiču germinaciju (nekih) sjemenki
- **GA3 uzrokuje hiperelongaciju stabljike stimulirajući diobe i produžni rast stanica**

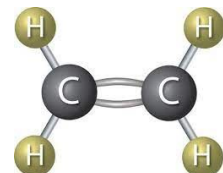
Abscizinska kiselina ABA

- Sintetizirana se iz gliceraldehid-3-fosfata preko izopentenil difosfata i karotenoida u korijenu i zreloom lišću.
- Prenosi se ksilemom, a iz lišća i floemom.
- Povišene koncentracije uzrokuju zatvaranje puči
- **Inhibira rast izdanka, ali može potaknuti rast korijena**
- Održava dormanciju sjemenki sprečavajući preuranjeno klijanje



Etilen

- Plin koji se u većini tkiva sintetizira kao odgovor na stres, te tijekom dozrijevanja plodova i starenja
- Difuzijom prelazi u okolne stanice
- Uzrokuje produljenje hipokotila, inducira razvoj adventivnog korijena, dozrijevanje plodova, odbacivanje listova i plodova, otvaranje cvjetova
- Kao alternativa u kulturi se koristi ACC (1-aminociklopropan-1-karboksilna kiselina), koja je neposredni prekursor u biosintezi etilena



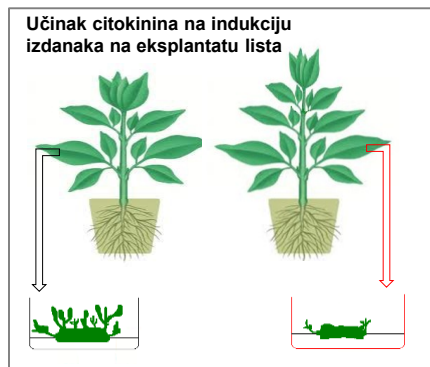
Biljni regulatori rasta

Hormoni - organske supstance koja se sintetiziraju u biljci te će u niskim koncentracijama potaknuti, inhibirati ili na bilo koji način kvantitativno promijeniti rast, obično na mjestu koje nije mjesto sinteze.

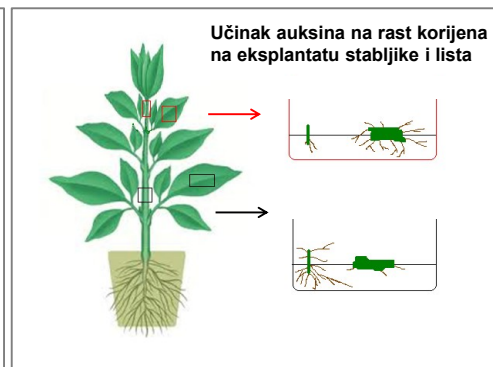
Pojam regulator rasta podrazumijeva hormone i sintetske komponente koje djeluju poput ili slično prirodnim hormonima

Aktivnost hormona/regulatora rasta nije uvijek ista:

- Ista kemikalija može prouzročiti drugačiji odgovor na različitim biljkama.
- Pojedini dijelovi iste biljke različito reagiraju na istu kemikaliju.



Drugačiji odgovor različitih biljaka



Odgovor ovisi o starosti i položaju eksplantata

Međudjelovanje hormona u kulturi biljnog tkiva



Za pojedinu vrstu/genotip/tip eksplantata medij za uzgoj i regeneraciju je potrebno standardizirati metodom pokušaja i pogreške

HRANJIVA PODLOGA ZA RAST BILJNOG TKIVA/*STANICA IN VITRO*

- Izvor H₂O (redestilirana ili deionizirana)
- Izvor mineralnih soli
- Izvor organskih tvari
- Izvor vitamina
- Izvor regulatora rasta

Makroelementi

Dušik (N) – kritičan za sintezu proteina

- nitratni ion (NO_3^- oksidiran) ili amonij ion (NH_4^+ reduciran) ili organski
- 25-60 mM; KNO_3 , NH_4NO_3 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ itd.

Kalij (K) – glavni stanični ion, odgovoran za stanični vodni status

- 20-30 mM; KCl ili K_2HPO_4

Fosfor (P) – važan za aktivaciju enzima i sintezu DNA i RNA

- 1-3 mM; K_2HPO_4 ili KH_2PO_4 , ili Na soli

Kalcij (Ca) – važan za strukturu st. stjenke i aktivnost enzima

- 1-3 mM; CaCl₂ ili $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$

Magnezij (Mg) - sastavni dio klorofila i kofaktor enzima

- 1-3 mM; MgSO_4

Sumpor (S) – važna komponenta proteina

- 1-3 mM; u obliku sulfata SO_4

Mikroelementi

Fe 1 μM – važan za fotosintezu i respiraciju

Mn 5-30 μM – važan za membranske strukture kloroplasta i aktivnost enzima

Zn – važan za stvaranje klorofila i kofaktor enzima

B – važan za transport šećera

Cu 0.1 μM – važan za sintezu klorofila i respiraciju

Mo 1 μM – uključen u konverziju nitrata u amonijeve ione

Co 0.1 μM – neophodan za fiksaciju dušika

I

Ni

Al

Si

Organski dodaci

☐ Šećer

- Saharoza - glavni transportni oblik šećera u biljaka, prilikom autoklaviranja se raspada na glukozu i fruktozu
- Glukoza, fruktoza, maltoza...
- Koristi se od 20 do 40 g/L medija

☐ Vitamini

- Tiamin (vitamin B1) – jedini nužan, koenzim, važan za sintezu nekih aminokiselina i za Krebsov ciklus
- Nikotinska kiselina (niacin), B3 – važna u fotosintezi
- Piridoksin (B6) – stimulira rast
- Askorbinska kiselina - antioksidans

Ostali organski dodaci

☐ Šećerni alkoholi, npr. inozitol, manitol...

INOZITOL - ključna komponenta hranjive podloge

- ima ulogu u rastu i razvoju biljaka, uključujući biosintezu stanične stijenke, odgovor na stres, skladištenje fosfata, osmotoleranciju, međustaničnu komunikaciju te skladištenje i transport regulatora rasta i hormona.
- zaštitna uloga od solnog stresa (štiti od ROS, regulira razinu vode)
- spremište fosfata (veže 6 fosfata)
- važan za međustaničnu komunikaciju
- veže auksine i tako ih inaktivira, te stvara brzo dostupnu pričuvu auksina koji nakon hidrolize inozitola postaju aktivni

VIŠE O INOZITOLU: <https://www.plantcelltechnology.com/blog/myoinositol-what-is-it-and-how-to-use-it/>

Ostali organski dodaci

❑ Ostali vitamini

Biotin (vitamin H),
Ca pantotenat,
cianokobalamin (vitamin B12),
folna kiselina,
riboflavin (vitamin B2),
tokoferol (vitamin E)

❑ Aminokiseline, često se dodaju Gly i Gln

❑ Prirodni dodaci:

- Kokosovo mlijeko
- Voćni ekstrakti
- Hidrolizat proteina, npr. kazein hidrolizat

Aktivni ugljen

- ireverzibilno apsorbira različite spojeve koji remete rast

Rast biljčica sekvoje bolji je na podlozi s aktivnim ugljenom jer on veže tanine i druge metabolite koji djeluju inhibitorski

