

Государственное автономное учреждение
дополнительного образования Республики Коми
«Республиканский центр дополнительного образования»
Детский технопарк «Кванториум»
Республика Коми

Клональное микроразмножение мяты перечной в культуре *IN VITRO*

Исполнитель:
Турьева Мария Максимовна,
учащаяся 9 класса

Научный руководитель:
Лиханова Надежда Владимировна,
к.б.н.,
педагог дополнительного образования

Сыктывкар, 2019

Содержание

	стр.
Введение.....	3
1. Литературный обзор.....	4
1.1. Эфирномасличное производство.....	4
1.2. Особенности мяты перченой.....	5
1.3. Методы культивирования <i>in vitro</i> клеток и тканей высших растений.....	5
1.4. Питательные среды и физические факторы, оптимальные для культур.....	6
1.5. Дедифференциация тканей высших растений <i>in vitro</i> и первичный каллусогенез....	6
1.6. Микрклональное размножение растений.....	7
2. Методика исследования.....	8
3. Результаты и их обсуждение.....	11
Заключение.....	13
Список использованной литературы.....	14
Глоссарий.....	16
Приложение.....	17

Введение

В настоящее время актуальной становится проблема получения лекарственного сырья. Производство сырья из растительного материала отстаёт от нужды фармацевтической промышленности. За последние 40 лет мировое производство эфирных масел увеличилось с 50 до 250 тыс. тонн в год. Ежегодная потребность российских производителей в мятном масле около 450 тонн. В производстве масел используются около 300 видов культурных и дикорастущих эфирносов (Метелица В.А., 2009). Возрастание потребности в лекарственном сырье отражается на запасах растений, незначительно представленных в составе естественной флоры.

На сегодняшний день накоплен обширный исследовательский материал, демонстрирующий возможность микроразмножения растений, как на основе культуры изолированных меристем, так и при использовании в качестве эксплантов других органов и тканей (Виджешвар и др., 1997; Митрофанова, 1997; Бутенко, 1999; Ravingerova, 2000 и др.).

Новизна исследования. В настоящее время для выращивания мяты используются исключительно традиционные методы (корневищами и рассадой) (Терехин, Вандышев, 2008). Необходима разработка результативных технологий для производства высококачественного посадочного материала. В основном работы по клональному микроразмножению видов и сортов мяты нацелены на использовании культуры изолированных меристем или вегетативных почек (Родов, Давыдова, 1987; Бидюкова, Кириченко, 2001). Однако возможность клонального микроразмножения растений на основе культуры изолированных стеблевых эксплантов предложены для субтропических и тропических плодовых культур (Percakova and alt., 1986).

Возможность клонального микроразмножения путем культивирования *in vitro* эксплантов стеблевых сегментов показана в основном для субтропических и тропических плодовых культур (Percakova and alt., 1986; Митрофанова, 1997). Ученые Savithri В. и др. (2001) и Phannipha С. и др. (2004) проводили клональное микроразмножение в два этапа. На первом этапе в культуре растений исследователи добивались прямой индукции вегетативных почек (микроробегов) или каллуса на первичной питательной среде. На втором этапе, образующиеся микроробегов переносили на среду для корнеобразования, а каллус на среду для регенерации.

Цель исследования: разработка способа размножения мяты перечной методом *in vitro* в культуре стеблевых эксплантов.

Задачи исследования:

- 1) апробировать возможность размножения в культуре стеблевых эксплантов мяты перечной через этап каллусообразования;
- 2) оценить количественные показатели побего- и корнеобразования при культивировании стеблевых эксплантов мяты перечной.

Гипотеза. В культуре стеблевых эксплантов регенерация растений мяты перечной происходит непрямым путем – через этап каллусообразования.

1. Литературный обзор

1.1. Эфирномасличное производство

Около 30 лет назад наиболее высоким уровнем развития эфиромасличной отрасли отличалась Европа. Франция производила свыше 60 наименований эфирных масел высокого качества. В Советском Союзе вырабатывалось 25 наименований этой продукции, далее следовали Италия, Испания, Болгария.

Наиболее крупным экспортером и импортером эфирных масел на мировом рынке является США. Но если основу экспорта США составляет всего четыре наименования эфирных масел (апельсиновое, мятное, лимонное, кедровое), то импорта – более 30. Большие количества эфирных масел в широком ассортименте ввозят страны Европейского континента, это в первую очередь Франция, Англия, Голландия и Германия.

Кризисные явления 70-х гг. прошлого века в мировой экономике, рост цен на энергоресурсы и земельные участки привели к удорожанию всех видов промышленной и сельскохозяйственной продукции, в том числе и эфирных масел, производство которых в ряде случаев стало нерентабельным. Все это обернулось свертыванием производства эфирных масел в ряде стран.

Традиционные центры эфиромасличного производства продолжают перемещаться в страны третьего мира, которые расположены в оптимальных для возделывания эфирноносителей природно-климатических условиях, располагают дешевой рабочей силой и относительно свободными земельными площадями. Постепенно одним из крупнейших производителей эфирных масел становится Китай.

В настоящее время мировые цены на эфирномасличное сырье для российского рынка неподъемны, производители готовой косметической и фармакологической продукции пользуются преимущественно импортными суррогатами (производство Китай). Как правило, в Россию везут дешевые эфирные масла или того хуже – идентичные натуральным суррогаты. Возделывают мяту перечную в России в Краснодарском крае, Воронежской, Московской, Новосибирской и Самарской областях. В ближнем зарубежье большие плантации мяты имеются на Украине, в Белоруссии и Молдове (http://vershen.ru/info/mirovloe_proizvodstvo_efirnyh_masel.html).

В Республике Коми более 100 видов сосудистых растений природной флоры применяются в практической медицине, но только 50 из них произрастают в количествах, необходимых для организации их заготовки (Сосудистые растения, 2012). К лекарственным растениям относятся также некоторые лишайники, мхи и грибы. Из перечня заготавливаемых лекарственных растений должны быть исключены редкие лекарственные растения Красной книги (адонис сибирский, родиола розовая, пион и др.).

Ресурсы лекарственных растений изучены в основном в пределах таежной зоны РК, для тундры и лесотундры сведений о них мало. В последние годы в регионе заготавливалось лекарственное растительное сырье порядка 30 наименований. Запасы багульника, вахты, мяты перечной, хвоща полевого, тысячелистника, березы (почки), сосны (почки), пихты (веточки с хвоей), черники (ягоды) значительно превышают местные потребности.

1.2. Особенности мяты перечной

Мята перечная (*Méntha piperíta L.*) – травянистое многолетнее растение семейства Яснотковые (*Lamiaceae*), культивируемое в агрохозяйствах и на индивидуальных участках. Морфологические признаки мяты перечной представлены в таблице 1.

Таблица 1. Морфологические признаки мяты перечной

Признаки	Показатели
Высота растений, см	71
Длина центрального стебля, см	70
Количество боковых ветвей, шт.	2,2
Опушение	по жилкам, на верхней и нижней стороне листовой пластинки
Цветки: расположение, цвет	на верхушке стебля, сиреневые
Количество листьев, шт.	20
Листья: длина, см	3,5
ширина, см	1,5
площадь, см ²	4,3

Мята – лекарственное и эфиромасличное растение с большим спектром применения. Мята содержит эфирное масло (60-70%), главным компонентом которого является циклический спирт ментол. Кроме этого в растении содержатся аскорбиновая кислота – до 25%, каротин – до 40%, рутин – до 14%, и другие соединения.

Существуют две формы мяты перечной: белая и чёрная. В России возделывают чёрную и промежуточную формы, именно к ней принадлежат большинство сортов отечественной селекции.

1.3. Методы культивирования *in vitro* клеток и тканей высших растений

Существует значительное количество методов и различных классификаций клонального микроразмножения. Согласно одной из них – классификация Мурасиге (1977), процесс микроразмножения можно осуществлять следующими путями:

1. Активация пазушных меристем.
2. Образование побегов тканями экспланта.
3. Возникновение побегов в каллусе.
4. Индукция эмбриогенеза в клетках экспланта.
5. Соматический эмбриогенез в каллусной ткани.
6. Формирование придаточных эмбриоидов в ткани первичных соматических зародышей (деление первичных эмбриоидов).

Чтобы получить каллусные культуры клеток, фрагменты органов и тканей растения помещают на питательную среду (Тимофеева, Румянцева, 2012).

1.4. Питательные среды и физические факторы, оптимальные для культур

Культивирование клеток и тканей *in vitro* происходит на питательных средах. В их состав входят макро- и микроэлементы, витамины и углеводы (глюкоза или сахароза). Ауксины, создающие дифференцировку клеток, и цитокинины, индуцирующие деления клеток, являются обязательными составляющими питательных сред (Концевая, 2008; Медведев, 2011). В связи с тем, что большинство каллусных тканей лишено хлорофилла, и они неспособны к автотрофному питанию, необходимо добавление в питательную среду углеводов. При твердофазном способе культивирования используются среды, содержащие агар-агар (такая среда имеет вид плотного геля). На рост и развитие тканей растений *in vitro* большое влияние оказывают температура, свет и влажность. Так как большинство каллусных тканей не способны фотосинтезировать, они могут расти в условиях слабого освещения или в темноте. В качестве источника света используют люминесцентные лампы. Благоприятная освещённость для большинства растений составляет 1000 люкс, а слишком низкая (300 люкс) или высокая (3000–10000 люкс) освещённость замедляет рост. Оптимальна температура для большинства каллусных культур является 24-26°C. Влажность в помещении, где растут культуры, должна составлять 60–70%.

1.5. Дедифференциация тканей высших растений *in vitro* и первичный каллусогенез

Согласно Р. Г. Бутенко (1999) высшие растения состоят из дифференцированных клеток с различными функциями. Но все эти клетки образовались от одной зиготы — оплодотворенной яйцеклетки материнского растения. Эта клетка содержит в себе всю генетическую основу растения, из нее образуются узкоспециализированные ткани, различные по выполняемым функциям, форме и структуре.

При образовании каллуса происходит дедифференциация клеток, то есть утрата первоначальных функций, свойственных ткани или органу, из которых был получен каллус. Однако при изменении условий культивирования можно вызвать вторичную дифференциацию и получить растение. Растительные клетки способны в определенных условиях регенерировать целое растение. Решающую роль в образовании корней из изолированных клеток и тканей играют ауксины и цитокинины в питательной среде. Таким образом, при вторичной дифференциации из каллуса может развиваться растение. Культивируемые клетки растений – это клеточная популяция, в которой каждая клетка является отдельным организмом, способным к автономному развитию в течение длительного времени.

1.6. Микрклональное размножение растений

Микрклональное размножение растений осуществляют с помощью черенкования (Тимофеева, Невмержицкая, 2012). Побеговые черенки образуются из боковых почек на питательных средах. Растения, сформировавшие 5-6 листочков, в стерильных условиях извлекают из пробирок и нарезают на части (отрезок стебля). Черенки высаживают на питательные среды. Рост стебля и корней начинается на 3-4 день после посадки на питательную среду, а полностью растения формируются через 12-15 дней. Полученные побеги можно либо укоренить, либо использовать для дальнейшего микрочеренкования.

Для получения безвирусного посадочного материала используют культуру апикальных меристем (Тимофеева, Румянцева, 2012). При культивировании апексов размножение вирусов подавляется реакцией растительного организма на травму, вызванную отсечением верхушки. Апикальная меристема – группа меристематических (образовательных) клеток, организованных в ростовой центр, занимающая терминальное положение в побеге или корне и обеспечивающая образование всех органов и первичных тканей. В среднем от посадки меристемы на среду до формирования проростков с 5-6 листочками проходит 30-45 дней, в некоторых случаях от 2 до 8 месяцев. Среда по мере истощения обновляют, и проростки периодически пересаживают на новые среды в стерильных условиях.

2. Материал и методика исследования

Материалом для проведения исследований послужила мята перечная (*Méntha piperíta L.*). Мы использовали чёрную форму мяты перечной с аноциановой окраской стеблей и жилок листьев, лист тёмно-зелёный, содержит большое количество эфирного масла, но аромат резкий. Эта форма мяты более приспособлена к условиям Республики Коми. Растение-донор мяты перечной *Méntha piperíta L.* выращено в условиях открытого грунта на территории г. Сыктывкара. В качестве инициальных стеблевых эксплантов использовали сегменты стебля длиной 0,5-0,8 см.

Подготовка питательной среды и выделение апикальных меристем для дальнейшего получения безвирусного посадочного материала

Наиболее подходящей для образования каллусов и индукции морфогенеза у многих растений является среда Мурасиге-Скуга, поэтому для выделения апикальных меристем и микроклонирования мяты на основе изолированных стеблевых эксплантов мы использовали именно её. Приготовили питательную среду по прописи Мурасиге-Скуга (Топчий и др., 2015). В приложении представлен используемый состав для приготовления питательной среды. Питательную среду разлили в пробирки и стерилизовали под давлением 0,2 Мпа, при температуре 120°C (рис. 1-2).



Рис. 1-2. Приготовленная питательные среды и подготовка к стерилизации

Микроразмножение проводили в два этапа:

I – выделение апикальных меристем для получения безвирусного посадочного материала;

II – основной процесс микроклонирования.

Получения безвирусного посадочного материала

Для создания стерильных условий все манипуляции с растением проводились в ламинарном боксе (рис. 3-4). Образец – небольшую часть меристемы 0,5 см предварительно обработали этанолом (1 минута), затем промыли дистиллированной водой. Следующим этапом была промывка в 15%

перекиси водорода (5 минут), промывка дистиллированной водой. Пинцет после каждого применения прокаливается на огне. Затем на агаризованной питательной среде меристемы культивировали поверхностно. Такую операцию проделываем с остальными фрагментами соблюдая правила работы в стерильных условиях. Для выращивания культуры использовали химические пробирки с 5-8 мл питательной среды. Экспланты поместили в специально оборудованное помещение с кондиционированным воздухом, температурой 24-25°C, влажностью воздуха 60-70%, освещенностью 5кЛх и фотопериодом 16 часов.



Рис. 3-4. Работа в ламинарном-боксе

Наблюдение за ростом посадочного материала мяты

При визуальном наблюдении было выявлено отсутствие вирусных заболеваний, «цветения» питательной среды, что говорит о том, что процесс высадки меристем в питательную среду прошел удачно (рис. 5). По истечению одного месяца после высадки меристем мяты мы зафиксировали проростки, состоящие из двух листков. Посадочный материал находился в помещении при температуре 24-25°C и влажности 60–70%.



Рис. 5. Наблюдение за посадочным материалом

Основной процесс микроклонирования

Второй этап клонального микроразмножения так же включает в себя приготовление и стерилизацию питательной среды. Для проведения микроклонального размножения использовали среду Мурасиге-Скуга и следующие условия стерилизации (давление 0,2 Мпа, температура 120°C). Далее мы производили микроразмножение изолированных стеблевых эксплантов мяты перечной (рис. 6-9). Манипуляции так же проводились в стерильном боксе.

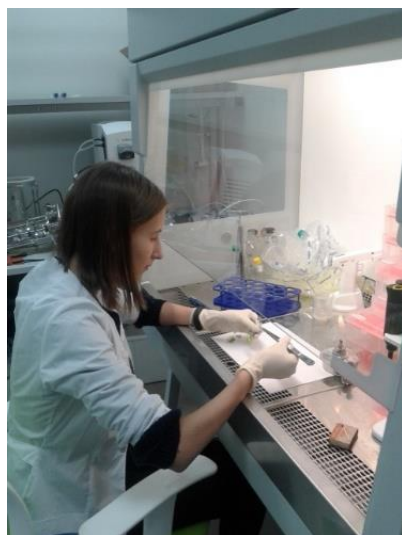


Рис. 6-7. Процесс подготовки стеблевого экспланта к посеву

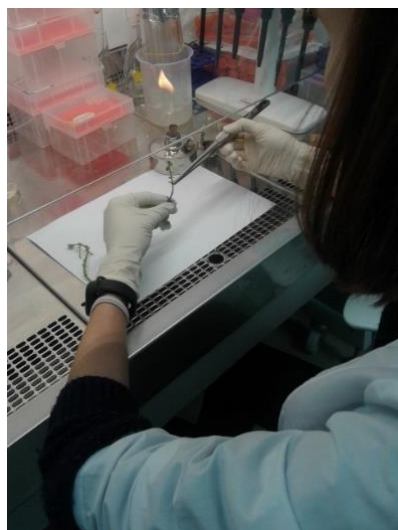


Рис. 8-9. Процесс посева стеблевого экспланта на питательную среду

В процессе культивирования проводили визуальный анализ морфогенеза растений. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили на персональном компьютере с использованием программного обеспечения.

3. Результаты и их обсуждение

В наших исследованиях особый интерес вызывают количественные показатели побего- и корнеобразования при культивировании стеблевых эксплантов (табл. 2). При эксплантации стеблевых сегментов мяты перечневой на питательную среду Мурасиге-Скуга первым видимым проявлением ответной реакции экспланта являлась индукция каллусогенеза (рис. 10).

Таблица 2. Показатели побего- и корнеобразования при микроклональном размножении изолированных стеблевых эксплантов мяты перечневой *Mentha piperita L.*

№	Показатели	Результаты
1	Возникновение каллуса	6 сутки
2	Дифференциация вегетативных почек	10 сутки
3	Развитие микропобегов	13 сутки
4	Количество микропобегов	2-4 шт.
5	Образование корней	18 сутки
6	Количество длинных корней	1-4 шт.
7	Количество коротких корней	5-8 шт.

Ответной реакцией на поранение, которое было произведено с обоих концов стеблевого сегмента, в местах среза явилось образование каллуса на 6 сутки культивирования. Интенсивность роста каллуса оценен нами как умеренный. Дифференциация вегетативных почек наблюдалась на 10 сутки на поверхности каллуса. На 15 сутки из образующихся почек развивались микропобеги. На 18 сутки из одного экспланта стеблевого сегмента мяты образовалось от 2 до 4 микропобегов (рис. 11).



Рис. 10. Образование каллуса

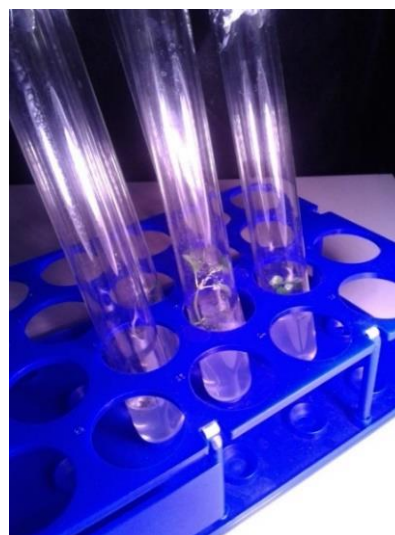


Рис. 11. Стеблевой эксплант на 18 сутки

Образующиеся микропобеги имели нормальную морфологию без признаков дефектности окраски и витрификации. На 30 сутки из одного экспланта стеблевого сегмента мяты перечневой развилось до 14 микропобегов с 3-4 парами листьев без каких-либо признаков дефектности (рис. 12).

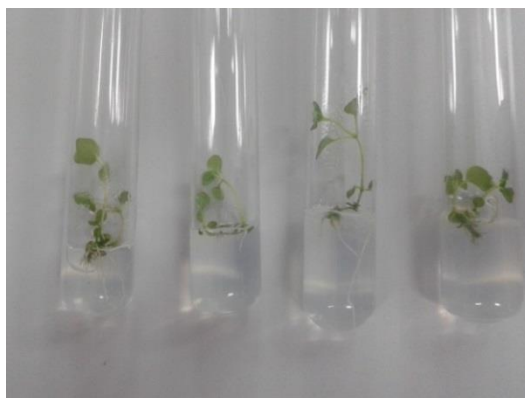


Рис. 12. Стеблевой эксплант на 30 сутки

Видимые признаки корнеобразования обнаруживались в культуре стеблевых сегментов на 14 сутки. Регенерация корней начиналась на 4 сутки. На 18 сутки культивирования из одного экспланта стеблевого сегмента мяты развивалось от 1 до 4 длинных корней и от 5 до 8 коротких (рис. 13-14).



Рис. 13-14. Развитие корневой системы на 18 сутки

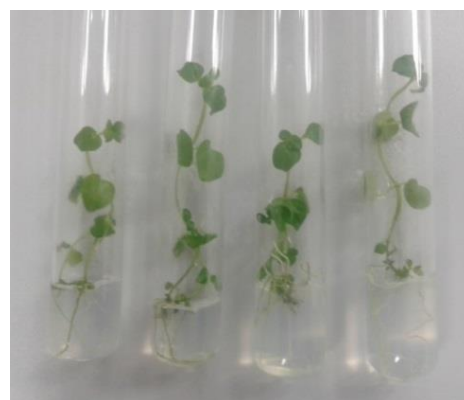


Рис. 15-16. Мята перечная через 1,5 месяца

При оценке процесса микроклонирования мяты перечной можно с уверенностью сказать, что количественные показатели соответствуют стандартным срокам процесса размножения в условиях *in vitro*.

Заключение

В ходе проведения работы разработан процесс микроклонального размножения мяты перечневой при использовании в качестве эксплантов стеблевых сегментов в один цикл. Выращивание культуры происходит с формирования укорененных микропобегов, что исключает проведение дополнительного этапа культивирования с целью индукции корнеобразования и делает разработанный цикл более технологичной с точки зрения практической реализации.

При анализе количественных показателей побего- и корнеобразования при культивировании стеблевых эксплантов мяты перечной выявили, что количественные показатели соответствуют стандартным срокам процесса размножения в условиях *in vitro*.

Таким образом, исследование показало, что выращивание мяты перечной методом клонального микроразмножения путем культивирования *in vitro* может при необходимости в короткие сроки обеспечивать лекарственным сырьем фармацевтическую промышленность республики.

Список использованной литературы

1. Бидюкова Г.Ф., Кириченко Е.Б. Репродуцирование *in vitro* растений мяты и их продукционная оценка // Сельскохозяйственная биотехнология. М.: Евразия, 2001. Т. 2. С. 165-175
2. Бутенко Р. Г. Биология высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе / Учебное пособие. М.: ФБК-Пресс, 1999. 160 с.
3. Виджешвар П., Митрофанова О.В., Лищук А.И. Клональное микроразмножение актинидии превосходной (*Actinidia deliciosa* (Chev.) Liang, Ferguson)//Биотехнологические исследования садовых и других ценных многолетних культур. Сб. науч. трудов / Никит. ботан. сад. 1997. Т. 119. С. 111-126
4. Концевая И.И. Влияние цитокинина на морфогенез в культуре листовых эксплантов березы // Сборник науч. трудов. Института леса НАН Беларуси. Гомель, 2008. Вып. 68. С. 205-2013
5. Медведев С.С. Ауксин и его роль в регуляции морфогенеза растений // НАН Беларуси, ИЭБ им. В.Ф. Купревича. Минск, 2011. С. 5
6. Метелица В.А. Состояние и перспективы развития рынка лекарственных растений / Экономические вопросы развития сельского хозяйства Беларуси. Минск.: БелНИИАЭ, 2009. С. 189-195
7. Митрофанова И.В. Микрклональное размножение субтропических и тропических плодовых культур (обзор литературы). Сборник научных трудов. Никит. ботан. сад. 1997. Т. 119. С. 63-95.
8. Мурашкина И. А., Васильев И. Б., Гордеева В. В. Использование культуры клеток растений в биотехнологии лекарственных средств / Учебное пособие. Иркутск: ИГМУ, 2015. 83с. С. 15-26.
9. Родов В.С., Давыдова О.А. Размножение мяты методом культивирования меристем // труды ВНИИЭМК. 1987. Т. 18. С. 78-83
10. Сосудистые растения Республики Коми. Часть II. Семенные растения / Учебное наглядное пособие / сост. Кочетков А.А. / ГОУ ДОД «Коми РЭБЦ». Сыктывкар, 2012. 44 с.
11. Терехин А.А., Вандышев В.В. Технология возделывания лекарственных растений / Учебное пособие. М.: РУДН, 2008. 201 с.
12. Тимофеева О.А., Невмержицкая ю.Ю. Клональное микроразмножение растений / Учебно-методическое пособие. Казань: Казанский университет, 2012. 56 с.
13. Тимофеева О.А., Румянцева Н.И. Культура клеток и тканей растений. ФГАОУ ВПО издательство «Казанский фед. университет». Казань, 2012 С. 3-9
14. Топчий М.В., Чурилова Т.М., Панова Н.В., Цысь А.Е. Основы Биотехнологии. Ставрополь: Издательство СтГМУ, 2015. 76 с.
15. Шелепова О.В., Кириченко Е.Б., Бидюкова Г.Ф., Олехнович Л.С., Курилов Д.В., Смирнова И.М., Енина О.Д. Динамика накопления и состав эфирного масла сортов и гибридов мяты, интродуцированных в средней полосе России // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Естественные науки, 2011. Вып.14 (3-1). С. 346-351.
16. Pavingerova D., Briza J., Prenerova E. Obvozeniprimarnich kultur z kvetnich pupenu rododendrromu // Rostl. Vyroba/ 2000/ Vol. 46, № 6. P. 281-286

17. Phannipha C., Suttikan S., Phongsri S., Atchara T. Appropriated condition for shoot initiation of certain plant // Indian J. Biotech. 2004. Vol. 3, N 1. P. 185.

18. Repcakova K., Rychlova M., Cellarova E., Houcariv R. Micropropagation of *Mentha piperita* L. through tissue cultures // Herba hung. 1986. Vol. 25, N 2. P. 77-88.

19. Savithri B., Gupta S. K., Tuli R., Khanuja S. P. S., Sharma S., Bagchi G. D., Anil K., Sushil K. Micropropagation of mint // Current Science. 2001. Vol. 80, N 7. P. 878.

Интернет источники:

http://vershen.ru/info/mirovoe_proizvodstvo_efirnyh_masel.html

<https://aromatnauki.ru/articles/393475>

Глоссарий

Апикальная меристема – группа меристематических (образовательных) клеток, организованных в ростовой центр, занимающая терминальное положение в побеге или корне и обеспечивающая образование всех органов и первичных тканей.

Дифференциация – комплекс процессов, приводящих к различиям между дочерними клетками, а также между материнскими и дочерними клетками.

Дедифференциация – переход специализированных, неделящихся клеток к образованию недифференцированных делящихся каллусных клеток

Каллус - ткань, возникшая путем неорганизованной пролиферации клеток органов растений.

Клональное микроразмножение – получение *in vitro* неполовым путем растений, генетически идентичных исходному растению

Лекарственные растения — обширная группа растений, органы и части которых являются сырьем для получения средств, используемых в народной, медицинской или ветеринарной практике с лечебными или профилактическими целями.

Морфогенез – процесс формирования органов (органогенез), тканей (гистогенез) и клеток (цитогенез или клеточная дифференцировка).

Регенерация – способность живых организмов со временем восстанавливать повреждённые ткани, органы.

Тотипотентность – свойство трагических клеток растений полностью реализовать свою наследственную программу онтогенетического развития при определенных условиях выращивания вплоть до образования взрослых растений и семян.

Эксплант – фрагмент ткани или органа, инкубируемый самостоятельно или используемый для получения первичного каллуса.

In vitro – выращивание живого материала на искусственных питательных средах, в стерильных условиях.

Состав питательной среды Мурасиге-Скуга*

Компоненты	Концентрация солей в 1 литре готового маточного раствора, мг	Объем маточного р-ра, мл для приготовления 1 литра среды
<i>Маточный раствор макроэлементов</i>		
NH ₄ NO ₃	33000	50
KNO ₃	38000	
CaCl ₂ * 2H ₂ O	8800	
MgSO ₄ * 7H ₂ O	7400	
KH ₂ PO ₄	3400	
<i>Маточный раствор микроэлементов</i>		
KJ	166	5
H ₃ BO ₃	1240	
MnSO ₄ * H ₂ O	4460	
ZnSO ₄ * 7H ₂ O	1720	
Na ₂ MoO ₄ * 2H ₂ O	50	
CuSO ₄ * 5H ₂ O	5	
CoCl ₂ * 6H ₂ O	5	
<i>Маточный раствор хелатного железа</i>		
FeSO ₄ * 7H ₂ O	5560	5
Na ₂ ЭДТА * 2H ₂ O	7460	
<i>Витамины и органические вещества</i>		
Мезоинозит	20000	5
Никотиновая кислота	100	
Пиридоксин-НСl	100	
Тиамин-НСl	100	
Глицин	400	
<p>Добавлять в виде порошка в среду перед варкой: Сахароза – 30 г/л Агар-агар – 7 г/л рН готовой среды – 5,6-5,8 * для получения стерильных проростков на 1 литр среды берут 1/2 часть маточных растворов, т.е. вместо 50 мл раствора макроэлементов берут 25 мл и т.д.</p>		

* Топчий М.В., Чурилова Т.М., Панова Н.В., Цысь А.Е. Основы Биотехнологии. Ставрополь: Изд-во СтГМУ, 2015.