

Bilansi kretanja sadržaja azota u hranljivim podlogama i delovima izdanaka podloge za trešnju Camil gajene u *in vitro* uslovima

Đurđina Ružić¹, Radosav Cerović^{1,2}, Tatjana Vujović¹

¹Institut za voćarstvo, Kralja Petra I 9, 32000 Čačak, Srbija
E-mail: jugvocca@yu.net

²Ministarstvo prosvete i nauke RS, Njegoševa 12, 11000 Beograd, Srbija

Primljeno: 25. februara, 2011; prihvaćeno: 29. aprila, 2011.

Rezime. U radu je prikazan bilans kretanja azota između medijuma i izdanaka podloge za trešnju Camil gajene *in vitro*. Utvrđene su relacije između usvajanja i distribucije ovog esencijalnog elementa za rastenje i multiplikaciju *in vitro* kultura. Ova istraživanja predstavljaju novi pristup u sagledavanju odnosa vezanih za mineralnu ishranu *in vitro*.

Ključne reči: Camil, podloga za trešnju, *in vitro* multiplikacija, azot, bilansi

Uvod

Kultura tkiva *in vitro* je podesna za praćenje mineralne ishrane jer je metoda brza, lake su manipulacije, biljke su uniformne u fiziološkom i genetskom smislu, a mogućnost pojave bolesti je u ovom zatvorenom, aseptičnom sistemu eliminisana.

Rastenje biljaka *in vitro* je na prvom mestu povezano sa sastavom medijuma na kome se gaje. Do danas ne postoji univerzalni medijum za gajenje biljaka *in vitro*. Naime, biljne vrste i sorte poseduju *sortnu ili genetsku specifišnost mineralne ishrane* u odnosu na različite komponente medijuma (koja ne uključuje samo organske supstance, već i mineralne elemente) (Sarić et al., 1995).

Dosadašnja proučavanja pokazuju da je mineralni sastav mnogih medijuma deficitaran u nekim makroelementima, ili ih ima u višku, tako da prouzrokuje abnormalan rast, hiperhidričnost i mnoge druge neželjene efekte kod biljaka gajenih *in vitro* (Murashige

i Skoog, 1962; Nedelcheva, 1986; Lumsden et al., 1990).

Mnogi medijumi u kulturi tkiva se baziraju na sastavu Murashige i Skoog (MS) medijuma (Murashige i Skoog, 1962) koji je dizajniran za ćelijske kulture *Nicotiana tabacum*. Tako je MS medijum korišćen u oko 25% sprovedenih istraživanja iz kulture ćelija i tkiva i za više od 50% svih biljaka proizvedenih mikropropagacijom (Leifert et al., 1995).

U eksperimentima sa vodenim i peščanim kulturama, optimalne koncentracije mnogih elemenata za biljke gajene u *in vivo* uslovima su manje nego koncentracije elemenata u medijumima korišćenim za *in vitro* razmnožavanje (Lumsden et al., 1990). Uloga makroelemenata je veoma važna kako za biljke gajene *in vivo*, tako i za kulture *in vitro*, a posebno azota. U uslovima *in vitro* azot se može primeniti u neorganskoj i organskoj formi. Prema Murashige i Skoog-u (1962) optimalna doza azota u medijumu za gajenje kalusa duvana je 50 mM, pa je čak zadovoljavajući i

veći nivo, 60 mM. Uticaj azota na organogenezu, morfogenezu i embriogenezu je evidentan, bilo da je u pitanju njegova forma, ili koncentracija (Quoirin i Lepoivre, 1977; Driver i Kuniyuki, 1984; McCown i Selmer, 1987; Gomez i Segura, 1994 i dr.).

Smanjenje količine azota u medijumu ima pozitivan, a u nekim slučajevima negativan efekat. Prema Ružić *et al.* (1997) pri potpunom isključenju azota iz medijuma u fazi multiplikacije vegetativnih podloga za trešnju, Gisela 5, Inmil i Camil, su ispoljile oštre simptome nedostatka ovoga elementa kao: veoma jaka hloroza ivica i celih listova koji su vremenom dobijali narandžastu boju i otpadali pri dodiru.

Danas se sve više koriste analitičke metode koje nam omogućavaju da utvrdimo pristupačnost elemenata u medijumu, mehanizme usvajanja, korelaciju između koncentracije elemenata i stope rastjenja *in vitro*. Proučavanja hemijskih promena koje se javljaju u medijumima pokazuju da otežano snabdevanje biljaka mineralnim elementima može nastati zbog različitih faktora: dodate početne količine mineralnih elemenata, njihove pristupačnosti u medijumu, usvajanja od strane biljke, dejstva spoljnih faktora, odnosno faktora koji deluju u mikroklimatu posuda za odgajivanje (vlaga, aeracija...) (Kozai *et al.*, 1991, 1992, 1995; Williams, 1995).

Cilj ovoga rada je da se utvrdi odnos između medijuma sa različitim koncentracijama makroelemenata i biljaka/izdanaka u fazi multiplikacije u *in vitro* uslovima i posebno prikaže preko količine azota i formiranja bilansa, odnosno kretanja ovog esencijalnog elementa.

Materijal i metode

Biljni materijal. Perspektivna slabo bujna podloga za trešnju Camil GM 79, koja je selekcionisana kao klon *Prunus canescens*, korišćena je kao biljni materijal za ova istraživanja. Eksplantati ovog genotipova su pre postavljanja u ogled gajeni na Murashige i Skoog (1962) medijumu, sa variranjem koncentracija citokina 6-benzil-adenina (BA), giberelne kiseline (GA_3), auksina, α -naftil-sirćetne kiseline (NAA) i indol-3 buterne kiseline (IBA), dok nije dobijena optimalana multiplikacija sa dovoljnim brojem izdanaka za ova istraživanja.

U svakoj posudi za gajenje kultura (Erlenmeyer posude od 100 ml) postavljano je po 5 uniformnih izdanaka. Po svakom tretmanu postavljano je 25 posuda x 5 izdanaka x 2 ponavljanja za 20. i ista količina za 40. dan gajenja. Ovako veliki broj izdanaka (500 izdanaka po tretmanu x 5 medijuma = 2.500 izdanaka) je bio potreban zbog prikupljanja dovoljne količine biljnog materijala za hemijske analize.

Hranljive podloge – medijumi. Kulture su gajene na Murashige i Skoog (1962) medijumu (MS), na MS 2x uvećana količina makroelemenata, na MS medijumu sa smanjenim sadržajem makroelemenata na $\frac{1}{2}$ i $\frac{1}{4}$ (MS $\frac{1}{2}$ i MS $\frac{1}{4}$). Kontrolni medijum sadržavao je dejonizovanu vodu i agar. Provodljivost vode za pripremu medijuma je bila 0,8 S, a pH vrednost medijuma, 5,78. Medijumi su sterilisani u autoklavu 20 minuta, na 120°C.

Svi medijumi sadržavali su agar (Agar-agar; Gum agar, A-9915, SIGMA) u koncentraciji 7 g l⁻¹, i saharozu (N0-S-8501, SIGMA), 20 g l⁻¹. Od hormona u svim tretmanima, osim u kontroli, korišćeni su BA (1,0 mg l⁻¹), NAA (0,1 mg l⁻¹) i GA_3 (0,1 mg l⁻¹).

Parametri multiplikacije. Proučavani parametri su mereni nultog dana (kod medijuma – posle autoklaviranja, kod eksplantata – dan postavljanja u kulturu), 20. i 40. dana gajenja.

Parametri multiplikacije su određivani standardnom morfometrijom. Izdanci manji od 0,5 cm nisu uzimani u razmatranje.

Hemijske analize medijuma i biljnog materijala. Za utvrđivanje sadržaja azota (N) je uziman uzorak medijuma od 10 g, a za biljni materijal 0,2 g uzorka (u 3 ponavljanja) i dalje su sprovedene analize po standardnoj metodi Kjeldahl.

Uzorci su analizirani nultog, 20. i 40. dana gajenja, pa je ukupno usvajanje elemenata od strane biljaka kalkulirano iz te razlike.

Način na koji je pravljen bilans kretanja sadržaja N između medijuma i izdanaka/eksplantata.

Korekcija za medijume

C - koncentracija N u medijumu (%)

m - masa, količina medijuma (g)

Q_m - količina supstance u (g) u masi medijuma, pri datoj koncentraciji

$$C_0 \times m_0 = Q_{m0}$$

$$C_{20} \times m_{20} = Q_{m20}$$

$$C_{40} \times m_{40} = Q_{m40}$$

Korekcija za izdanke

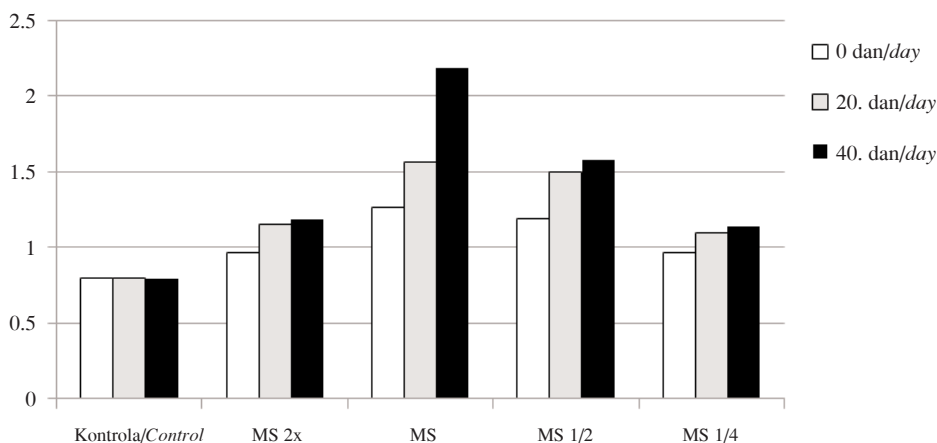
C_0	x	m_{0s}	=	x 5	
C_0	x	m_{0l}	=	x 5	ΣQ_{0iz}
C_{20}	x	m_{k20}	=	x 5	
C_{20}	x	m_{s20}	=	x 5	
C_{20}	x	m_{l20}	=	x 5	ΣQ_{20iz}
C_{40}	x	m_{k40}	=	x 5	
C_{40}	x	m_{s40}	=	x 5	
C_{40}	x	m_{l40}	=	x 5	ΣQ_{40iz}

*k - kalus; s - stablo; l - list; iz - izdanak; množi se sa 5, jer 5 izdanaka bilo zastupljeno po posudi za gajenje. Posle korekcija za medijume i eksplantate formiran je bilans:

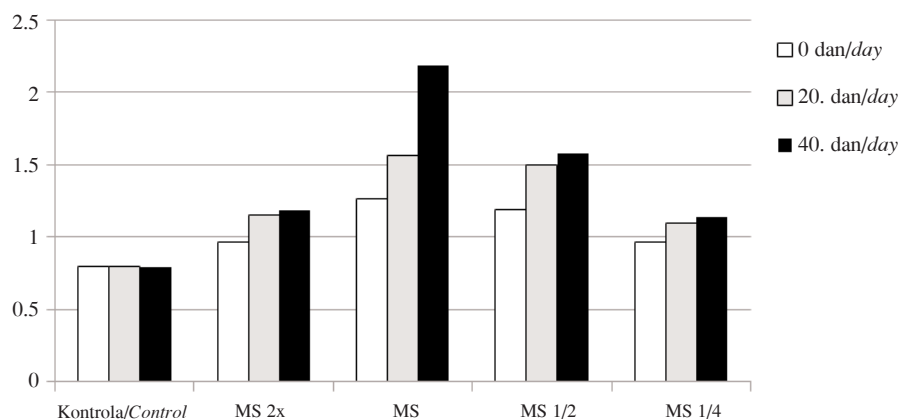
$$B I L A N S = Q_{m0} + Q_{0iz} = Q_{m20} + Q_{20iz} \\ = Q_{m40} + Q_{40iz}$$

Rezultati i diskusija

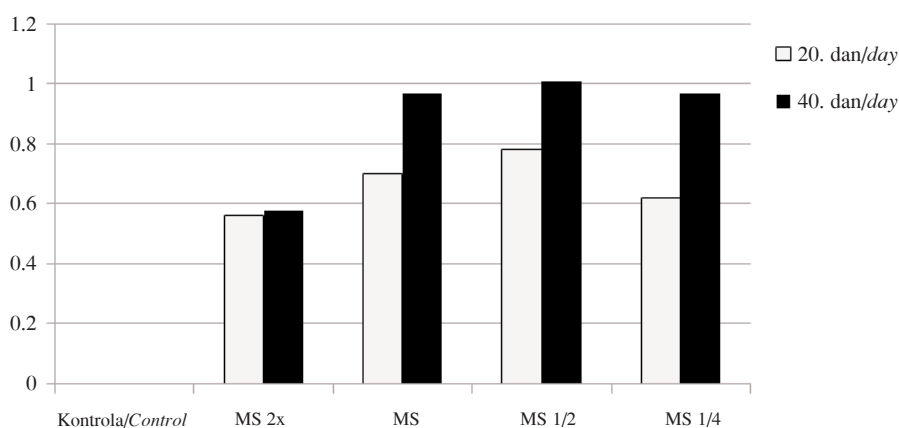
Determinisanjem osnovnih parametara multiplikacije, indeksa multiplikacije, dužine osovinskog i bočnih izdanaka uočava se da ovom genotipu više odgovaraju hranjive podloge sa manjim sadržajem istih (Graf. 1, 2 i 3). Iako je standardni MS medijum najpovoljniji za ovaj genotip, MS ½ je pokazao veoma dobar uticaj na dužinu bočnih izdanaka koja je važan parametar za dalje supkultivisanje, a MS ¼ na indeks multiplikacije, posebno 40. dana gajenja. Da je ovo genotipska specifičnost mineralne ishrane ukazuje i činjenica da su podloge Gisela 5 i Inmil u istim uslovima gajenja imale/dale bolji odgovor na MS i MS 2x medijumima za sve parametre multiplikacije (Ružić *et al.*, 2000; 2001; 2003/4).



Graf. 1. Indeks multiplikacije genotipa Camil
Multiplication index of Camil genotype



Graf. 2. Dužina osovinskog izdanka (cm)
Length of axial shoot (cm)



Graf. 3. Dužina bočnih izdanka (cm)
Length of lateral shoots (cm)

U mikroklimatu posuda za gajenje ispitivanih genotipova uspostavljeni su približno fotomiksotrofni uslovi. Tako se koncentracija N i ostalih makroelemenata u medijumima povećavala daljim gajenjem eksplantata, zbog isparavanja vode iz medijuma, transpiracije i drugih fizičkih i fizioloških procesa koji su vladali u mikroklimatu, odnosno količina medijuma se smanjila. Poznato je da se smanjenjem količine nekog rastvora, odnosno supstrata, koncentracija njegovih konstituenata povećava. Međutim, količina konstituenta ostaje ista u masi medijuma, pri datoj koncentraciji. Zbog toga je količina azota uzeta kao validnije

merilo za njegovo kvantitativno prikazivanje u medijumima i izdancima, u odnosu na koncentraciju.

Na osnovu sačinjenih bilansa ne samo što je prikazan sadržaj N u određenoj količini medijuma, pri datoj koncentraciji, već ovaj način predstavlja i proveru tačnosti hemijskih analiza medijuma i biljnog materijala.

Bilansi kretanja azota između medijuma i izdanaka genotipa Camil su dati u tabelama 1–4. Na osnovu ovako prikazanog sadržaja N vidi se da on linearno opada u medijumima, a raste u delovima izdanka. Najveća akumulacija je postignuta 40. dana u izdancima

Tab. 1. Bilans kretanja N između MS 2x medijuma i izdanaka
Balances of nitrogen movement between MS 2x medium and shoots

Uzorak Sample	Dani Days	Konc. N Concentr. of N (%)	Masa Weight (g)	Usvojeno Uptaken (%)	Bilans Balance
Medijum Medium	0	0,14	5,15	–	Početna koncentracija N u MS 2x Initial concentration of N in MS 2x (0,17%)
	20	0,14	4,10	20,39	
	40	0,13	3,28	36,31	
Izdanak Shoot	0	11,38	0,151		
		9,04	0,41Σ0,92		
Izdanak Shoot	20	8,50	0,13		5,15 + 0,92 = 4,10 + 2,08 =
		11,10	0,56		= 3,28 + 3,12
		9,25	1,39Σ2,08		6,07 = 6,18 = 6,40
Izdanak Shoot	40	8,00	0,20		
		10,68	1,07		
		9,24	1,85Σ3,12		

*K - kalus/callus; S - stablo/stem; L - list/leaf

Tab. 2. Bilans kretanja N između MS medijuma i izdanaka
Balances of nitrogen movement between MS medium and shoots

Uzorak Sample	Dani Days	Konc. N Concentr. of N (%)	Masa Weight (g)	Usvojeno Uptaken (%)	Bilans Balance
Medijum Medium	0	0,79	2,92	–	Početna koncentracija N u MS Initial concentration of N in MS (0,085%)
	20	0,057	1,56	46,58	
	40	0,034	0,59	79,79	
Izdanak Shoot	S	7,24	0,18		2,92 + 0,35 = 1,56 + 1,70 = = 0,59 + 2,76 3,27 = 3,26 = 3,35
	L	5,53	0,17Σ0,35		
Izdanak Shoot	K	6,93	0,17		
	S	7,31	0,73		
	L	5,34	0,80Σ1,70		
Izdanak Shoot	K	5,77	0,58		
	S	6,80	0,68		
	L	6,0	1,50Σ2,76		

Tab. 3. Bilans kretanja N između MS ½ medijuma i izdanaka
Balances of nitrogen movement between MS ½ medium and shoots

Uzorak Sample	Dani Days	Konc. N Concentr. of N (%)	Masa Weight (g)	Usvojeno Uptaken (%)	Bilans Balance
Medijum Medium	0	0,043	1,48	–	Početna koncentracija N u MS ½ Initial concentration of N in MS ½ (0,042%)
	20	0,011	0,28	81,08	
	40	0,007	0,14	90,54	
Izdanak Shoot	S	3,0	0,045		1,48 + 0,18 = 0,28 + 1,11 = = 0,14 + 1,40 1,66 = 1,39 = 1,54
	L	4,44	0,13Σ0,18		
Izdanak Shoot	K	3,62	0,05		
	S	4,69	0,23		
	L	4,17	0,83Σ1,11		
Izdanak Shoot	K	2,62	0,13		
	S	3,41	0,17		
	L	3,68	1,10Σ1,40		

Tab. 4. Bilans kretanja N između MS ¼ medijuma i izdanaka
Balances of nitrogen movement between MS ¼ medium and shoots

Uzorak Sample	Dani Days	Konc. N Concentr. of N (%)	Masa Weight (g)	Usvojeno Uptaken (%)	Bilans Balance
Medijum Medium	0	0,022	0,84	–	Početna koncentracija N u MS ¼ Initial concentration of N in MS ¼ (0,021%)
	20	0,012	0,34	59,52	
	40	0,009	0,17	79,76	
Izdanak Shoot	S	4,71	0,09		0,84 + 0,18 = 0,34 + 0,63 = = 0,17 + 0,93 1,02 = 0,97 = 1,10
	L	4,50	0,09Σ0,18		
Izdanak Shoot	K	3,36	0,08		
	S	4,00	0,20		
	L	3,53	0,35Σ0,63		
Izdanak Shoot	K	1,96	0,20		
	S	2,74	0,14		
	L	2,94	0,59Σ0,93		

gajenim na MS 2x (krupni izdanci sa velikim listovima). Do sličnih rezultata su došli i Abu-Qaoud *et al.* (1991) koji su utvrdili da u regenerisanim izdancima kruške (*Pyrus communis* L.) cvs Louise Panachee i Seckel, ukupna količina azota varira u zavisnosti od ukupne količine azota u medijumu.

Istraživanja Williams-a (1991) su pokazala da usvajanje mineralnih elemenata od strane biljke zavisi od nivoa snabdevenosti, ali usvajanje nije proporcionalno nivou snabdevenosti. Obično iskorišćenost mineralnih elemenata ima suprotan efekat na višem nivou snabdevenosti elementima, a može zavisiti od nivoa elemenata u biljnom tkivu. Najveće usvajanje N je bilo od strane izdanaka gajenih na MS ½ medijumu gde su dobijeni najkvalitetniji izdanci za dalje supkultivisanje (90,54% – 40. dana).

Tako je u funkciji vremena supkultivisanja determinisano, kako usvajanje, tako i smanjenje, odnosno potrošnja ukupnog N iz medijuma, kao i odnos između usvajanja i porasta biljaka, tj. uticaja na fazu multiplikacije. Ovakav način pristupa pokazao je da je i najveća akumulacija N bila upravo u listovima izdanaka. Mezzetti *et al.* (1991) su takođe proučavali rast kultura *Actinidia deliciosa* C.F. Liang, cv Hayward i promene mineralne kompozicije medijuma, u funkciji vremena supkultivisanja. Autori su konstatovali da velika količina N u MS medijumu garantuje dobru snabdevenost ovih kultura u prvom mesecu gajenja, odnosno u medijumu je ostalo 16,5% N. Na kraju 45. dana

supkultivisanja, ostalo je u medijumu 19,8% N, a na kraju perioda gajenja, 60. dana, svega 5% N u odnosu na početnu količinu, što ukazuje na esencijalnu važnost ovog elementa.

Na rast kultura na kontrolnom medijumu, odnosno održivost kultura verovatno su uticale unutrašnje rezerve mineralnih elemenata u biljkama u prvim danima gajenja, jer je kontrolni medijum sadržavao samo agar i vodu velike provodljivosti. Poznato je da gelirajući agensi, osim što služe za podržavanje biljaka *in vitro*, mogu uticati na dodavanje elemenata u medijume. Sadržaj mineralnih elemenata u gelirajućim agensima varira u zavisnosti od porekla proizvoda. Tako *Sigma* agar A 9915, koji je korišćen u našem radu, a koga su analizirali Seingre *et al.* (1991) sadrži (u $mg\ kg^{-1}$): K, 548; P, 590; Mg, 613; Ca, 188; ukupni N, 2.710. Prema istim autorima kada se ovaj agar ekstrahuje sa vodom, menja se jonska pristupačnost, tako da su samo pristupačne male količine elemenata, npr. $0,05\ mM\ l^{-1}$ Mg i $0,08\ mM\ l^{-1}$ Ca. Azot nije detektovan u kontrolnom medijumu u našem radu, ukazujući da su to nemerljive količine (Tab. 5).

Opšte je mišljenje da je uticaj elemenata koji su uglavnom najviše zastupljeni u agarima, važniji za osobine gela, usvajanje vode i drugih elemenata od strane eksplantata, nego za zadovoljavanje potreba biljaka za mineralnim elementima.

Bez obzira na brojna istraživanja u ovoj oblasti, još uvek nisu dobijeni kompletni odgovori na neka

Tab. 5. Bilans kretanja N između kontrolnog medijuma i izdanaka
Balances of nitrogen movement between control medium and shoots

Uzorak <i>Sample</i>	Dani <i>Days</i>	Konc. N <i>Concentr. of N</i> (%)	Masa <i>Weight</i> (g)	Usvojeno <i>Uptaken</i> (%)	Bilans <i>Balance</i>
Medijum <i>Medium</i>	0	0	0	–	Početna koncentracija N u kontrolnom medijumu <i>Initial concentration of N in control medium (0%)</i>
	20	0	0	–	
	40	0	0	–	
Izdanak <i>Shoot</i>	S	1,07	0,02		
	L	4,20	0,13±0,15		
Izdanak <i>Shoot</i>	K	0	0		$0 + 0,15 = 0 + 0,18 =$ $= 0 + 0,22$ 0,15 = 0,18 = 0,22
	S	0,92	0,024		
	L	3,38	0,15±0,18		
Izdanak <i>Shoot</i>	K	0	0		
	S	1,49	0,05		
	L	2,66	0,17±0,22		

ključna pitanja koje je još 1993. godine postavio Williams (1993): „Poznato je koje supstance medijumi sadrže, ali koliko je od toga pristupačno i iskorišćeno od biljaka? U kom opsegu usvajanje diktira asimilaciju i rast, i kako radi transportni sistem? Sistem je dinamičan: kako se menja pristupačnost elemenata za vreme perioda gajenja?”

Zaključak

Ovakav način proučavanja mineralne ishrane *in vitro* predstavlja novi pristup i daje doprinos rasvetljavanju kompleksnih problema u *in vitro* sistemu. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti:

- Sadržaj N tokom supkultivisanja linearno opada u medijumima, a raste u delovima izdanka;
- Najveća akumulacija N je postignuta 40. dana u izdancima gajenim na MS 2x medijumu, što ukazuje da je na njegov sadržaj najveći uticaj imala koncentracija u medijumu;
- Listovi su organi sa najvećom akumulacijom N;
- Usvajanje mineralnih elemenata iz medijuma *in vitro* od strane izdanka/biljke zavisi od nivoa snabdevenosti, ali usvajanje nije proporcionalno nivou snabdevenosti;
- Najveća iskorišćenost N praćena kvalitetnim izdancima za dalje supkultivisanje je dobijena na medijumu MS ½;
- Reakcija ovog genotipa na mineralni sastav medijuma ukazuju na postojanje dejstva genetičkog faktora na mineralnu ishranu *in vitro*.

Zahvalnica/Acknowledgements

Ova istraživanja su finansijski podržana od strane Ministarstva prosvete i nauke RS (projekti br. TR-6866 i TR-20013A). Posebno se zahvaljujemo Velimiru Mitroviću, dipl. tehn. na pomoći oko razvijanja i prilagođavanja metodologije za hemijske analize *in vitro* materijala, kao i kreiranje formule izračunavanja bilansa.

Literatura

- Abu-Qaoud H., Skirvin R.M., Below F.E. (1991): Influence of nitrogen form and $\text{NH}_4^+\text{-N}/\text{NO}_3^-\text{-N}$ ratios on adventitious shoot formation from pear (*Pyrus communis*) leaf explants *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 27: 315–319.
- Driver J.A., Kuniyuki A.H. (1984): *In vitro* propagation of paradox walnut rootstock. *HortScience*, 19: 507–509.
- Gomez M.P., Segura J. (1994): Factors controlling adventitious bud induction and plant regeneration in mature *Juniperus oxycedrus* leaves cultured *in vitro*. *In Vitro Cell Dev. Biol.*, 30: 210–218.
- Kozai T., Iwabuchi K., Watanabe K., Watanabe I. (1991): Photoautotrophic and photomixotrophic growth of strawberry plantlets *in vitro* and changes in nutrient composition of the medium. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 25: 107–115.
- Kozai T., Fujiwara K., Hayashi M., Aitken-Christie J. (1992): The *in vitro* environment and its control in micropropagation. In: 'Transplant Production Systems'. Kurata, K., Kozai, T. (eds.), Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp. 247–282.
- Kozai T., Jeong B., Kubota C., Murai Y. (1995): Effect of volume and initial strength of medium on the growth, photosynthesis and ion uptake of potato (*Solanum tuberosum* L.) plantlet *in vitro*. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, 64(1): 63–71.
- Leifert C., Murphy K.P., Lumsden P.J. (1995): Mineral and carbohydrate nutrition of plant cell and tissue cultures. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 14(2): 83–109.
- Lumsden P.J., Price S., Leifert C. (1990): Effect of mineral nutrition on the growth and multiplication of *in vitro* cultured plants. In: 'Progress in Plant Cellular and Molecular Biology'. Nijkamp H.J., Van Der Plas, Van Aartrijk J. (eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 108–113.
- McCown B.H., Sellmer J.C. (1987). General media and vessels suitable for woody plant culture. In: 'Cell and Tissue Culture in forestry. VI. General Principles and Biotechnology'. Bonga J.M., Durzan D.J. (eds.), Martinus Nijhoff, Dordrecht, pp. 4–16.
- Mezzetti B., Rosati P., Casalicchio G. (1991): *Actinidia deliciosa* C.F. Liang *in vitro*. 1. Growth and mineral uptake by explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 25: 91–98.
- Murashige T., Skoog F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473–497.
- Nedelcheva S. (1986): Effect of inorganic components of the nutrient medium on *in vitro* propagation of pears. *Gene. Sel.*, 19: 404–406. Citirano iz reference Leifert, C., Murphy, K.P., Lumsden, P.J. (1995): Mineral and carbohydrate nutrition of plant cell and tissue cultures. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 14(2): 83–109.
- Quoirin M., Lepoivre P., Boxus Ph. (1977): Un premier bilan de 10 ans de recherches sur les cultures de meristemes et la multiplication „*in vitro*“ de fruitiers ligneux. Extrait du Compte rendu des recherches 1976–1977 et rapports de synthse de la Station des C.F. et M. Gembloux, pp. 93–117.
- Ružić Đ., Sarić M., Čulafić Lj. (1997): Uticaj pojedinih elemenata mineralne ishrane na fazu multiplikacije podloga za trešnju *in vitro*. *Jugoslovensko voćarstvo*, 117/118: 3119–128.
- Ružić Đ., Sarić, M., Cerović, R., Čulafić, Lj. (2003/4): Contents of macroelements and growth of sweet cherry rootstock *in vitro*. *Biologia Plantarum*, 47(3): 463–465.
- Ružić Đ., Sarić M., Cerović R., Čulafić Lj. (2000): Relationship between the concentration of macroelements, their uptake and multiplication of cherry rootstock Gisela 5 *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 63: 9–14.

- Ružić Đ., Sarić M., Cerović R., Čulafić Lj. (2001): Changes in macroelement content of the media and in sweet cherry Inmil GM 9 shoots during *in vitro* culture. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 76(3): 295–299.
- Sarić M., Mezei S., Ružić Đ. (1995): Genetic aspects of mineral nutrition of plants grown *in vitro*. *Arch. Biol. Sci.*, 47(1–2): 1–12.
- Seingre D., O'Rourke J., Gavillet S., Moncousin Ch. (1991): Influence of gelling agent and carbon source on the *in vitro* proliferation rate of apple rootstock EM IX. *Acta Horticulturae*, 289: 151–155.
- Williams R.R. (1991): Factors determining mineral uptake *in vitro*. *Acta Horticulturae*, 289: 165–166.
- Williams R.R. (1993): Mineral nutrition *in vitro* – a mechanistic approach. *Aust. J. Bot.*, 41: 237–251.
- Williams R.R. (1995): The chemical microenvironment. In: 'Automation and Environment Control in Plant Tissue Culture'. Aitken-Christie J., Kozai T., Smith M.A.L. (eds), Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp. 405–439.

THE BALANCES OF NITROGEN MOVEMENT BETWEEN MEDIA AND SHOOTS OF CAMIL SWEET CHERRY ROOTSTOCK GROWN *IN VITRO*

Đurđina Ružić¹, Radosav Cerović^{1,2}, Tatjana Vujović¹

¹*Fruit Research Institute, Kralja Petra I 9, 32000 Čačak, Serbia*

E-mail: jugvocca@yu1.net

²*Ministry of Education and Science of RS, Njegoševa 12, 11000 Belgrade, Serbia*

Abstract

The paper presents the balances of nitrogen movement between media and shoots of Camil sweet cherry rootstock grown *in vitro*. The relation between shoots uptake and distribution of this element which is essential for growth and multiplication of *in vitro* grown cultures was identified. These studies represent a new

approach in interpretation of relations relative to the mineral nutrition *in vitro*.

Key words: Camil, sweet cherry rootstock, *in vitro* multiplication, nitrogen, balance