

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Hadi K. Waisi

**UTICAJ BRASINOSTEROIDA
24-EPIBRASINOLIDA NA KLIJANJE I
RANE FAZE RASTENJA I RAZVIĆA
RAZLIČITIH HIBRIDA KUKURUZA
(*Zea mays* L.)**

Doktorska Disertacija

BEOGRAD, 2016

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Hadi K. Waisi

**THE INFLUENCE OF
BRASSINOSTEROID 24-
EPIBRASSINOLIDE ON GERMINATION
AND EARLY STAGES OF GROWTH AND
DEVELOPMENT OF DIFFERENT MAIZE
HYBRIDS (*Zea mays* L.)**

Doctoral Dissertation

BELGRADE, 2016

MENTOR I ČLANOVI KOMISIJE

Mentori:

dr Bogdan Nikolić
naučni saradnik
Instituta za zaštitu bilja i životnu sredinu u Beogradu

dr Tijana Cvetić Antić
docent Biološkog fakulteta,
Univerziteta u Beogradu

Članovi komisije:

dr Zlatko Giba
vanredni profesor Biološkog fakulteta,
Univerziteta u Beogradu

dr Jelena Trifković
docent Hemijskog fakulteta,
Univerziteta u Beogradu

dr Bojan Janković
naučni saradnik Fakulteta za Fizičku hemiju
Univerziteta u Beogradu

Datum odbrane:

Zahvaljujem se mentorima, dr Nikolić Bogdanu, na uloženom trudu, prenešenom znanju, vremenu i poverenju tokom svih godina saradnje i prijateljstva, i dr Cvetić Antić Tijani na savetima i uloženom trudu tokom oblikovanja i pisanja disertacije.

Hvala članovima komisije, dr Giba Zlatku na savetima prilikom izrade disertacije i pisanja radova, dr Trifković Jeleni na poverenju, pomoći prilikom pisanja radova, tumačenju rezultata i oblikovanju disertacije. Veliko hvala dr Janković Bojanu na prijateljskoj podršci, danima provedenim u pisanju radova, savetima, tumačenju rezultata i uloženom ogromnom trudu i vremenu prilikom pisanja disertacije. Bojanova strast i ljubav prema nauci, kao i pozitivan stav su mi poslužili kao primer, kako u svakodnevnom životu, tako i na naučnom planu.

Eksperimentalni deo doktorske disertacije je urađen u Institutu za vodoprivredu „Jaroslav Černi“, Institutu za zaštitu bilja i životnu sredinu, katedri za dinamiku i strukturu materije Fakulteta za fizičku hemiju, laboratoriji za EPR spektroskopiju Fakulteta za fizičku hemiju u Beogradu, botaničkoj bašti „Jevremovac“ i laboratoriji za analizu hrane i hemometriju Hemijskog fakulteta u Beogradu.

Neizmernu zahvalnost dugujem prof. dr Slaviši Stanković na poverenju, podršci, korisnim savetima i stalnoj pomoći tokom studiranja i izrade doktorske disertacije. Šefe, hvala Vam puno, bez Vaše pomoći ne bih postigao ovaj uspeh. Zahvaljujem se svojim prijateljima: dr vet. med. Milojković Marku-Srbi na podršci i pomoći tokom osnovnih i doktorskih studija; dr Dimkić Ivici na pomoći u pisanju radova i tokom izrade doktorske disertacije; Panić Ivanu na korisnim savetima tokom studiranja, Vujičić Miloradu na pomoći tokom pisanja radova i savladavanja gradiva vezanog za ispite, tumačenju rezultata i savetima vezanim za eksperimentalni deo doktorske disertacije, dr Danijeli Pavlović i Vladanu Živkoviću prijateljskim savetima, kao i Milanović Milošu, Đorđević Anji, Kovačević Draginji, Marinković Milošu koji su me konstantno motivisali da pružim svoj maksimum u svakom segmentu života.

Veliku zahvalnost dugujem akademiku prof. dr Dimkić Milanu na bezuslovnoj podršci, razumevanju, uvek otvorenim vratima i poverenju prilikom izrade disertacije. Hvala i divnim kolegama, Popović Snežani i Petković Anđelki na prijatnom druženju, ohrabrenju i pomoći oko eksperimentalnog dela disertacije, mr. Đurić Dušanu na

podršci, kao i prof. dr Marijanović Prvoslavu za razumevanje prilikom pisanja disertacije. Zahvaljujem se prof. dr Raičević Veri i prof. dr Lalević Blaži na podršci i poverenju tokom saradnje. Hvala Koprivica Vesni za uloženi trud oko pregleda disertacije.

Zahvaljujem se prof. dr Opsenica Milojković Dušanki, dr Ristivojević Petru, Kosovac Aleksandri i Krstić Đurđi sa Hemijskog Fakulteta, kao i prof. dr Mojović Milošu sa Fakulteta za Fizičku hemiju, na pomoći prilikom izrade eksperimentalnog dela disertacije. Hvala i prof. dr Aneti Sabovljević na pomoći koju mi je ukazala tokom pohađanja doktorskih studija. Hvala mojoj porodici, Zori, Srđanu i Branku za sve savete i podršku tokom studiranja i izrade disertacije.

*Mom tati, za svu ljubav ovog sveta,
mojoj sestri, za sve što nije mogla,
mojoj mami, za sve što mi je poželela,
mojoj Martini, za ceo novi svet koji
mi je pokazala....*

*Hvala vam od srca,
bez vas ovo ne bi bilo ostvareno*

Uticaj brasinosteroida 24-epibrasinolida na klijanje i rane faze rastenja i razvića različitih hibrida kukuruza (*Zea mays* L.)

Rezime

Jedan od važnijih ciljeva moderne poljoprivrede je povećanje efikasnosti (umanjenje troškova proizvodnje, uz istovremeno uvećanje prinosa). Gotovo svi delovi biljke kukuruza se mogu iskoristiti, što je činjenica koja kukuruzu daje poseban ekonomski značaj. Regulatori rastenja i fitohormoni mogu imati povoljan uticaj utiču na povećanje prinosa, razviće i otpornost prema biotskom i abiotskom stresu. Kukuruz je posebno osetljiv na dejstvo nepovoljnih sredinskih faktora u ranim fazama rastenja i razvića, pa tretman regulatorima rastenja može izazvati niz promena u biohemijskim i fiziološkim procesima u klijancima kukuruza, koje bi mogle poboljšati rastenje i otpornost na stresne uslove životne sredine.

Brasinosteroidi su prirodni regulatori rastenja biljaka, prisutni u niskim koncentracijama u različitim organima (polen, seme, mlada vegetativna tkiva itd.) biljaka svih sistematskih grupa. Imaju značajnu ulogu u različitim razvojnim procesima kod biljaka kao što je izduživanje ćelija, vaskularna diferencijacija, etiolacija, reproduktivni razvoj itd. Mlada vegetativna tkiva su posebno osetljiva na egzogeno dodate BRs, i u tim tkivima dolazi do intenzivne ekspanzije ćelija. Takođe, BRs posreduju i u odgovoru biljaka na stresne faktore (abiotski, biotski i ksenobiotski).

U istraživanjima su korišćena semena hibrida kukuruza ZP 434 i ZP 704, koja su isključavana u rastvoru 24-EBL-a različitih koncentracija. Za analize su korišćeni klijanci starosti sedam dana. Ispitivan je uticaj egzogeno dodatog 24-EBL-a na rastenje plumule i radikule, kvantifikovan je sadržaj fotosintetičkih pigmenata, mineralnih elemenata i šećera, optimizovana je metoda za ekstrakciju polifenola, uz njihovu karakterizaciju u delovima klijanaca (plumula, radikula, ostatak semena). Detektovana je produkcija reaktivnih kiseoničnih i azotnih vrsta, kako bi se ispitaio njihov uticaj na rastenje klijanaca pomenutih hibrida kukuruza. Takođe, sprovedene su kinetičke i termodinamičke analize prilikom isušivanja klijanaca, kako bi se rasvetlili mehanizmi odlaska vode iz delova klijanaca i time analizirali mehanizmi otpornosti klijanaca kukuruza prema toj vrsti stresa.

Nađeno je da visoke i niske koncentracije egzogeno dodatog 24-EBL-a imaju različit uticaj na klijavost ispitivanih hibrida kukuruza, kao i da hibridi kukuruza različito reaguju na egzogeno dodati 24-EBL, naročito pri visokim koncentracijama ovog fitohormona. Utvrđeno je da niske koncentracije egzogeno dodatog 24-EBL-a povećavaju vrednosti SVI-II, i da imaju pozitivan efekat na izduživanje plumula klijanaca hibrida ZP 434. Nizak odnos hlorofil *a*/ hlorofil *b* u plumulama oba hibrida kukuruza, svedoči o slaboj aktivnosti fotosintetičkog aparata, što ukazuje i da većina asimilata neophodnih za rastenje klijanca dolazi iz semena. Analizom sadržaja mineralnih elemenata, može se zaključiti da klijanci kukuruza ispitivanih hibrida tretirani niskim koncentracijama 24-EBL-a, mogu preživeti u izvesnoj meri dejstvo teških metala zahvaljujući smanjenoj pokretljivosti toksičnih elemenata pre nego što se distribuiraju u plumulu i radikulu.

Nađeno je da hibrid ZP 434 sadrži više veoma polarnih fenolnih jedinjenja od hibrida ZP 704. Visoke koncentracije 24-EBL-a inhibitorno deluju na sadržaj polifenola u plumulama hibrida ZP434, a najniža ispitivana koncentracija 24-EBL-a ima inhibitorni efekat na sadržaj polifenola u plumulama hibrida ZP 704.

Kod radikule klijanaca ZP 434 hibrida nađeno je da je vrednost prividne energije aktivacije proporcionalna sadržaju trehaloze. Zaključeno je da niže koncentracije 24-EBL-a utiču na uvećavanje sadržaja trehaloze.

Ustanovljeno je da kod hibrida ZP 704 prisustvo 24-EBL-a najverovatnije utiče na dehidratacione procese preko visokog sadržaja fosfora u delovima klijanaca, dok je ovaj proces obrnut u organima klijanaca hibrida ZP 434, odnosno kontrolnih uzoraka. Nađeno je da svi organi klijanaca hibrida ZP 704, pokazuju veću energetska stabilnost u poređenju sa hibridom ZP 434, pri egzogeno dodatom 24-EBL-u tokom procesa dehidratacije.

Na osnovu enatalpijsko-entropijske kompezacione teorije, nađeno je da je mehanizam desorpcije vode u ispitivanim hibridima entropijski kontrolisan, pri čemu dobijeni rezultati ukazuju da mikrostruktura klijanaca nije stabilna i da trpi promene tokom dehidratacije. Takođe, na osnovu BET metode i modifikovane BET metode, nađeno je da klijanci hibrida ZP 704 u prisustvu 24-EBL-a lakše odaju vodu za razliku

od hibrida ZP 434, kod koga više koncentracije 24-EBL-a izazivaju otežano odavanje vode. Pronađeno je da 24-EBL ima blokirajući efekat na povećanje pritiska širenja.

Ključne reči: Kukuruz, 24-Epibrasinolid, Klijanje, Šećeri, Kinetički procesi dehidracije klijanaca, Termodinamiki procesi dehidracije klijanaca

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Fiziologija i molekularna biologija biljaka

UDK broj: 577.175.1:[581.142/.143+633.15] (0433)

The influence of brassinosteroid 24-epibrassinolide on germination and early stages of growth and development of different maize hybrids (*Zea mays* L.)

Abstract

One of the most important goals of modern agriculture is to increase efficiency (reduction of production costs, with a corresponding increase in yield). Almost all parts of the maize plant can be used, and that is the fact which gives maize a special economic significance. Growth regulators and phytohormones may have a favorable impact on yield improvement, development and resistance to biotic and abiotic stress. Maize is particularly vulnerable to the effects of adverse environmental factors in the early stages of growth and development, and treatment with growth regulators can cause a number of changes in biochemical and physiological processes of maize seedlings which could improve the growth and resistance to stressful environmental conditions.

Brassinosteroids are natural regulators of plant growth, and they are present in low concentrations in various organs (pollen, seeds, young vegetative tissue, etc.) at all systematic groups of plants. They have an important role in various developmental processes in plants, such as cell elongation, vascular tissue differentiation, etiolation, reproductive development, etc. Young vegetative tissues are especially sensitive to exogenously added BRs, and in these tissues BRs may induce intensive expansion of cells. Also, BRs can mediate plant responses to stress factors (abiotic, biotic and xenobiotic).

Seeds of maize hybrids ZP 434 and ZP 704 were germinated in a solution of different concentrations of 24-EBL. Seven days old seedlings were used for the analyses. The effect of exogenously added 24-EBL on plumule and radicle growth, content of photosynthetic pigments, mineral elements and sugars was analyzed. Also, method for extraction of polyphenols was optimized, along with their characterization in the parts of the seedlings (plumule, radicle, the rest of the seed). Production of reactive oxygen and nitrogen species was rated, in order to examine (with above mentioned methods) their impact on the growth of maize seedlings. Kinetic and thermodynamic analysis during drying of seedlings have been implemented, in order to elucidate the

mechanisms of dehydration of seedling parts and thus analyze the mechanisms of resistance of maize seedlings under drought stress.

It was found that both high and low concentrations of exogenously added 24-EBL have different effects on the germination of maize hybrids, and that hybrids respond differently to exogenously added 24-EBL, particularly at high concentrations of phytohormones. Low concentrations of exogenously added 24-EBL lead to increase in the value of SVI-II, and have a positive effect on plumule elongation within hybrid ZP 434. The low ratio of chlorophyll a / chlorophyll b, in plumule of two maize hybrids indicates low activity of the photosynthetic apparatus, which means that the most assimilates necessary for seedling growth are coming from the seeds. From the analysis of mineral elements, it can be concluded that the seedlings of maize hybrids treated with low concentrations of 24-EBL may survive areas polluted with heavy metals, due to the reduced mobility of toxic elements before they were distributed to plumule and radicle.

It was found that the hybrid ZP 434 contains more highly polar phenolic compounds than hybrid ZP 704. High concentrations of 24-EBL-a had an inhibitory effect on the content of polyphenols in plumule of hybrid ZP434 and the lowest tested concentration of 24 EBL had an inhibitory effect on the content of polyphenols in plumule of ZP 704.

Also, it was found for ZP434 hybrid radicle, that the E_a value is directly proportional to trehalose concentrations. It was concluded that lower concentrations of 24-EBL cause increased values of trehalose. In case of seedlings of ZP704 hybrid, 24-EBL is probably affecting water dehydration by significantly increasing values of phosphorus, comparing to control tests, while process is reverse in a case of ZP434 hybrid. It was found that all the organs of ZP 704 seedlings are having greater energy stability with exogenously added 24-EBL, comparing to the hybrid ZP 434 in the process of dehydration.

Based on enthalpy-entropy compensation theory, it has been found that water desorption mechanism in tested hybrids is controlled by entropy, where established results indicate that microstructure of seedlings is not stable and that it suffers from certain changes during dehydration. Also, based on BET and modified BET approaches,

it has been found that response of ZP 704 hybrid to 24-EBLs is probably more acceptable than in the case of ZP 434 hybrid. It was found that 24-epibrassinolide has a blocking effect on rapid increase in spreading pressure.

Keywords: Maize, 24-Epibrassinolide, Germination, Sugars, Kinetics of seedling dehydration, Thermodynamics of seedling dehydration

Research field: Biology

Specific research field: Plant Physiology and Molecular Biology

UDK No.: 577.175.1:[581.142/.143+633.15] (0433)

Lista skraćenica

SSR – Proste ponovljene sekvence

ZP434 – “Zemun Polje” hibrid broj 434

ZP704 – “Zemun Polje” hibrid broj 704

BRs – Brasinosteroidi

24-EBL–24-epibrasinolid

BL– Brasinolid

RoS – Ostatak semena, semenski ostatak (Rest of the seed)

BET – Brunauer–Emmett–Teller

PTFE – Politetrafluoroetilen

HPLC –Tečna hromatografija visokih performansi

HPTLC–Visoko-efikasna tankoslojna hromatografija

LOD – Detekcioni limit

LOQ – Kvantifikacioni limit

SD – Standardna devijacija

RH – Relativna vlažnost

EMC–Ravnotežni sadržaj vlažnosti

LEA –Proteini kasne embriogeneze

ATP – Adenozin triosfat

Cs –Katasteron

3CP–3-Karbamoil proksil

SADRŽAJ

1	UVOD.....	1
1.1	Sistematika vrste	1
1.2	Poreklo kukuruza	1
1.3	Značaj kukuruza	2
1.4	Fiziološke i morfološke osobine kukuruza.....	3
1.5	Fiziologija klijanja semena kukuruza.....	6
1.6	Brasinosteroidi	8
1.6.1	Istorija istraživanja brasinosteroida.....	8
1.6.2	Rasprostranjenost brasinosteroida u biljnom svetu	10
1.6.3	Biosinteza brasinosteroida.....	11
1.6.3.1.	Od kampestanola do BL preko 6-oksobrasinosteroida	13
1.6.3.2.	Od kampestanola do Cs preko 6-deoksobrasinosteroida	14
1.6.4	Metabolizam brasinosteroida	15
1.6.5	Mehanizam dejstva brasinosteroida	17
1.6.5.1.	Receptori za brasinosteroide i dalja signalna transdukcija	17
1.6.5.2.	Aktivacija brasinosteroidnog signalnog puta.....	19
1.7	Fiziološki efekti brasinosteroida.....	20
1.7.1	Uticaj BRs na rastenje i razviće biljaka.....	20
1.7.1.1.	Biotestovi za BRs, BRs mutanti i inhibitori BRs.....	20
1.7.1.2.	Uloga brasinosteroida u deobi i ekspanziji ćelija biljaka	22
1.7.1.3.	Uloga BRs u diferencijaciji kod vaskularnih biljaka	26
1.7.2	Uloga brasinosteroida u obrazovanju i klijanju semena.....	27
1.7.2.1.	Uticaj brasinosteroida na vigor klijanaca	28
1.7.3	Metabolizam biljaka i BRs	28
1.7.3.1.	Uloga brasinosteroida u procesu fotosinteze	28
1.7.3.2.	Uloga brasinosteroida na metabolizam šećera	29
1.7.3.3.	Mineralna ishrana i mineralna toksičnost kod biljaka i BRs	33
1.7.3.4.	Uloga brasinosteroida u sekundarnom metabolizmu kod biljaka	34
1.8	Uloga brasinosteroida u odgovoru biljaka na stres	35

1.8.1	Uticaj brasinosteroida na reaktivne kiseonične i reaktivne azotne vrste	36
1.9	Primena kinetičkih i termodinamičkih merenja dehidracije u biljnom sistemu.....	37
2	CILJEVI	43
3	MATERIJAL I METODE	44
3.1	Hemikalije.....	44
3.2	Biljni materijal	44
3.3	Uslovi gajenja biljaka	44
3.4	Fiziološka istraživanja	45
3.4.1	Ispitivanje klijavosti semena	45
3.4.2	Određivanje morfometrijskih parametara klijanaca	45
3.4.3	Ispitivanje vigora klijanaca	45
3.4.4	Spektrofotometrijska analiza fotosintetičkih pigmenata	46
3.5	Analiza šećera jonskom hromatografijom.....	46
3.5.1	Hemikalije i rastvarači	46
3.5.2	Ekstrakcija šećera	46
3.5.3	Određivanje profila šećera jonskom hromatografijom.....	47
3.6	Određivanje hemijskih elemenata u uzorcima.....	48
3.6.1	Postupak ekstrakcije mikrotalasnom digestijom	48
3.6.2	Određivanje koncentracija elemenata ICP-OES metodom	48
3.7	Određivanje polifenolnog profila ekstrakata klijanaca kukuruza.....	49
3.7.1	Hemikalije i rastvarači	49
3.7.2	Optimizacija metode za ekstrakciju polifenola	49
3.7.3	Polifenolni profili ekstrakata kukuruza dobijeni primenom tankoslojne hromatografije	51
3.8	Identifikacija fenolnih jedinjenja primenom masene spektrometrije visoke rezolucije (UHPLC-LTQ Orbitrap MS/MS).....	52
3.8.1	Hemikalije i rastvarači	52
3.8.2	Kvalitativna identifikacija fenolnih jedinjenja	52
3.9	Određivanje ukupne antioksidativne aktivnosti EPR metodom	53

3.10 Kinetički pristup ispitivanju mehanizma dehidracije i određivanje kinetičkih parametara	54
3.10.1 Izotermalna (statička) merenja	54
3.10.2 Metode za određivanje zavisnosti prividne (efektivne) energije aktivacije od stepena konverzije	55
3.10.3 Metode za određivanje reakcionog mehanizma procesa dehidracije	56
3.10.3.1. <i>Metoda redukovanog vremena</i>	56
3.10.3.2. <i>Ozawa-ina metoda</i>	58
3.10.4 Određivanje vremena života biljnog sistema nakon gubitka vode	59
3.11 Termodinamička analiza procesa dehidracije klijanaca	59
3.11.1 Entalpijsko-entropijski kompenzacioni efekat	60
3.11.2 Jednoslojni sadržaj vlažnosti	61
3.11.3 Pritisak širenja	62
3.11.4 Toplota isparavanja	63
3.11.5 Analiza temperatura staklastog prelaza (Tg).....	64
3.11.6 Statistička merenja	65
4 REZULTATI I DISKUSIJA.....	66
4.1 Uticaj 24-EBL-a na klijanje	66
4.2 Uticaj 24-EBL-a na rastenje i akumulaciju biomase.....	67
4.3 Uticaj 24-EBL-a na Vigor indeks II klijanaca kukuruza.....	70
4.4 Uticaj 24-EBL-a na fotosintetičke pigmente	72
4.5 Uticaj 24-EBL-a na sadržaj šećera u delovima klijanca	73
4.6 Uticaj 24-EBL-a na sadržaj hemijskih elementa u delovima klijanaca....	86
4.7 Određivanje polifenolnog profila ekstrakata klijanaca kukuruza.....	92
4.7.1 Optimizacija metode za ekstrakciju polifenola	92
4.7.2 HPTLC polifenolni profili ekstrakata kukuruza.....	95
4.8 Određivanje fenolnog profila kukuruza primenom masene spektrometrije visoke rezolucije	103
4.8.1 Identifikacija fenolnih jedinjenja.....	103
4.9 Uticaj brasinosteroida na sadržaj reaktivnih kiseoničnih vrsta i reaktivnih azotnih vrsta	108

4.10	Uticaj 24-EBL na procese dehidracije u zavisnosti od sadržaja šećera i minerala u klijancima.....	110
4.11	Analiza dehidracionih krivi dobijenih iz izotermnih merenja	112
4.12	Analiza dehidracionih reakcionih profila koji oslikavaju zavisnosti prividne energije aktivacije (E_a) od stepena dehidracije (α)	118
4.13	Analiza krivih dobijenih metodom <i>redukovano</i> g vremena.....	128
4.14	Analiza rezultata dobijenih <i>Ozawa</i> -inom metodom (metoda „master“ krivih).....	135
4.15	Analiza vremena života klijanaca	142
4.16	Analiza promena termodinamičkih parametara tokom procesa dehidracije klijanaca	144
5	ZAKLJUČCI.....	167
6	LITERATURA.....	170

1. UVOD

1 UVOD

1.1 Sistematika vrste

Dominantni privredni značaj kukuruza uslovljen je prevashodno izuzetno širokim mogućnostima njegove upotrebe (Kravić, 2013). Kukuruz pripada C4 biljkama (Hirell *et al.*, 2005), koje u poređenju sa većinom C3 biljaka ima veću sposobnost apsorpcije, metaboličke transformacije i remobilizacije neorganskih i organskih formi ugljenika (Walker and Edwards, 1983) i azota (Oaks, 1994). Kukuruz je jednogodišnja biljka koja se ubraja u porodicu trava a specifičnost mu je čvrsta stabljika ispunjena parenhimom.

Sistematski položaj kukuruza (Knežević, 2006):

(Regnum): Plantae

(Subregnum): Viridiplantae

(Phylum): Magnoliophyta (Spermatophyta)

(Subphylum): Magnoliophytina (Angiospermae)

(Classis): Liliopsida (Liliatae, Monocotyledoneae)

(Subclassis): Commelinidae

(Ordo): Cyperales

(Familia): Poaceae (Gramineae)

(Subfamilia) Panicoideae

(Tribus) Maydeae

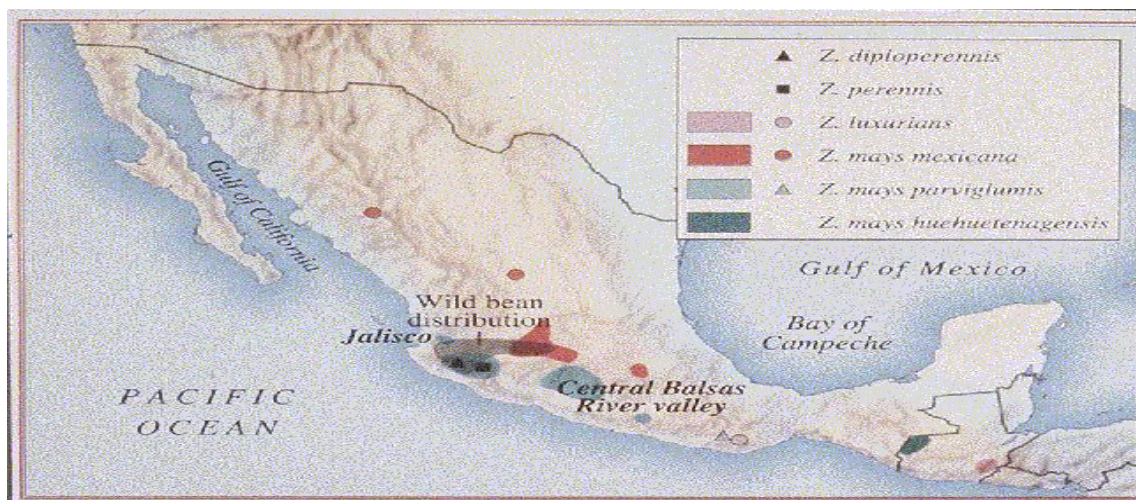
(Genus): *Zea*

(Species): *Zea mays*

1.2 Poreklo kukuruza

Kukuruz je poreklom iz Centralne Amerike, a nakon otkrića američkog kontinenta prenešen je i proširen u Europu i druge kontinente. Na osnovu istraživanja iz oblasti botanike, ekologije i arheologije, smatralo se da je kukuruz nastao domestikacijom svog divljeg srodnika, jednogodišnje teozinte (*Zea mays* spp. *parviglumis*), endemita nizijskih predela jugozapadnog dela Meksika (Mangelsdorf, 1986), što je i potvrđeno filogenetskom analizom 264 pojedinačne biljke primenom

SSR markera, (Matsuoka *et al.*, 2002). Središtem domestikacije se smatra centralni deo doline reke Balzas, gde *Z. mays* spp. *parviglumis* raste endemski (Slika 1). Rezultati arheoloških iskopavanja otkrili su prisustvo tragova kukuruza u nizijskim predelima Srednje Amerike koji datiraju od pre 8700-7300 godina (Hastorf, 2009; Piperno *et al.*, 2009).



Slika1. Poreklo kukuruza. Preuzeto sa: (Anonymus a., 2016)

Kolumbo je 1492. doneo kukuruz u Španiju, a na Balkan je ta kultura stigla u drugoj polovini 16-tog veka, dok je u naše krajeve prenet već 1572. godine. U prvim pisanim dokumentima nazivan je urmentin (Anonymus b., 2016).

1.3 Značaj kukuruza

Iako postoji samo jedna vrsta u rodu “*Zea*”, ona je toliko promenljiva po svojim morfološkim, fiziološkim i drugim svojstvima da predstavlja najvarijabilniju kulturu među žitima, pa i svim drugim kulturama (Tabaković, 2012).

U radu Radosavljevic and Milasinovic (2008) je predloženo da se na osnovu strukture zrna i sastava endosperma svi komercijalno gajeni hibridi kukuruza mogu svrstati u jedan od pet osnovnih tipova čija morfološka podela prati i fiziološke razlike. Na osnovu spomenutih razlika u sastavu i funkciji kukuruza možemo ga svrstati u tipove:

1. Zuban (*Zea mays indentata* Sturt.)
2. Tvrdunac (*Zea mays* L. *indurata* Sturt.)
3. Šećerac (*Zea mays* L. *saccharata* Sturt.)
4. Kokičar (*Zea mays* L. *evarta* Sturt.)
5. Brašnasti (*Zea mays* L. *amylacea* Sturt.)

Primarni cilj proizvodnje kukuruza je dobijanje visokih i stabilnih prinosa, kako kvantitativno tako i kvalitativno (Tabaković, 2012). Gotovo svi delovi biljke kukuruza mogu poslužiti za preradu, što je činjenica koja kukuruzu daje poseban ekonomski značaj. Danas se proizvodi više od 500 različitih industrijskih prerađevina od kukuruza. Kukuruz može dati izuzetno visoke prinose po jedinici površine, pa je postignut maksimalni prosečni prinos od oko 25.000 kg/ha (Anonymus b., 2016). Kukuruz se trenutno proizvodi na skoro 100 miliona hektara u 125 zemalja, od kojih je u 75 najzastupljenija gajena biljna vrsta (FAOSTAT, 2010). Najveći proizvođači kukuruza su SAD (sa preko 330 miliona tona - 37% globalne proizvodnje), Kina (20%), Brazil (7%), Meksiko i Argentina (po 3%). Veliki evropski proizvođači su: Francuska, Rumunija, Mađarska i Srbija. Kukuruz je usev koji zauzima najveće površine u Srbiji, a sa prosečnim prinosom od 3.25 t/ha, Srbija zaostaje za onim u svetu.

1.4 Fiziološke i morfološke osobine kukuruza

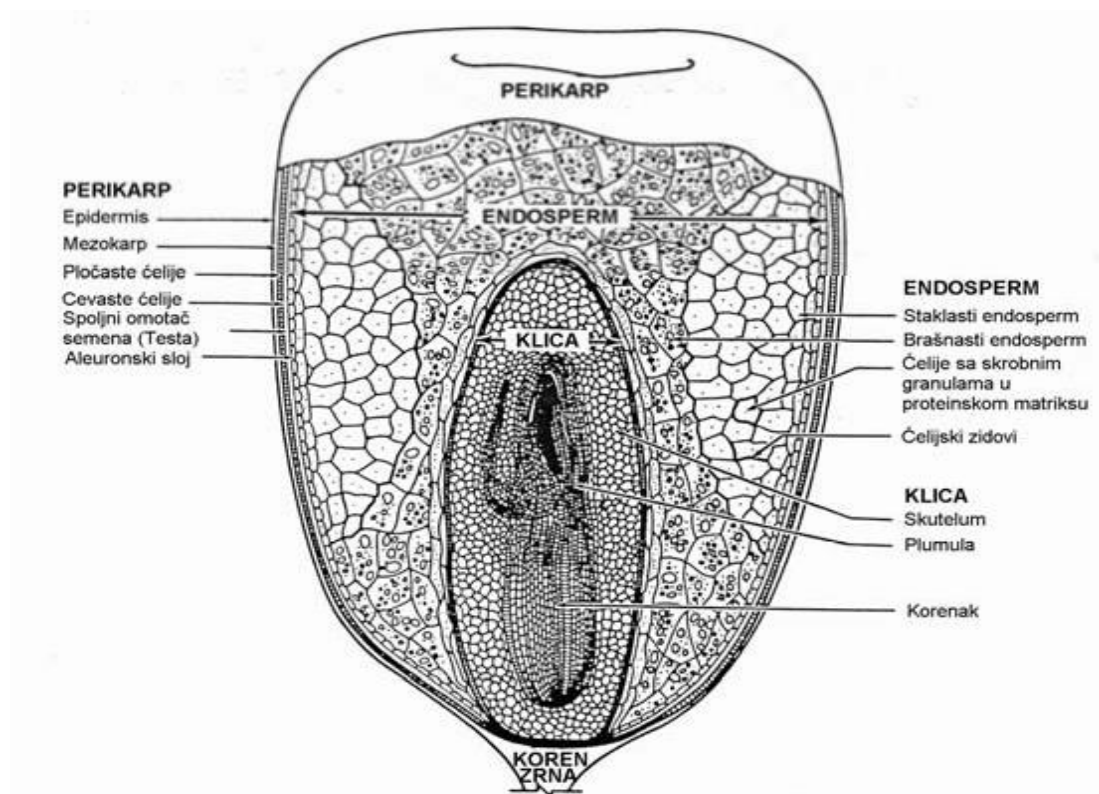
Kukuruz ima specifičnu morfološku građu i od svih žitarica je najkrupnija biljka. Delovi biljke kukuruza su koren, stabljika, list, cvet (cvast) i plod (zrno), koji su šematski prikazani na Slici 2.

Koren kukuruza je žiličast i možemo razlikovati pet tipova korena: primarni, bočni i mezokotilni klicin koren, te podzemni i nadzemni nodalni koren. Stabljika kukuruza je uspravna, cilindričnog oblika, sastavljena od nodija i internodija. U pazuhu lista na stabljici nalaze se pupoljci iz kojih se u središnjem i vršnom delu biljke obrazuju klipovi (Amić, 2012).



Slika 2. Preuzeto sa: (Anonymus c., 2016).

Listovi kukuruza se dele na klicine listove, listove stabljike i listove omotača klipa. Kukuruz ima veliku lisnu površinu (veća od 1 m² po biljci), tako da može proizvesti relativno veliku količinu organske materije (Gagro, 1997), što omogućava brzo rastenje ove kulture. Kukuruz je jednodoma biljka i ima jednopolne muške i ženske cvetove koji su razdvojeni u posebne cvasti (Slika 2). Metlica je muški cvast i nalazi se na vrhu biljke, dok je klip ženska cvast a nalazi se u pazuhu listova. Plod kukuruza je zrno. Zrelo zrno kukuruza (koje predstavlja najznačajniju sirovinu za proizvodnju komercijalnog skroba) sastavljeno je iz tri osnovna dela: perikarpa (omotač), endosperma i klice (Radosavljevic, and Milasinovic, 2008). Morfološka građa i struktura zrna kukuruza date su na Slici 3.



Slika 3. Preuzeto sa: Radosavljevic and Milasinovic, 2008.

Posmatrano sa aspekta primene i korišćenja kukuruza hemijski sastav zrna je njegovo najbitnije svojstvo. Skrob je glavni ugljeno hidratni i istovremeno glavni hemijski konstituent zrna kukuruza. U proseku njegov sadržaj se kreće oko 70% (Tabela 1).

Tabela1. Hemijski sastav zrna kukuruza

Hibrid	Skrob (%)	Proteini (%)	Ulje (%)	Celuloza (%)	Pepeo (%)
ZP 434	69.0	9.4	5.9	2.0	1.4
ZP 704	70.6	9.6	5.0	2.1	1.4

Endosperm zrna kukuruza je kod svih tipova zrna zastupljen u najvećem procentu, 70-85% ukupne težine zrna. Ćelije endosperma su bogate skrobom, a imaju

umeren sadržaj proteina i imaju ulogu da obezbede dovoljnu količinu energije i hranljivih materija za klijanje embriona. Granule skroba su “zarobljene” u proteinskom matriksu. Endosperm je sastavljen iz više strukturnih delova od kojih su staklasti i brašnasti deo najvažniji za mnoga svojstva endosperma.

Omotač ili perikarp morfološki pripada endospermu i ima zaštitnu ulogu zrna. Udeo perikarpa u celom zrnu varira zavisno od tipa hibrida. Njega čini više slojeva različitih vrsta ćelija, a debljina i propustljivost perikarpa utiču na brzinu sušenja i bubrenja zrna (Radosavljevic and Milasinovic, 2008).

1.5 Fiziologija klijanja semena kukuruza

Seme je organ od vitalnog značaja za više biljke. Uspešnost preživljavanja biljke u velikoj meri zavisi od fizioloških i biohemijskih osobina semena, njegove sposobnosti da reaguje na uticaje spoljašnje sredine, kao i od rezervnih materija akumuliranih u njemu. Za aktiviranje složenih biohemijskih i fizioloških procesa klijanja potrebno je obezbediti odgovarajuće uslove temperature, vode i prisustvo kiseonika. Kada su ovi uslovi povoljni, seme počinje da usvaja vodu iz spoljne sredine, počinje fizički proces bubrenja, koji zavisi od njegove koloidne strukture, uslovljene različitim rasporedom pektina, celuloze, hemiceluloze i proteina u različitim delovima semena. Rezerve koje seme sadrži su esencijalne za prve, heterotrofne stadijume razvića biljaka, pre nego što steknu sposobnost autotrofije, tj. korišćenja sunčeve energije za sintetske procese stvaranja struktura nove biljke. Kao poseban organ za razmnožavanje i rasejavanje i kao evolutivna inovacija, seme je doprinelo uvećanju adaptivnosti biljaka u vrlo promenljivim uslovima kopnene sredine, obezbeđujući kontinuitet i širenje biljaka-semenica u prostoru i vremenu. Seme je specifičan organ koji nastaje iz oplodnog semenog zametka, a tkiva koja okružuju embrion mogu da predstavljaju mehaničku ili hemijsku barijeru klijanju, koja biva prevladana tek pri nastupanju povoljnih sredinskih uslova za razvoj nove biljke, kada započinje klijanje. U semenu su sve metaboličke aktivnosti svedene na minimum, a sadržaj vode je nizak. Time se biljka ne utiče samo da sopstveno umnožavanje i rasejavanje, već i omogućava preživljavanje pri nepovoljnim sredinskim uslovima. To je omogućeno procesima sazrevanja semena, kada se smanjuje sadržaj vode u njemu, a rezervne supstance (proteini i polisaharidi,

skrob) zadobijaju staklastu strukturu (vitifikacija). Tim procesima se omogućuje visoka viskoznost matriksa semena, bez većih molekularnih reorganizacija, što omogućava da seme preživi nepovoljne sredinske uslove (Bian *et al.*, 2002) Klijanjem semena nastaju obrnuti procesi sinteze novih struktura, čime se omogućava razviće novog organizma. Samo klijanje je dosta složen proces koji se može podeliti na četiri faze: 1) imbibicija – usvajanje vode 2) faza aktivacije – početak metaboličkih procesa 3) faza mitotičkih deoba i 4) izrastanje radikule (korenka). Jasno je da je klijanje zrna u negativnoj korelaciji sa stepenom dormancije (Nešković *et al.*, 2010). Prekid dormancije ne zavisi samo od genetičkih i fizioloških procesa u okviru semena, već i od različitih spoljašnjih faktora, od kojih su najznačajniji svetlost i temperatura. Bubrenje je fizički proces u kome voda prodire kroz perikarp, a brzina usvajanja vode koja je kod kukuruza najintenzivnija u prvih šest sati, zavisi od hemijskog sastava semena, tako da seme kukuruza sa brašnjavim endospermom brže usvaja vodu (Mayer and Poljakoff-Mayber, 1982).

Heterotrofni način ishrane je karakterističan za proces klijanja. U toj fazi se za razviće klice (tj. nove, mlade biljke) koriste rezervne materije nakupljene u semenu. Naročito značajno u periodu od prvih deset dana u klijanju semena je količina endosperma, jer ukoliko seme ima više rezervnih hranljivih materija, razviće se snažniji klijanac. Fazu aktivacije biohemijskih tj. fizioloških procesa odlikuje hidrolitička transformacija rezervnog skroba, proteina i ulja u oligomerna i monomerna jedinjenja, aktivan transport tako produkovanih jednostavnijih šećera, slobodnih aminokiselina i organskih kiselina iz endosperma u klicu (Tabaković, 2012).

Iz literature je poznato da ABA i GA imaju antagonističku ulogu u regulisanju dormancije i klijanja semena. ABA je odgovorna za dormanciju tokom sazrevanja embriona dok su GA neophodni u prevazilaženju dormancije izazvane efektom ABA (Koornneef and Karssen, 1994). Stimulacija izduživanja ćelija klijanaca može da bude dovedena u vezu sa aktivacijom specifičnih gena indukovanih brasinosteroidima koji su uključeni u izduživanje ćelija (Li, and Chory, 1999; Darley *et al.*, 2001). Egzogeno dodati brasinosteroidi u većim koncentracijama inhibiraju izduživanje korena i formiranje lateralnih korenova dok u nižim koncentracijama stimulišu izduživanje celokupnog korenskog sistema (Clouse and Sasse 1998). S obzirom da je

brasinosteroidni signal neophodan da bi se stimulisalo klijanje i prekinula dormancija izazvana abscisinskom kiselinom (Steber and McCourt, 2001), moguće je da 24-epibrasinolid (24-EBL) također deluje na dormanciju semena kod kukuruza menjajući količine kako abscisinske tako i giberelinske kiseline.

1.6 Brasinosteroidi

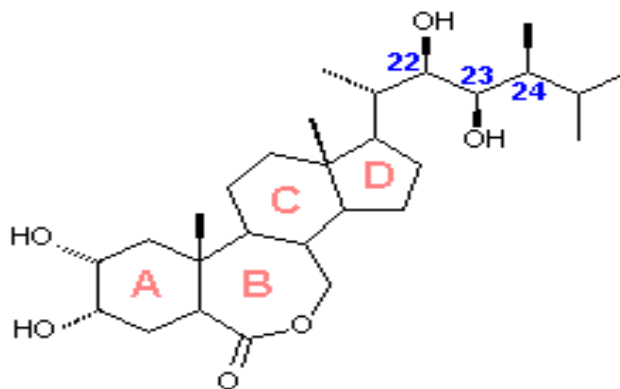
1.6.1 Istorija istraživanja brasinosteroida

Marko Zulo (Zullo and Adam, 2002), navodi da su 1930. godine, istraživači United States Department of Agriculture (USDA) otkrili da ekstrakti polena promovišu rastenje biljaka, a prvi rad objavljen 1941. godine izveštava da ekstrakti polena kukuruza (*Zea mays* L.) utiču na značajno izduživanje tretiranih internodija mladih sadnica pasulja (Mitchell and Whitehead, 1941). Tokom 1960-ih godina USDA je započeo istraživački program koji je imao za cilj da pronađe nove biljne hormone. Hipoteza koja se tada testirala jeste da polen ima povišenu koncentraciju biljnih hormona i s tim u vezi je postojala velika verovatnoća pronalaženja nove fiziološki aktivne supstance u njima.

Ekstrakti polena od oko 60 različitih biljnih vrsta su testirani i neki od njih su, između ostalog i polen od uljane repice (*Brassica napus* L.) dali neočekivane rezultate koji nisu bili karakteristični za dejstvo nijednog do tada poznatog hormona. Ovi istraživači su pretpostavili da polen sadrži novu grupu hormona koju su nazvali brasini (brassins) (Mitchell *et al.*, 1970). U isto vreme japanski istraživači (Marumo *et al.*, 1968) našli su da ekstrakti japanske biljke isonuki (*Distylium rasemosun* Sieb et Zucc.) promovišu rastenje ovsa (*Avena sativa* L.).

Mandavin tim (Mandava *et al.*, 1978) je za izolovanje brasinosteroidnih aktivnih jedinjenja koristio oko 250 kg polena uljane repice (*Brassica napus* L.), koji je ekstrahovan izopropanolom u frakcijama od po 25 kg. Frakcije su podvrgnute hromatografskom razdvajanju, da bi se na kraju dobilo 100 g biološki aktivnog materijala. Finalno prečišćavanje je izvedeno hromatografijom na koloni i tečnom hromatografijom, da bi se dobilo 10 mg kristalne supstance koja je podvrgnuta

kristalografskoj analizi radi određivanja strukture ispitivane supstancije, za koju je pronađeno da je stereoidni lakton, empirijske formule $C_{28}H_{48}O_6$ koja je nazvana brasinolid (BL) (Mandava *et al.*, 1978).



Brassinolide

Slika 4. Brasinolid (Anonymus d., 2016).

BL dobija svoje ime kombinacijom naziva biljke *Brassica*, iz koje je prvi put zvanično izolovan i sufiksa “olide”, karakterističnog za laktone. BL je takođe ekstrahovan od strane drugih istraživača iz polena uljane repice (*Brassica napus* L.) (Grove *et al.*, 1979 (Slika 4), dok je par godina kasnije izolovan katasteron, biosintetski prekusor BL iz gala japanskog kestena (*Castanea crenata*) (Yokota *et al.*, 1982). Od tada je izolovano preko 70 steroida biljnog porekla (Fujikioka and Yokota, 2003). Primenom modernih metoda molekularne genetike potvrđeni su nalazi biohemičara i fiziologa (dobijeni pri analizi biosintetskih puteva BRs) o neophodnosti ove klase jedinjenja za normalno rastenje biljaka, tako da se moraju svrstati u fitohormone zajedno sa auksinima, citokininima, giberelinima, abscisinskom kiselinom i etilenom (Hayat and Ahmad, 2010). Istraživanja BRs odvijaju se u tri pravca: a) biohemijska istraživanja; b) analize BRs mutanata (mutanti za sintezu BRs, uglavnom vezani za mutaciju gena za Cyt-P450 mešane oksidaze; mutanti za receptore za BRs tj. BRI mutant; mutanti iz daljeg BRs signalizacionog puta), uz korišćenje BRs inhibitora (pre svega inhibitora BRs sinteze, poput BZR); c) genetička transformacija model biljaka genima za sintezu ili receptore brasinosteroida ili za signalne puteve brasinosteroida (Hayat and Fariduddin, 2003).

1.6.2 Rasprostranjenost brasinosteroida u biljnom svetu

BRs su karakteristični steroidi biljaka, široko rasprostranjeni kako kod viših, tako i kod nižih biljaka. Oni igraju ključnu ulogu u modulaciji rastenja delujući u nanomolarnim i mikromolarnim koncentracijama (Clouse and Sasse, 1998; Ankudo, 2004).

Tabela 2. Prisustvo endogenih brasinosteroida i njihov sadržaj u određenim vrstama (ng g⁻¹) (Tabela je preuzeta iz Clouse, 2011).

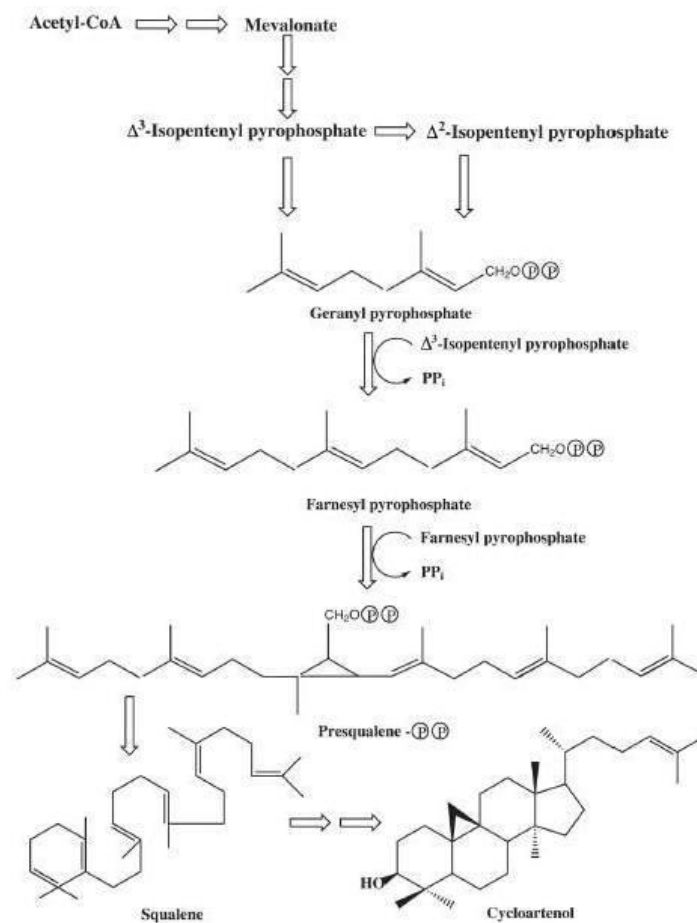
<i>Zea mays</i>	Polen, stablo, koren	2.0-120
<i>Brassica napus</i>	Polen	>100
<i>Brassica campestris</i>	Seme, kora	0.00013-0.094
<i>Raphanus sativus</i>	Seme	0.3-0.8
<i>Helianthus annuus</i>	Polen	21-106
<i>Vicia faba</i>	Polen, seme	5-628
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Stablo, seme, silika	0.11-5.4
<i>Solanum lycopersicum</i>	Stablo	0.029-1.69
<i>Pinus thunbergii</i>	Polen	89
<i>Cupressus arizonica</i>	Polen	1.0-6,400
<i>Catharanthus roseus</i>	Ćelijska kultura	0.047-4.5
<i>Equisetum arvense</i>	Strobilus	0.152-0.349
<i>Hydrodictyon reticulatum</i>	Zelena alga	0.3-0.4
<i>Oryza sativa</i>	Stablo	0.0084-0.0136
<i>Lilium elegans</i>	Polen	1.0-50
<i>Typha latifolia</i>	Polen	68
<i>Citrus sinensis</i>	Polen	36.2
<i>Pisum sativum</i>	Seme, stablo	0.164-3.13
<i>Thea sinensis</i>	Listovi	0.001-0.02

Najviša koncentracija BRs-a je pronađena kod arizonskog čempresa (*Cupressus arizonica*). Od otkrića brasinolida, 69 različitih brasinosteroida je izolovano iz 64

biljnih vrsta, uključujući 53 angiosperme (12 monokotiledonih i 41 dikotiledona), 6 gimnospermi, 1 pteridofite (*Equisetum arvense*), 1 briofite (*Marchantia polymorpha*) i 3 alge (*Chlorella vulgaris*, *Cystoseira myrica* i *Hydrodictyon reticulatum*) (Bajguz, 2011). Mlada tkiva sadrže viši nivo brassinosteroida nego zrelija tkiva (Yokota, 1986). Polen i semena su najbogatiji izvori brasinosteroida, dok izdanci i listovi imaju manje količine ovog fitohormona (Takatsuto, 1994).

1.6.3 Biosinteza brasinosteroida

Prirodni brasinosteroidi (BRs) koji su do sada identifikovani imaju zajednički 5α -holestanski skelet, a njihove strukturne varijacije proizilaze iz tipa i orijentacije funkcionalnih grupa na A i B prstenu. Ove modifikacije nastaju usled reakcija oksidacije i redukcije tokom biosinteze (Fujioka and Sakurai, (a) 1997). BR su C27, C28 i C29 steroidi, zavisno od alkil grupe na C24 atomu (Fujioka and Yokota, 2003). U odnosu na A prsten, BRs koji imaju vicinalnu hidroksilnu grupu (na C-2 α i C-3 α atomu) generalno poseduju visoku biološku aktivnost (Fujioka and Sakurai, (b) 1997). BRs koji imaju α -hidroksilnu, β -hidroksilnu ili ketogrupu na C3 atomu A prstena su prekursori BRs koji nose 2 α ,3 α -vicinalnu hidroksilnu grupu. Izolovane su sve kombinacije hidroksilnih grupa na C-2 i C-3 atomu (2 α i 3 α ; 2 α i 3 β ; 2 β i 3 α ; 2 β i 3 β) (Nes, 1977). Kako biološka aktivnost opada u smeru 2 α ,3 α > 2 α ,3 β > 2 β ,3 α > 2 β ,3 β , pokazalo se da je α -orijentacija hidroksilne grupe od presudnog značaja za visoku biološku aktivnost BRs (Hayat and Ahmad, 2010). U odnosu na supstituent na B prstenu, poznate su 6-deokso, 6-okso (keton) i 7-oksolakton forme. Generalno, 7-oksolakton strukture poseduju mnogo veću biološku aktivnost u odnosu na 6-okso forme (kao kastasteron (CS)), dok 6-deokso forme imaju najmanju aktivnost. Na bočnom lancu, BRs imaju α -orijentisane vicinalne hidroksilne grupe na poziciji C22 i C23, koje su se pokazale esencijalnim za visoku biološku aktivnost (Hayat and Ahmad, 2010; Fujioka and Sakurai (a) 1997). BL ((22R,23R,24S)-2 α ,3 α ,22,23-tetrahidroksi-24-metil-homo-7-oksa-5 α -holestan-6-one) je biološki najaktivniji C28 BRs i, zajedno je sa ostalim C28 srodnim BRs, široko rasprostranjen u biljnom carstvu. Njihova biosinteza je prvenstveno razjašnjena korišćenjem kulture ćelija vinke (*Catharanthus roseus*), a kasnije je detaljno ispitivana i na *Arabidopsis thaliana* (Fujioka and Yokota, 2003; Bajguz, 2007).



Slika 5. Mevalonatni (izoprenoidni) put sinteze cikloartenola
Preuzeto iz: Yokota, 1997.

Biljni steroli se sintetišu iz cikloartenola, kroz niz reakcija koje uključuju pojedinačne ili duple metilacije (Yokota, 1997). Put biosinteze BL se može podeliti na generalnu sintezu sterola (formiranje skeleta, modifikacije od cikloartenola do kampesterola) i na sintezu od kampesterola do BL, put specifičan za BRs. Kako se kampesterol pokazao kao prekursor BL, drugi BRs se verovatno sintetišu iz sličnih biljnih sterola, sa odgovarajućim strukturama bočnog lanca kao što su sitosterol, izofukosterol, 24-metilenholesterol i 24-epikampesterol (Clouse, 2011). Biljni steroli se sintetišu i izoprenoidnim (mevalonatnim) putem preko acetil-CoA, mevalonata, izopentenil pirofosfata, geranil pirofosfata i farnezil pirofosfata (Slika 5). Skvalen se produkuje kondenzacijom dva molekula farnezil pirofosfata, koji se zatim konvertuju preko skvalen-2,3-epoksida u cikloartenol, gradivnu komponentu većine biljnih sterola. Konverzija skvalen 2,3-epoksida u cikloartenol je specifična za biljke. Kod životinja i

gljiva skvalen-2,3-epoksid se konvertuje u lanosterol, prekursor holesterola i životinjskih steroidnih hormona (Clouse, 2011). Kako je cikloartenol primarni prekursor biljnih sterola, nedavna istraživanja su pokazala da *A. thaliana* ima funkcionalnu lanosterol sintazu, tako da je verovatan i alternativni put sinteze biljnih sterola preko lanosterola (Suzuki *et al.*, 2006). Na osnovu strukture i stereochemije bočnog lanca, široke rasprostranjenosti u biljnom carstvu i srodne biološke aktivnosti u biotestovima, pretpostavilo se da se kampesterol konvertuje u BL preko teasterona, tifasterola i Cs (Clouse, 2011). Detaljna ispitivanja biosinteze BL u *C. roseus* i *A. thaliana* otkrila su dva paralelna puta (Slika 6), rani i kasni put oksidacije C-6 atoma (A prsten), koji su povezani na različitim koracima, a vezani su za puteve rane i kasne oksidacije C-22. Dalje, postoji iznenađujuća sličnost između puteva biosinteze BRs i životinjskih steroidnih hormona (Bajguz, 2007). Prva reakcija u putu biosinteze BRs od kampesterola je redukcija $\Delta 5,6$ veze i formiranje 5α -kampestanola. Konverzija kampestanola u BL se dalje nastavlja preko dva puta, ranom C6 oksidacijom ili kasnom C6 oksidacijom (Yokota, 1997).

1.6.3.1. Od kampestanola do BL preko 6-oksobrasinosteroida

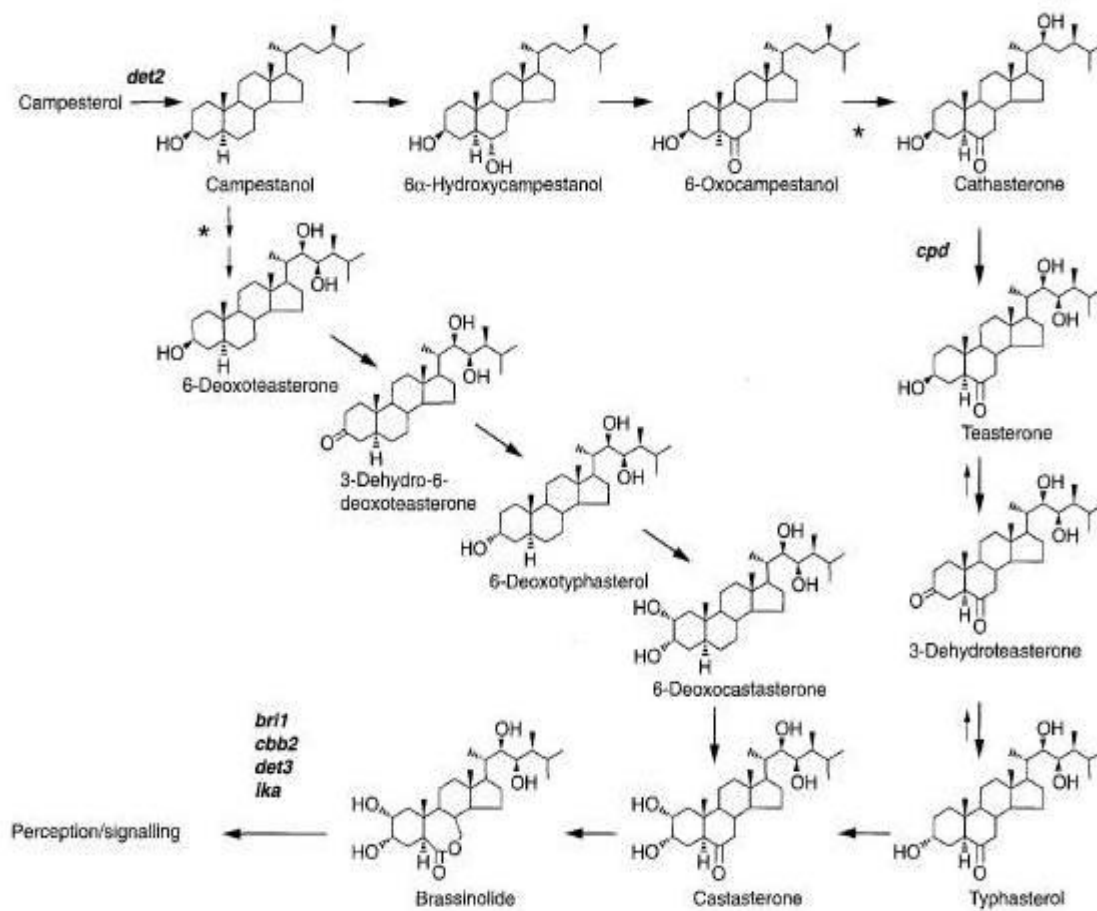
U sledećem koraku biosinteze se C6 oksidacija odvija pre oksidacije bočnog lanca A prstena. Ovaj korak se naziva rani put C6 oksidacije. Kampestanol se prvo prevodi u 6α -hidroksikampestanol, koji se zatim prevodi u 6-oksokampestanol (Yokota, 1997). Najverovatnije dolazi do hidroksilacije 6-oksokampestanola na C22 atomu i dobija se 22 α -hidroksil-6-oksokampestanol (katasteron). Iako je pronađen endogeni katasteron, još uvek nije pokazana ova konverzija molekula. Mogući razlog je taj što je endogeni pul katasterona 500 puta niži od 6-oksokampestanola (Fujioka *et al.*, 1995). Katasteron je hidroksilovan na poziciji C23 i prevodi se u teasteron, BRs koji se često nalazi kod biljaka. Teasteron se prevodi u tifasterol, a ovaj put uključuje inverziju 3β -hidroksil u 3 α -hidroksil, pretpostavljajući da je došlo do redoks tipa reakcije preko 3-dehidroteasterona. Slična reakcija je pokazana u biosintezi žučnih kiselina, ekdisteroidea i kardenolida. Iako 3-dehidroteasteron nije nađen kao metabolit teasterona, on se prevodi u tifasterol (Fujioka *et al.*, 1995). Ova konverzija je takođe pokazana u ćelijskoj kulturi ljiljana (*Lilium longiflorum*). Stoga se smatra da je 3-dehidroteasteron intermedijer kratkog života. Treba pomenuti da se tifasterol delimično prevodi nazad u

teasteron preko 3-dehidroteasterona (Suzuki *et al.*, 1994). Dalje dolazi do hidroksilacije C α atoma tifasterola i nastaje BRs sa dva seta vinil hidroksilnih grupa. 6-okso grupa se zatim oksiduje u laktonsku (6-okso-7oksa) grupu, dajući BL, najjači prirodni brasinosteroid (Yokota, 1997). Konverzija teasterona u Cs je prisutna u intaktnim biljkama *C. roseus*, duvana i pirinča. Konverzija Cs u BL je takođe posmatrana u sadnicama *C. roseus*. Čini se da se put rane C6 oksidacije odvija u intaktnim tkivima (Suzuki *et al.*, 1995).

1.6.3.2. Od kampestanola do Cs preko 6-deoksobrasinosteroida

U različitim biljkama su obilato prisutni BRs koji nemaju 6-okso grupu. Na primer, 6-deoksokastasteron i srodni BRs se u velikoj količini akumuliraju u polenu *Cupressus arizonica*. Zbog veoma niske biološke aktivnosti 6-deoksobrasinosteroida u poređenju sa 6-oksobrasinosteroidima, oni se smatraju slepim putem u biosintezi BRs. Ipak, pronađeno je da se 6-deoksokastasteron sintetiše iz 6-deoksoteasterona preko 3-dehidro-6-deoksoteasterona i 6-deoksotifasterola, a dalje se prevodi u BL preko Cs kod *C. roseus* (Yokota, 1997) (Slika 6). Konverzija 6-deoksokastasterona u Cs je takođe posmatrana u sadnicama *C. roseus*, duvana i pirinča. Ovaj put biosinteze se naziva put kasne C6 oksidacije. Značaj ovog puta za biosintezu BL u biljnim tkivima zahteva dalja istraživanja. Postoji mogućnost da je kampestanol prekursor 6-deoksobrasinosteroida, iako nema eksperimenata koji to i potvrđuju (Griffiths *et al.*, 1995). Putevi oksidacije brasinosteroida se odvijaju pomoću enzima citohrom P-450 tipa monooksigenaza koje pripadaju blisko srodnim familijama CYP 85 i CYP 90. Iako je većina ovih enzima pronađena kod *A. thaliana*, nekoliko ortologa je ubzo pronađeno i kod drugih vrsta. Sličnost metaboličkog profila i enzima biosinteze BR kod različitih vrsta viših biljaka služi kao jasna indikacija evolutivne konzervisanosti njihove sinteze (Fujioka and Sakurai, 1997). Analize sadržaja endogenih BRs i biohemijski testovi BRs-biosintetskih Cyt-P450 enzima su pokazali da oni imaju široku specifičnost za supstrat, dozvoljavajući konverziju više strukturno različitih intermedijera. Kao rezultat, biosinteza BRs se može odvijati u dva paralelna puta koji formiraju kompleksnu metaboličku mrežu (Hayat and Ahmad, 2010). Dalja, detaljna ispitivanja enzima pokazuju da, uprkos širokoj specifičnosti za supstrat, aktivnost Cyt-P450 enzima

biosinteze BRs može bitno da se razlikuje u zavisnosti od trenutnog supstrata (Fujita *et al.*, 2006; Ohnishi *et al.*, 2006; Hayat and Ahmad, 2010).



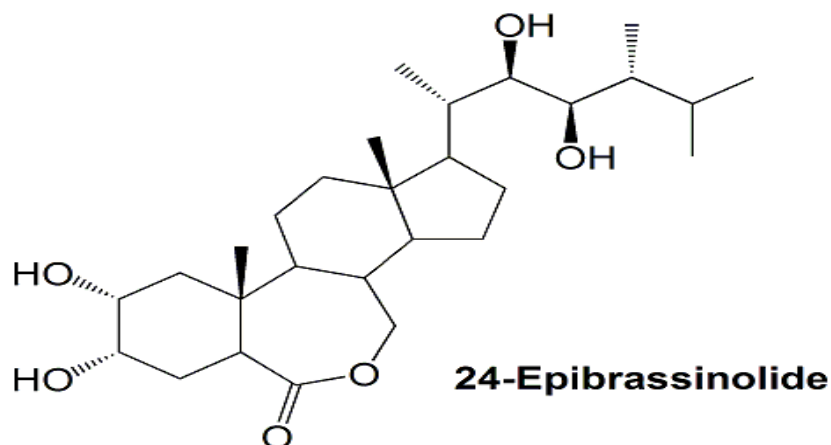
Slika 6. Biosinteza brasinolida od kampesterola (putevi rane i kasne oksidacije)
(Preuzeto iz: Yokota, 1997).

1.6.4 Metabolizam brasinosteroida

Metabolizam BR može da dovede do gubitka aktivnosti i smanjenja uloge aktivnih BRs. Stoga su detaljne analize metabolizma BRs na molekularnom i biohemijskom nivou neophodne za razumevanje regulatornih mehanizama bioaktivnih BRs. Različiti eksperimenti su pokazali da se BRs dodati biljkama brzo metabolišu (Fujioka and Yokota, 2003). Metabolizam BL i Cs je ispitan na biljkama pasulja

(*Phaseolus vulgaris*). Cs se ne konvertuje u BL, već u nepoznate metabolite rastvorljive u vodi čija se osnovna komponenta čini neglikozidnom. Za razliku od njega, osnovni metabolit BL je 23-O- β -D-glukopiranozilbrasinolid. Kako su prirodni glukozidi, 23-O- β -D-glukopiranozil-25-metil-dolihosteron i njegov 2-epimer, izolovani iz nezrelog semena *Phaseolus vulgaris*, izgleda da je 23-O-glukozilacija važan proces inaktivacije BL, barem u biljkama *P. vulgaris*. Ipak, glukozilacija BL nije posmatrana u sadnicama ili etioliranim listovima (rasli u mraku) pirinča gde su dobijeni isključivo metaboliti rastvorljivi u vodi koji se ponašaju kao neglikozidna jedinjenja (Fujioka and Sakurai, 1997).

Metabolizam 24-EBL-a (Slika 7), je ispitan na ćelijskim kulturama paradajza (*Solanum esculentum*). Pronađena su dva metabolita, 25- β -D-glukopiranoziloksi-24-EBL i 26- β -D-glukopiranoziloksi-24-EBL. Metabolički proces u dva koraka uključuje hidroksilaciju bočnog lanca na C-25 i C-26 atomu, praćenu glukozidacijom novoformiranih hidroksilnih grupa. Upotrebom specifičnih inhibitora se pokazalo da su jedan citohrom P-450 oksidaza i još jedna hidroksilaza uključeni u C25 i C26 hidroksilaciju (Clouse, 2011).



Slika 7. Preuzeto sa: (Anonymus e., 2016).

Biosintetski pripremljen 25-hidroksi-24-EBL, ponovo dodat u ćelijsku kulturu, isključivo je glukozilovan na 25-hidroksilnoj grupi, pokazujući da je odgovor glukoziltransferaze regiospecifičan. Ove studije su prvi put obezbedile informacije o

enzimima metabolizma BRs (Fujioka and Sakurai, 1997). Kod *A. thaliana* je pronađena glukoziltransferaza koja katalizuje 23-O-glukozilaciju BL i Cs, a prekomerna ekspresija ovog enzima je prisutna kod fenotipova sa nedostatkom BRs, što ukazuje da glukozilacija takođe reguliše aktivnost BRs kod *A. thaliana* (Poppenberger *et al.*, 2005). 24-epikastasteron (24-Cs) i 24-EBL (Slika 8) se metaboliše u suspenziji ćelijske kulture *Ornithopus sativus* u 2 α ,3 β ,6 β -trihidroksi-5 α -pregnan-20-on i 2 α ,3 β -dihidroksi-B-homo-7-oksa-5 α -pregnan-6,20-dion, kao glavni metaboliti. Ovo je metabolički proces u više koraka, uključujući epimerizaciju na C-3 i raskidanje bočnog lanca što dovodi do stvaranja pregnanskog metabolita (Fujioka and Sakurai, 1997). Pored glukozilovanih formi, zabeleženi su i konjugati BL sa različitim estrima masnih kiselina. Teasteron 3-laurat i teasteron 3-miristat su izolovani iz prašnika dugocvetnog ljiljana (*Lillium longiflorum*) i ispitivanja nivoa endogenih BRs tokom razvića polena su dovela do pretpostavke da se teasteron skladišti u konjugovanom obliku i da se oslobađa tokom sazrevanja polena kako bi obezbedio biosintezu BL (Asakawa *et al.*, 1996).

Unos i transport 24-EBL-a su ispitani na intaktnim sadnicama krastavca i raznim travama, koristeći 14C-obeleženi supstrat. Kada se 24-EBL doda korenu, on odmah biva preuzet i transportovan u obe vrste. Međutim, kada se 24-EBL doda listovima, usvajanje se znatno razlikuje od usvajanja korenom, a transport BRs iz listova je generalno spor. Metabolizam 24-EBL je takođe ispitan korišćenjem istih biljnih sistema. Kod krastavca se 24-EBL metaboliše u sekundarnim listovima i peteljkama, ali ne u hipokotilima i korenima. Kod raznih trava 24-EBL se potpuno metaboliše u listovima nakon dva dana. Ovi rezultati ukazuju na to da se 24-EBL metaboliše u listovima i peteljci opisanih vrsta (Nishikawa *et al.*, 1995; Fujioka and Sakurai, 1997).

1.6.5 Mehanizam dejstva brasinosteroida

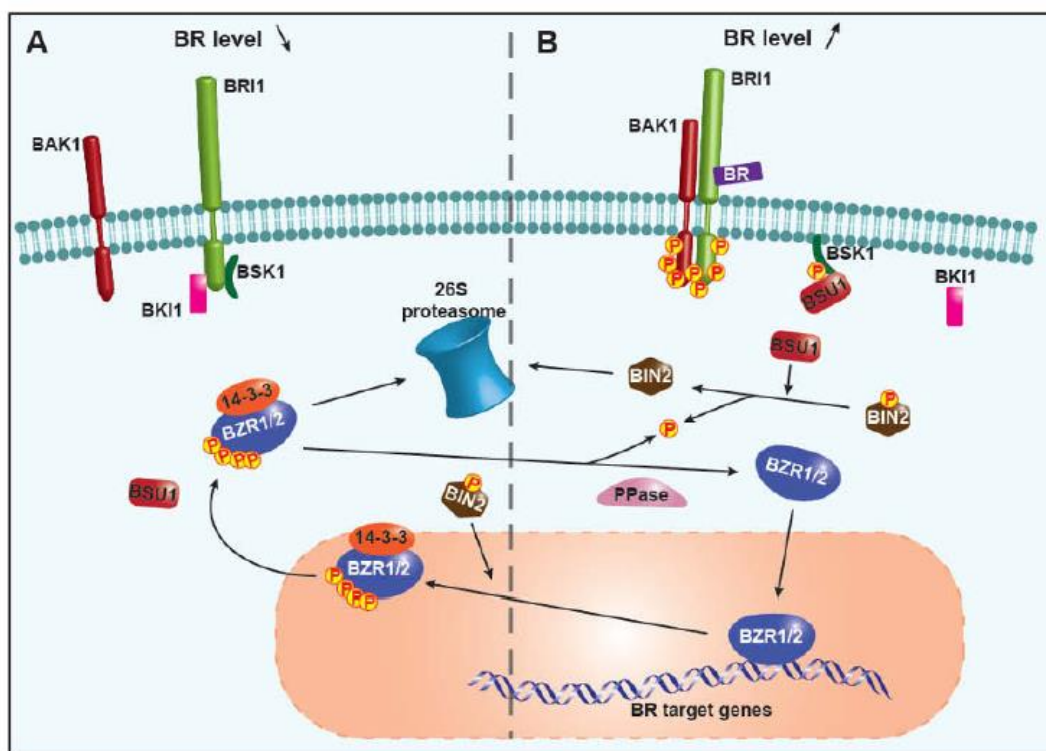
1.6.5.1. Receptori za brasinosteroide i dalja signalna transdukcija

Rasvetljavanjem strukture BR (Grove *et al.* 1979), postalo je očigledno da su oni jedinstveni među regulatorima rastenja i razvića biljaka zbog velike strukturne sličnosti sa steroidnim hormonima biljaka i insekata. Životinjski steroidni hormoni igraju ključnu ulogu kao signali uključeni u rastenje i razviće tih organizama, što je dalje potvrđivano

obimnim ispitivanjem receptora za animalne steroide. Sve to je dalo precizan opis dejstva animalnih steroidnih hormona na molekularnom nivou (Mangelsdorf *et al.* 1995).

Na sličan način započeto je ispitivanje mehanizma dejstva brasinosteroidnih fitohormona. Obimne genetičke analize mutanata sa izgubljenom signalnom funkcijom BRs kod *Arabidopsis*, identifikovale su još jedan lokus, BRI1, koji kodira LRR RLK protein (Kauschmann *et al.*, 1996). Fenotip *bri1* mutanata identičan je onom kod BR-deficitarnih mutanata, ali se ove mutacije ne mogu prevladati dodavanjem egzogenih BRs. U dodatnim testovima gašenja i aktivacije funkcije BRs, okarakterisano je i nekoliko drugih komponenti puta signalne transdukcije BRs. Ovi putevi uključuju i druge LRR RLK proteine, poput, BRI1 proteinom povezanu receptor kinazu-1 (BRI1-associated receptor kinase-1, BAK1); serin/-kaboksipeptidazni BRI1 supresor-1 (BRS1); kinazu sličnu glikogen sintaza kinazi 3 (glycogen synthase kinase 3-like kinase, GSK3-like kinase), BIN2 (BRs insenzitive-2), fosfatazni BRI1 supresor-1 (BSU1) (Hayat and Ahmad, 2010) i dva transkripciona faktora, BZR1 (brassinazol-resistant 1) i BZR2/BRI1-EMS supresor (BES1) (Hayat and Ahmad, 2010; Yin *et al.*, 2002). U daljim istraživanjima, pri ispitivanju dva hibrida kvasca, kao deo signalne kaskade BR, izolovani su i transtiretinu-sličan protein (TTL), inhibitor BRI1 kinaze (BKI1) i 14-3-3 proteini. Zahvaljujući molekularnim i biohemijskim ispitivanjima ovih komponenti, ustanovljen je signalni put biljnih BRs, različit od signalnog puta sisarskih steroida. Dok animalni steroidi bivaju prepoznati od strane nuklearnih receptora, utičući direktno na aktivnost transkripcije gena (Thummel and Chory, 2002), kod biljaka se BRs vezuju za receptore na plazma membrani i pokreću signalnu kaskadu posredovanu fosforilacijama, koje utiču na nove transkripcione faktore (Hong *et al.*, 2004; Clouse, 2011).

Novije studije proteoma dovele su do revizije dosadašnjeg modela transdukcije signala BRs, identifikujući komponente koje nisu pronađene u ranijim istraživanjima, kao što su BRs signalne kinaze (BSK) koje povezuju poslednje korake genetski definisane transdukcije čime je upotpunjen ceo put od RLK do transkripcionih faktora (Hayat and Ahmad, 2010) (Slika 8).



Slika 8. Signalna transdukcija brasinosteroida (Preuzeto iz: Hayat and Ahmad, 2010).

BRI1 protein (plazmalemski receptor za BRs) sadrži ekstracelularni LRR domen za vezivanje liganda, transmembranski i intracelularni domen sastavljen od serin/treonin kinaznog domena i regulatornih sekvenci. Ova činjenica sugerira da je ovaj protein verovatni receptor BRs i da BRs hormoni aktiviraju signalni put sličan klasičnim signalnim putevima posredovanim receptorskim tirozin kinazama (RTKaze) i transformišućim faktorom rasta- β (TGF- β kod životinja) (Feng and Derynck, 1997; Hayat and Ahmad, 2010).

1.6.5.2. Aktivacija brasinosteroidnog signalnog puta

BRs se vezuje za ekstracelularni domen BRI1 receptor kinaze i aktivira je. BRI1 zatim fosforiliše negativni regulator BKI1, otpuštajući ga sa membrane, što omogućava da se BRI1 veže za BAK1 i aktivira je transfosforilacijom. Tako aktivirani BAK1 dalje transfosforiliše specifično mesto na BRI1 i tako povećava njen signalni kapacitet, što dovodi do fosforilacije BSK1 i njenog otpuštanja iz receptorskog kompleksa. Aktivirani BSK1 se vezuje za BSU 1 protein i aktivira ga (Clouse, 2011). Dalje, BSU1 fosforiliše

BIN2 kinazu i inaktivira je, što dovodi do defosforilacije BZR1 i BZR2/BES1 proteina uz pomoć citoplazmatske fosfataze 2A (PP2Aaze). Nefosforilisani BZR1 i BZR 2 se akumuliraju u nukleusu i vezuju za promotore odgovarajućih gena, izazivajući tako specifičan fiziološki odgovor na BRs (Hayat and Ahmad, 2010). Uprkos velikoj sličnosti sekvence i funkcije, BZR1 i BZR2/BES1 imaju različit način regulacije ekspresije gena. BZR1 vezuje za CGTG (T+C)G motiv (poznat i kao BR-response element, BRRE) i suprimira ekspresiju gena za biosintezu BRs, kao što su CPD i DWARF4 geni koji kodiraju citohrom P450, dok se BZR2/BES1 vezuju za CANNTG sekvencu (poznatu kao E box) promotora SAUR-AC1 gena čiju ekspresiju aktivira (Clouse, 2011).

1.7 Fiziološki efekti brasinosteroida

Rani radovi sa ispitivanjem efekta BRs u različitim biotestovima i njihova interakcija sa raznim inhibitorima i mutantima ukazali su prevashodni uticaj ove klase fitohormona na: ćelijsku deobu i izduživanje ćelija, krivljenje ose stabla biljaka (bending), reproduktivno i vaskularno razviće, polarizaciju membrane i rad protonskih pumpi, kao i u modulaciji odgovora biljaka na stres (Clouse and Sasse, 1998).

1.7.1 *Uticaj BRs na rastenje i razviće biljaka*

1.7.1.1. *Biotestovi za BRs, BRs mutanti i inhibitori BRs*

Kada je postalo jasno da su BRs posebna grupa regulatora rastenja, postavilo se pitanje odgovarajućeg biotesta, dovoljno osetljivog da reaguje na različite koncentracije BRs i dovoljno specifičnog da daje odgovore samo pri dejstvu BRs na biljke, ali ne i na druge fitohormone. Tako je pokazano da BL može da zameni auksin u testovima izduživanja epikotila soje (Clouse *et al.*, 1992) je istraživao efekat BL na ekspresiju auksinom regulisanih gena u epikotilu soje. Metodama Northern blot analize, korišćenjem sekvenci za auksinom regulisane gene kao probe, molekularni mehanizam izduživanja izazvan BL-om je pokazao razliku 'u odnosu na izduživanje izazvano auksinom, u smislu koncentracionog opsega dejstva (BL izaziva specifične efekte u

datom auksinskom biotestu pri mnogo nižim dozama nego sami auksini), ali problem specifičnog biotesta za BRs je ostao. Taj problem je rešen uvođenjem testa zakrivljenosti rastenja lista pirinča (rice lamina inclination test), kao specifičnog testa za brasinosteroide (Wada *et al.*, 1984), koristeći činjenicu da ovi fitohormoni presudno utiču na procese ćelijske deobe i izduživanja, što su procesi od presudnog značaja pri izduživanju lista trava (Hong *et al.*, 2004). Pregled osetljivosti i specifičnosti ostalih biotestova na BRs dat je u Вороннина (2007). Po uvođenju u praksu biotestova za brasinosteroide, započeto je sa traženjem odgovarajućih mutanata za dejstvo BRs, bilo mutanata biosintetskih puteva ili mutanata signalnih puteva BRs, uključujući i receptore za brasinosteroide (Clouse, 2011). Nađeno je da se mutanti *Arabidopsis* patuljastog rasta (tzv. *dwarf* mutanti) u mraku ne izdužuju (nisu etiolirane, tj. u mraku pokazuju tipični fenotip biljaka raslih na svetlosti), a takođe nemaju BRs ili ih imaju u zanemarljivo malim koncentracijama. Takođe je zapaženo da većina *dwarf* mutanata kojima nedostaje BRs, može nanovo zadobiti normalan, tj. *wild type* fenotip, egzogenim dodavanjem BRs, što ukazuje da BRs spadaju u esencijalne fitohormone (Hayat and Ahmad, 2010). Kombinovanjem rezultata hemijskih analiza međuprodukata biosintetskih puteva BRs kod *wild type* i mutantnih biljaka, načelno je objašnjen put biosinteze BRs, a u pojedinostima su okarakterisani metabolički mutanti tih biosintetskih puteva, pri čemu su identifikovani geni za konverzije enzime biosintetskog puta biljnih steroida i identifikovani karakteristični prekursori biosinteze BRs (Asami *et al.*, 2003).

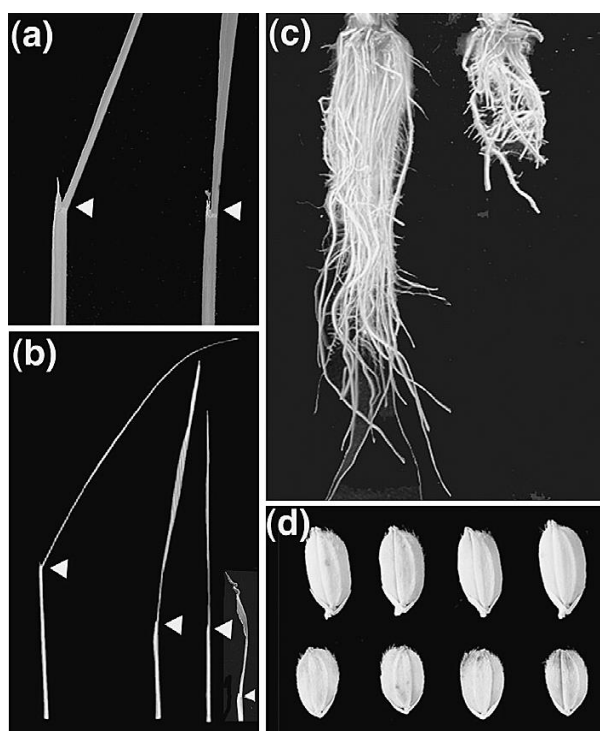
Još jedna od važnih tehnika u ispitivanju mehanizama i načina dejstva BRs jeste korišćenje specifičnih inhibitora za BRs. Vrlo brzo je nađeno da je brasinazol (BZR), jedinjenje tipa triazola, specifičan inhibitor *citohrom P450 oksidaza*, enzima iz grupe tzv. mešanih oksidaza, od velike važnosti u različitim fazama biosinteze steroida (Clouse and Sasse, 1998; Fujioka and Yokota, 2003), kako onih iz pred-brasinosteroidnih biosintetskih puteva, tako i biosintetskih puteva karakterističnih za brasinosteroide (Asami *et al.*, 2000). Međutim, visoka cena BZR u priličnoj meri je ograničavala korišćenje ovakve tehnike, sve dok nisu Asami *et al.*, (2003) i Hartwig *et al.*, (2012) su dokazali da triadimefon i propikonazol, triazolna jedinjenja fungicidnog dejstva, specifično inhibiraju Cyt-P450 oksidaze, a time i neke od specifičnih reakcija u biosintetskom putu BRs.

1.7.1.2. Uloga brasinosteroida u deobi i ekspanziji ćelija biljaka

U mnogim biotestovima nađeno je da BRs povećavaju stopu deobe ćelije, u uslovima ograničene dostupnosti auksina i citokinina što znači da neki vidovi procesa deobe ćelija zavise od brasinosteroida. Kod različitih BRs *dwarf* mutanata pirinča (*d61*, *brd1*, *d2*) je zapaženo da se te mutacije odnose na blokadu različitih mesta u biosintezi i signalnim putevima BRs. Pri analizi tzv. *d2* (*ebisu dwarf*) mutanta koji se može povezati sa BRs, zapažene su neobične fenotipske karakteristike, kao što su uspravni listovi i specifična inhibicija izduživanja druge internodije stabla pirinča. Daljim eksperimentima je pronađeno da *D2* gen kodira citohrom P-450 protein, blizak tzv. *CYP90D* grupi mutanata, a sa velikom sličnošću sa prethodno okarakterisanim BRs-biosintetskim mutantima *Arabidopsis* za Cyt-P450 proteine, kao što su mutanti *CPD/CYP90A* i *DWF4/CYP90B*. Analize sprovedene tretiranjem oglednih mutantnih biljaka različitim biosintetskim intermedijerima BR, kao i kvantitativna hemijska analiza BRs intermedijera, ukazuju da produkti pomenutog *D2* gena deluju na C-3 oksidacionom koraku u poznom putu biosinteze BRs. Zna se da *dwarf* fenotip biljaka uzrokuju defekti u biosintezi ili percepciji biljnih hormona kao što su giberelini (GA) ili BRs. Svi mutanti GA, povezani sa izduživanjem internodija kategorišu se u tzv. *dn*-tip, dok se ekvivalentni mutanti za BRs klasifikuju u *d61-1*, *d2-1* i *d2-2* grupe, tipične za tzv. *dm*-tip mutanata sa skraćenom drugom internodijom. Slični *dwarf* fenotipovi biljaka pirinča su dobijeni i kod *OsBRI1* transformisanih biljaka pirinča, tako da se postavilo pitanje na koje procese utiču ove mutacije u biosintezi i signalizaciji BRs. Pored patuljastog rasta, jedan od najkarakterističnijih fenotipova za BRs mutante su uspravni listovi. Kod pirinča, kada su list i lisni rukavac u potpunosti izduženi, ćelije adaksijalne strane lisne ploče počinju da se izdužuju uzrokujući zakrivljavanje lista dalje od vertikalne ose lisnih rukavaca (koji čine stablo trava) i u pravcu abaksijalne strane. Kod BRs deficijentnih mutanata pomenuto zakrivljavanje listova se ne događa (Yamamuro *et al.*, 2000; Hong *et al.*, 2003).

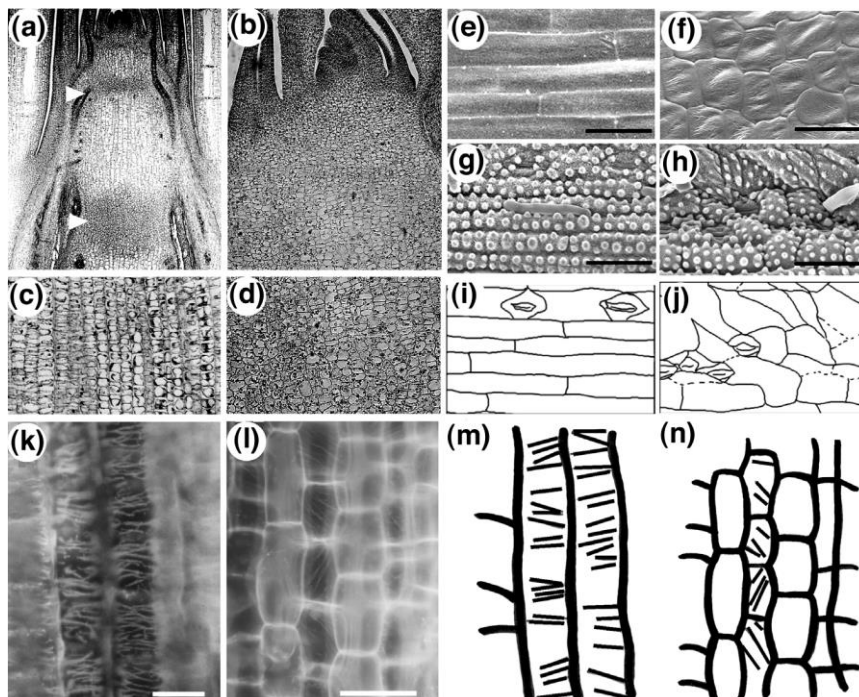
Izduživanje ćelija lista zavisno od BRs zasnovano je na regulaciji orijentacije ćelijskih mikrofibrila (Slika 9). Kod BRs mutanata *dwarf* fenotip i odsustvo zakrivljavanja lista verovatno su rezultat defekta u diferencijaciji ćelija koje se dele ili

izdužuju. Slično tome, abnormalna morfologija lista verovatno je rezultat dezorganizacije normalnog ćelijskog aranžmana i/ili njihovog izduživanja. Dok se list *wild type* pirinča (i drugih trava) deli na pazuhu lista na skoro jednak list i lisni rukavac, kod BRs mutanata lisni rukavac je mnogo kraći od lista, tako da je odnos dužina list/lisni rukavac veoma povećan kod BRs mutanata. Pored toga, defekti homeostaze BRs takođe utiču i na obrazovanje i razvoj korenova i semena mutantnih biljaka. Izduživanje korena je inhibirano, a učestanost obrazovanja korenske krune opada kod BRs-deficijentnih mutanata, ali je obrazovanje lateralnih korenova relativno isto (Hong *et al.*, 2002). Tokom brzog izduživanja ćelija, nodusi se diferenciraju kao odgovor na obrazovanje interkalarnog meristema u internodijama.



Slika 9. Plejotropne abnormalnosti BRs mutanata (a). Uspravni/erektalni list pri nedostatku BRs. Listovi *wt* pirinča zakrivljuju list daleko od vertikalne ose lisnog rukavca (i stabljike), prema abaksijalnoj strani (levo). List *d2-2* mutanta je uspravan (desno). Strelice ukazuju na pozicije prelaza lista u lisni rukavac; (b) Skraćivanje lisnog rukavca pri nedostatku BRs. Lisni rukavac *wt* pirinča (levo) duži je odnosno lisnih rukavaca kod *d61* (dve centralne biljke) ili *brd* (desno) mutantnih biljaka. Odnos dužina lista/lisnih rukavaca je uvećan kod mutantnih biljaka. Strelice ukazuju pozicije prelaza lista u lisni rukavac; (c) Inhibicija rastenja korenova pri nedostatku BRs. Koren *brd1-1* mutantnih biljaka (desno) kraći je i kruna korena je manje razvijena odnosno korenova *wt* pirinča (levo); (d) Smanjenje semena pri nedostatku BRs. Seme mutantne biljke, deficijentne u BRs (donji red) je malo kraće u odnosu na semena *wt* pirinča (gornji red). Preuzeto iz Hong *et al.*, (2004).

U interkalarnim meristemima *wt* biljaka pirinča dolazi do aktivne deobe ćelija u antiklinalnom pravcu (Slika 10), čime se obrazuju uzdužni nizovi ćelija, što vodi uzdužnom izduživanju tako raspoređenih nizova ćelija. Antiklinalne deobe i uzdužno izduživanje ćelija produkuju normalno organizovane nizove ćelija, koje su pokretačka sila za brzo izduživanje stabljike pirinča (i drugih trava).



Slika 10. Remećenje organizovanog rasporeda i polarnog izduživanja ćelija listova i stabljike kod BRs mutanata odnosno *wt* biljaka pirinča. Svetlosna mikrografija srednjeg uzdužnog preseka apikalnog regiona *wt* (a) i *brd1-1* (b) mutanta pirinča u reproduktivnoj fazi. Bele strelice ukazuju na noduse. Svetlosne mikrografije (veće uvećanje) zone ćelijskih deoba interkalarnog meristema stabla kod *wt* (c) i *brd1-1* (d) mutantnih biljaka pirinča. Scanning elektronska mikrografija površinskih struktura lista *wt* (e, g) i *brd1-1* (f, h) mutantnih biljaka pirinča. Lisni zalistak (e, f) i adaksijalna strana lista (g, h) lista pirinča. Šematski prikazi (i, j) odgovaraju mikrografijama (g, h). Imunofluorescentne slike mikrotubularnog aranžmana (k, l) u ćelijama internodalnog parenhima prve internodije kod *wt* (k) i *d61-2* mutantnih biljaka pirinča. Merilo: 50 μ m). Šematski prikaz (m, n) odgovara mikrografijama (k, l). Preuzeto iz Hong *et al.*, (2004).

Nasuprot *wild-type* biljkama, stabljika BRa mutanata se ne razdvaja na noduse i internodije. U stabljici BRs mutanata, šta više, nisu zapaženi organizovani longitudinalni aranžmani ćelija, tipični za internodije *wild-type* biljaka, što ukazuje da je razvoj interkalarnog meristema BRs mutanata defektan. Ovi nalazi pokazuju da su BRs

esencijalni za organizovani aranžman nizova ćelija u internodijama. Ranije studije aktivnosti BR kod biljaka su se zasnivale na nanošenju egzogenih BRs i beleženju uočljivog odgovora. Iz ovih eksperimenata je postalo jasno da BRs imaju pozitivan efekat na ćelijsko izduživanje, uključujući rast epikotila, hipokotila i izduživanje peteljke dikotila, kao i na povećan rast koleoptila i mezokotila kod dikotila (Mandava, 1988). Modulacija ekspresije gena koji kodiraju proteine ćelijskog zida je jedan od mehanizama kojim biljni hormoni, kao što su BRs, auksini i giberelini podstiču izduživanje ćelije i mnogi do sada poznati geni regulisani pod uticajem brasinosteroida kodiraju ovakve proteine (Bishop and Koncz, 2002; Yin *et al.*, 2002).

Zurek i Clouse (1994) su izolovali BR regulisan gen, *BRU1* (*BR upregulated gene*) iz epikotila soje. Analize sekvence su pokazale veliku homologiju *BRU1* gena sa *meri-5* genom kod *A. thaliana* (Medford *et al.*, 1991), a *BRU1* kodira protein koji pokazuje značajnu homologiju sa različitim ksiloglukan endotransglukozilazama (*XET*). Poznato je da *XET* ima važnu ulogu u relaksaciji ćelijskog zida tokom izduživanja ćelije, delujući na lanac ksiloglukana u ćelijskom zidu (Li and Chory, 1999). Kasnije je potvrđeno da je *BRU1* protein zaista funkcionalni *XET* (Oh *et al.*, 1998). Nivo ekspresije *BRU1* u korelaciji je sa ćelijskim izduživanjem indukovanim BRs, a akumulacija *BRU1* transkripata odgovara BRs-posredovanom povećanju plastičnosti ćelijskog zida (Zurek *et al.*, 1994). Daljim istraživanjima utvrđeno je da BRs regulišu ekspresiju *BRU1* gena, pre na nivou postranskripcione obrade, nego na nivou same transkripcije (Zurek and Clouse, 1994; Zurek *et al.*, 1994). BRs regulisani *XET* gen je takođe identifikovan i kod *Arabidopsis* (Xu *et al.*, 1995). Gen *TCH4* kodira *XET*, a njegova ekspresija se povećava u roku od 30 minuta nakon tretmana BRs, sa maksimumom aktivnosti za oko 2 sata. Osim BRs, ovaj gen je takođe regulisan dodiranjem, tamom, temperaturnim šokom i auksinima. Za razliku od *BRU1* gena soje, regulacija ekspresije *TCH4* gena pod uticajem BRs odvija se na nivou transkripcije (Xu *et al.*, 1995). Zurek *et al.*, (1994) ispitivao je fiziološke i molekularne parametre povezane sa BRs-regulisanom izduživanjem stabla kod soje i paradajza. Ovi parametri pokazali su da postoji usporavanje od 45 min pre nego što BL ispolji uočljiv efekat na izduživanje (lag-faza), dok je auksinom indukovano izduživanje kod epikotila soje započinje već nakon 10-15 minuta, što sugerise da postoji različit niz signalnih događaja koji se odvijaju pri izduživanju indukovanom auksinom i onoj indukovano BL. Ovu

teroiiju podržava činjenica da BL pokazuje izduživanje i kod *wild-type* i kod *dgt* mutanata (mutanti neosetljivi na auksin) paradajza i da ne indukuje brzu ekspresiju *SAUR* gena koji su jedna od familija indukovanih auksinom na nivou transkripcije.

Inhibicija izduživanja korena egzogenim hormonima je opšti odgovor kod *wild-type* klijanaca *A. thaliana*, gde auksin, etilen, citokinini i metil jasmonat pokazuju ovaj efekat. Clouse *et al.*, (1993) je pokazao da je 24-EBL koncentracije 10^{-7} M pokazuje približno 60% inhibiciju i primarnog korena *Arabidopsis*. EMS-mutagenizovani klijanci *Arabidopsis* testirani su zbog njihove sposobnosti da produžuju korenove u prisustvu gorepomenute koncentracije BL. Pronađeno je i nekoliko mutanata neosetljivih na BR (Fujioka and Sakurai, 1997).

1.7.1.3. Uloga BRs u diferencijaciji kod vaskularnih biljaka

Nađeno je da pored auksina i citokinina i egzogeno dodati BRs takođe stimulišu diferencijaciju traheja i traheida kod *Helianthus tuberosus* i *Zinnia elegans*, dva primarna model sistema za ksilogenezu. Clouse and Zurek (1991) utvrdili su da nM koncentracije BL uvećava diferencijaciju trahearnih elemenata *Helianthus tuberosus* za 10 puta i to posle svega 24 časa. Uobičajeno, diferencijacija trahearnih elemenata se kod *Helianthus tuberosus* odvija za 72 časa. U izolovanim mezofilnim ćelijama *Zinnia elegans* (druga korišćena model-biljka za proučavanje ksilogeneze) diferencijacija ksilema i formiranje trahearnih elemenata odvija se u tri faze (Fukuda, 1997). U prvoj etapi mezofilne ćelije se dediferenciraju posle indukcije auksinom, citokininom ili posle povrede tkiva, pri čemu se sintetišu specifični transkripti fenilpropanoidnog biosintetskog puta, uključujući i *PAL* i *cinamat hidroksilazu*. Tokom druge faze ekspresija produktata fenilpropanoidnog biosintetskog puta se usporava, ali se obrazuje trodimenzionalna mrežu aktinskih filamenata. U trećoj fazi ksilogeneze, ekspresija gena za *PAL* i *cinamat hidroksilazu* se opet povećava, obrazujući visoko lignifikovani sekundarni ćelijski zid, posle čega dolazi do programirane ćelijske smrti. Postoje indicije koje ukazuju na veliki značaj endogenih BRs za ulazak u fazu 3 ksilogeneze (Fukuda, 1997). Ti nalazi su ojačani ogledima sa unikonazolom, triazolskim inhibitorom biosinteze BRs i giberelena. Poznata je činjenica da je *BRU1* gen (kodira protein ksiloglukan endotransglukozilazu; *XET*), takođe regulisan BRs, što ukazuje na veliki značaj ovih fitohormona i u procesu ksilemske diferencijacije, jer je *XET* enzim

koji je ključan za modifikaciju ćelijskog zida, neophodnog procesa, ne samo pri izduživanju ćelija, već i pri ksilogenezi i sazrevanju plodova.

1.7.2 Uloga brasinosteroida u obrazovanju i klijanju semena

Određeni BRs mutanti, iako produkuju seme, ipak pokazuju abnormalan fenotip skraćenih semena (Hong *et al.*, 2004). Takođe je potvrđeno da 24-EBL pozitivno utiče na rastenje klijanaca kukuruza (He *et al.*, 1991). Kroz različite studije je potvrđeno da brasinosteroidi imaju sposobnost da stimulišu klijanje semena jer se prirodno nalaze u semenu i verovatno su podjednako važni kao i giberelini i abscisinska kiselina u kontroli procesa klijanja (Gomes *et al.*, 2011). Dokazano je da više koncentracije brasinosteroida imaju inhibitorno dejstvo na klijanje i početne faze rastenja i razvića kako plumule tako i radikule kod *Arabidopsis*, dok niže koncentracije imaju stimulatorni efekat na iste i mogu pozitivno uticati na mutante koji imaju nedostatak endogenog giberelina (Haubrick and Assmann, 2006). Kod gorčice (*Brassica juncea*) je dokazano da u zavisnosti od koncentracije 24-EBL ima stimulatorni efekat na klijanje, dužinu i biomasu plumule i radikule kod sedmodnevnih klijanaca dok istovremeno utiče na smanjenje usvajanja rastvorenih teških metala (Ni, Co, Zn, Mn) iz supstrata (Sharma and Bhardwaj, 2007). Kod baštenske grbice (*Lepidium sativum*) je pronađeno da BL u zavisnosti od koncentracije inhibira rastenje. Jedna od pretpostavki je da brasinosteroidi utiču na produkciju etilena i da se na taj način menja produkcija biomase (Jones-Held *et al.*, 1996; Schlagnhauser and Arteca, 1985). Slični efekti su primećeni i kod pirinča (*Oryza sativa*) gde 24-EBL uvećava klijavost semena (Ozdemir *et al.*, 2004), kao i izduživanje plumule (Farooq *et al.*, 2009) u kontrolnim i stresnim uslovima (NaCl salinitet i suša). Takođe, BRs deluju i na aktivnost protonskih pumpi (H^+ pumpe), što utiče vodni režim i rastenje biljaka (Khripach *et al.*, 2003; Sairam, 1994). Za kineski preparat “*Tianfengsu*“ na bazi 24-epibrasinolida je dokazano da pozitivno utiče na klijanje, rast i prinos kod pamuka (*Gossypium* Sp.), pirinča, kukuruza, duvana, voća i povrća (Ikekawa and Zhao, 1991).

1.7.2.1. Uticaj brasinosteroida na vigor klijanaca

Vigor je jedan od aspekata kvaliteta semena koji utiče na poboljšano stanje i performanse biljaka gajenih u nekontrolisanim spoljnim uslovima (Adebisi *et al.*, 2014). Termin vigor se koristi i za opisivanje fizioloških karakteristika semena koje kontroliše njegovu sposobnost da brzo klija u zemljištu i da toleriše različite, uglavnom negativne faktore životne sredine. Procenat klijanja, suva masa cele biljke i početna visina biljke su parametri koji su potvrda visokog vigora (Adebisi *et al.*, 2013). Iz literature je poznato da visoko inicijalno rastenje kod biljaka sa visokim vigorom može u budućnosti rezultirati bržim rastenjem i većim prinosom, što je i zabeleženo kod kukuruza (Mondo *et al.*, 2013). Vigor može biti uzet kao bitan parametar kako bi se koristili hibridi sa višim vigorom, u sredinskim uslovima sa učestalim stresnim epizodama i kada se očekuje niska klijavost semena (Milošević *et al.*, 2010). Visok vigor podrazumeva da biljke moraju imati sto brže isklijavanje, visok procenat klijavosti, veću biomasu klijanaca i površinu listova (Simić *et al.*, 2009). Visina biljke je bitna kako fiziološka tako i poljoprivredna osobina i može biti kontrolisana od strane nekoliko fitohormonskih faktora, uključujući auksine, gibereline, abscisinsku kiselinu i brasinosteroida. U tim procesima uloga brasinosteroida je najmanje poznata i izučena. Sledeći parametri su bitni u povećanju otpornosti na stres kao i kompetitivnoj sposobnosti kod kukuruza: visok vigor, intenzitet rastenja u inicijalnim fazama rastenja, ubrzano povećanje biomase listova, veća površina listova, brži rast korena kao i visina biljke (Mondo, 2012; Simić *et al.*, 2009). Pronađeno je da BL pozitivno utiče na prinos, rastenje kao i vigor kod žitarica (Mitchell and Gregory, 1972).

1.7.3 Metabolizam biljaka i BRs

1.7.3.1. Uloga brasinosteroida u procesu fotosinteze

Jedna od različitih funkcija BRs kod viših biljaka je njihovo moguće učešće u regulisanju fotosinteze. Za egzogenu primenu BRs je dokazano da poboljšava neto stopu fotosinteze kod nekoliko biljnih vrsta i ova pojava je obično više izražena kada su biljke izložene različitim abiotičkim faktorima stresa (kao što je suša, visoke ili niske temperature, salinitet ili teški metali). Međutim, tačni uzroci ovog fenomena još uvek nisu rasvetljeni. Moguću scenariji su da je BRs mogao da spreči gubitak fotosintetičkih

pigmenata aktiviranjem enzima koji učestvuju u biosintezi hlorofila. Druga mogućnost je da BRs poboljšavaju efikasnost fotosintetičke fiksacije ugljendioksida prevazilaženjem stomatalnih ograničenja. Za BRs je takođe pokazano da indukuju sintezu i / ili aktiviranje ugljene anhidraze, enzima koji katalizuje interkonverziju CO_2 i HCO_3^- , da bi se zaštitili enzimi uključeni u regeneraciju ribuloza-1,5-bisfosfata. Primećeno je povećanje efikasnosti fotosistema II ali je i dalje ostalo mnogo nedoumica (Holá, 2011).

Pozitivan efekat BRs na hlorofil a i b bi mogao dovesti do povećanja efikasnosti i i poboljšanja fotosintetske stope. Brojne studije govore o povišenom ukupnom hlorofilu i hlorofilu a ili b u zavisnosti od primene BRs u biljkama. Međutim, brojne studije nisu našle nikakav efekat BRs na hlorofil, tako da još uvek postoji sumnja u pogledu mogućeg uticaja BRs na fotosintetske pigmente. Uglavnom su saznanja da 24-EBL nema uticaja na hlorofil, mada je kod nekih biljaka nađeno da ima. Takođe se dolazi do zaključka da različiti tipovi brasinosteroida drugačije utiču na nivo različitih hlorofila u biljci. Do sada je pronađeno da HBL, bilo da je aplikacija bila folijarna ili potapanjem, utiče na nivo hlorofila kod indijske gorčice (Hayat *et al.*, 2001), 24-EBL u kukuruзу (El-Khallal *et al.*, 2009), a istraživanje ćelija alge *Chlorella vulgaris* pokazuje da je 24-EBL imao više uticaja na nivoe hlorofila od HBL-a (Bajguz and Czerpak, 1998). Takođe, istraživanja na sećernoj repi (*Beta vulgaris* L.) i geranijumu (*Pelargonium graveolens*) pokazuju povećane količine kako hlorofila a, tako i hlorofila b (Swamy and Rao, 2009; Hradecká *et al.*, 2009) Istraživani su i uticaji širokog opsega koncentracija brasinosteroida i pronađeno je da koncentracija od 10^{-9} ima najveći efekat na povećanje hlorofila a i hlorofila b dok druge koncentracije nisu imale značajan efekat (Bajguz and Asami, 2005) Što se tiče karotenoida, pronađeno je da kod kukuruza brasinosteroidi utiču na uvećanje istih kod kukuruza potopljenog u rastvor 24-EBL-a ali ne i na kukuruz tretiran folijarno (Kočová *et al.*, 2010; El-Khallal *et al.*, 2009).

1.7.3.2. Uloga brasinosteroida na metabolizam šećera

Ugljeni hidrati su polihidroksikarbonilna jedinjenja (aldehidi ili ketoni) ili složenija jedinjenja koja hidrolizom daju polihidroksilna jedinjenja. U zavisnosti od sastava,

složenosti strukture i osobina ugljeni hidrati se klasifikuju u tri strukturne grupe: monosaharidi i njihovi derivati (karbohidratne jedinice koje ne podležu hidrolizi), disaharidi i oligosaharidi (hidrolizom daju nekoliko (2-10) monosaharidnih jedinica), polisaharidi (hidrolizom daju više/mnogo monosaharidnih jedinica). Monosaharidi (prosti šećeri) - su primarni oksidacioni proizvodi polihidroksilnih alkohola, kojima se jedna hidroksilna grupa (-OH) dehidrira u karbonilnu aldo- (-HC=O) ili keto-grupu (>C=O). Svi monosaharidi su lako rastvorljivi u vodi, što je uslovljeno prisutnim -OH grupama i imaju sladak ukus. U prirodi se ređe nalaze slobodni, a češće su sastojci oligo- i polisaharida. Svi monosaharidi imaju nerazgranat ugljovodonični lanac (Ahmad and Rasool, 2014).

Među ugljenim hidratima, monosaharidi predstavljaju produkte fotosinteze i supstrat disanja, tako da igraju veoma važnu ulogu u primarnom energetsom metabolizmu biljaka. Disaharidi igraju važnu ulogu u floemskim transportnim procesima, dok polisaharidi imaju strukturnu (celuloza) ili ulogu rezervnih materija (skrob). Glukoza i fruktoza nastaju kod vaskularnih biljaka kao produkt hidrolize ili fosfatnih estara ili njihovog disaharida saharoze kao primarnog transportnog šećera u floemu biljaka. Studije pokazuju da visok nivo glukoze i saharoze tokom toplotnog stresa predstavlja važnu osobinu fiziološki povezanu sa tolerancijom toplotnog stresa (Liu and Huang, 2000) Saharoza je glavni krajnji proizvod fotosinteze, koji se translocira od izvora do ostalih organa kroz floem. Saharoza i njeni produkti razlaganja regulišu razvoj biljaka i odgovor na stres putem translokacije ugljenika i šećerne signalizacije (Roitsch and González, 2004). Fruktoza (Fru) je najznačajnija ketoheksosa poznata pod nazivom voćni šećer koji sa glukozom formira saharozu. Manosa (Man) kao aldoheksosa je sastojak visokomolekularnih biljnih polisaharida (hemiceluloze, mono- i heteromanana, i biljnih sluzi). U toku metabolizma može se transformisati u D-glukozu. Retko se nalazi slobodna. Često se sreće u obliku polihidroksilnog alkohola manitola. Dobija se hidrolizom hemiceluloze. Maltoza je izgrađena iz dva molekula D-glukoze. Ona je stereoizomer celobioze i jedan je od najrasprostranjenijih disaharida. Nalazi se u listovima, krtolama i semenu biljaka, a maltoza i njen izomer izomaltoza (produkt karamelizacije glukoze) najčešće nastaju prilikom klijanja semena kao produkt hidrolize polisaharida, celuloze i skroba (Anonymus f., 2016), od kojih nastaju i

izomaltotrioza, maltotrioza, panoza, a svi zajedno učestvuju u formiranju pektina, hemiceluloze, celuloze i lignin (Horton, 2012). Skrob koji se nalazi u organima za skladištenje se sastoji od dve glavne komponente, amiloze i amilopektina (Pan, 2000). Trehaloza je disaharid izgrađen od dva molekula α -glukoze. Predstavlja najefikasniji ugljeni hidrat u očuvanju strukture i funkcije bioloških sistema tokom dehidracije (Sun and Davidson, 1998). U semenima koja obično akumuliraju saharozu i oligosaharide, formiranje intracelularnih staklastih formacija je povezano sa održavanjem vitalnosti semena tokom skladištenja (Sun and Leopold, 1994). Primećeno je, međutim, da formiranje staklastih formacija nije dovoljno samo po sebi za očuvanje membrana (Crowe *et al.*, 1994) i proteina (Duddu and Dal Monte, 1997). Trehaloza efikasno uspostavlja vodonične veze, i ima najveći potencijal među disaharidima za formiranje vodoničnih veza sa biomolekulima (Sun and Davidson, 1998), čime se stabilizuju različite biološke makromolekularne strukture osetljive prema različitim vidovima stresa. Veruje se da su i staklasta struktura i vodonične veze neophodne za očuvanje membrane i proteina (Sun and Leopold, 1997; Crowe *et al.*, 1994; Chang *et al.*, 1996). Trehaloza je poznata po svojim zaštitnim sposobnostima (Paul *et al.*, 2008), stabilnosti i niskoj reaktivnosti. Ona štiti proteine i membrane od denaturacije zamenom vode u vodoničnim vezama. Tokom sušenja trehaloza formira amorfnu staklastu strukturu koja ograničava molekularno kretanje, sprečava agregaciju proteina i difuziju slobodnih radikala. Konfiguracija α, α -1,1 je od ključnog značaja za sposobnost trehaloze da sačuva lipidnu dvoslojnu strukturu u odsustvu vode (Albertorio *et al.*, 2007.) Kod kukuruza, egzogena primena trehaloze izaziva toleranciju na vodni deficit (Ali and Ashraf, 2011). Za šećere je dokazano da su efikasni u zaštiti membrana snižavanjem tranzicije gel-fluid faze nakon dehidratacije. Ovaj fenomen je uočen za glukozu, saharozu i trehalozu. Efekat se može objasniti direktnom zamenom molekula vode za molekul šećera, sprečavajući povećanje lipidnih acil lanaca u suvom stanju. Ovaj efekat se naziva "hipoteza o zameni vode" (Moiset *et al.*, 2014). Arabinoza (Arab) je aldopentoza koja je u biljkama (za razliku od ostalih monosaharida) nadjena u L-obliku. Retko se nalazi slobodna već je sastojak glikozida, hemiceluloze, pentozana, biljne gume, pektina, biljnih sluzi, melase, smole trešnjevog drveta, poliglikozida arabana i drugih visokomolekularnih poli-saharida pentozana. Riboza (Rib) je aldopentoza koja je univerzalni sastojak ćelije jer ulazi u sastav nukleotida ribonukleinskih kiselina, a u β -

D-furanoznom obliku koenzima (ATP, ADP, GTP, NAD, FAD, CoA i dr.). Sadrži tri asimetrična ugljenika, a stvara se iz D-glukoze kao intermedijer u pentozo-fosfatnom ciklusu. Redukcijom riboze dobija se alkohol ribitol koji ulazi u sastav mnogih biološki aktivnih jedinjenja (Cui, 2005). Kao glavni sastojci morskog fitoplanktona, makroalgi i većine gljiva, poliol (šećerni alkoholi) značajno doprinose proizvodnji ugljen dioksida na svetu. Verovatne fiziološke funkcije koje uključuju poliole tiču se skladištenja CO₂, preraspodele asimilata i osmoregulacije (Lewis, 1984). Poznato je da je sorbitol primarni fotosintetski proizvod u mnogim vrstama porodice *Rosaceae*, uključujući ekonomski važne rodove *Malus* (jabuka), *Pyrus* (kruške) i *Prunus* (koštičavo voće: breskve, trešnje, šljive, kajsije i sl.), ali i dunja, grožđe i ribizla (Loescher, 1987). Poznata literatura sugerše da sorbitol štiti ćelije od štetnih efekata izazvanih visokim osmotskih pritiscima i da ovaj alkoholni šećer igra važnu ulogu u procesu rasta ćelija, etanolnoj fermentaciji i sintezi proteina (Sootsuwan *et al.*, 2013). U životinjskom carstvu, sorbitol ima ulogu zaštite i stabilizacije osmolita (Street *et al.*, 2006). Galaktitol je šećerni alkohol koji nastaje kao produkt redukcije galaktoze i koji se može naći u određenim bakterijama, kvascima, gljivama i biljkama. Aplikacija 24-EBL na sočivici (*Wolffia arrhizal*) u koncentracijama od 10⁻¹³ do 10⁻⁶ je stimulisala rast i povećala količinu fotosintetičkih pigmenata, šećera i proteina. Najoptimalnija koncentracija, odnosno koncentracija koja je pokazala najbolji efekat je 10⁻⁹ M (Bajguz and Asami, 2005). Utvrđivani su i efekti 24-EBL na rast krastavca (*Cucumis sativus* L.). Dodati EBR je doveo do povećanja koncentracije fruktoze, saharoze i ukupnih rastvorljivih šećera u korenu, ali ne i u listovima (Kang *et al.* 2009) Potvrđeno je kod šargarepe (*Daucus carota*) da u određenoj koncentraciji BRs stimulišu i aktiviraju vakuolarnu H⁺-ATPazu što dovodi do izduživanja ćelije, snižavajući potencijal vakuole i povećavajući usvajanje jona i šećera (Gogarten *et al.*, 1992; Tominaga and Sakurai, 1996).

Rastenje je povezano sa porastom potrebe za ugljenim hidratima koji se koriste i troše u osnovnom metaboliškim procesima. Pronađeno je da je koren uronjen u EBR značajno promovisao izduženje epikotila kod sadnica krastavca (*Cucumis sativus*), prateći preraspodelu šećera od primarnih listova do epikotila, sugeršući da je akumulacija šećera usko povezana sa promocijom izduživanja. Za biljke tretirane 24-EBL se pokazalo da imaju povećan sadržaj glukoze i saharoze u zavisnosti od

koncentracije 24-EBL, kao i da 24-EBL utiče na nagomilavanje šećera u delu biljke koji najviše raste. Dodatni dokaz da BRs izazivaju stimulaciju rastenja daju povećani nivoi *Lin6* gena koji kodiraju ekstracelularne invertaze i jedan od ključnih enzima u preraspodeli saharoze. Evidentno je da BRs indukuju povećanu sintezu određenih šećera koji imaju bitnu ulogu u rastu i razvoju biljaka (Nakajima and Toyama, 1999; Goetz *et al.*, 2000; Roitsch *et al.*, 2003). Takođe je zapaženo da BRs utiče na povećanu proizvodnju glukoze u listovima pirinča kao i pretvaranje glukoze u skrob u zrnima pirinča (Wu *et al.*, 2008). Pored direktnih efekata na regulaciju rastenja, takođe je nađeno da BRs deluju kao posrednici asimilacije i preraspodele ugljenih hidrata. povećanje uspešnost oplodnje, utiče na aktivnost enzima, skraćuje trajanje vegetativnog rastenja, aktivira sintezu proteina i nukleinskih kiselina, utiče na veličinu plodova i uvećava prinos voća, menja sadržaj hranjivih komponenti i kvalitet ploda, utiče na sastav masnih kiselina, deluje na svojstva ćelijskog zida pri sazrevanju plodova, uvećava prinos kod žitarica i ostalih useva (Khripach, 2000.; Maugh, 1981; Fujita, 1985; Abe, 1989; Mandava, 1991).

1.7.3.3. Mineralna ishrana i mineralna toksičnost kod biljaka i BRs

Pokazalo se da BRs izazivaju hiperpolarizaciju membrane i stimulišu ATPaznu aktivnost, sve procese neophodne pri aktivnom usvajanju elemenata iz zemljišta, a takođe mogu i da utiču na translokaciju mikroelemenata u biljci (Khripach, 2000; Maugh, 1981; Fujita, 1985; Abe, 1989; Mandava, 1991). Po fiziološkoj ulozi u biljkama mikroelementi se dele na esencijalne (npr. Cu, Fe, Mn, Zn, Mo, Ni) i neesencijalne (Cd, Cr, Pb, Hg, As). Neesencijalni mikroelementi mogu biti veoma toksični za biljke, predstavljaju važne zagađivače životne sredine (Dhillon and Dhillon, 1996) i nemaju nikakvu poznatu funkciju u biljkama (Mihaljev *et al.*, 2015). BRs imaju sposobnost da regulišu apsorpciju jona u biljne ćelije i mogu se koristiti za smanjivanje akumulacije teških metala i radioaktivnih elemenata u biljkama.

Teški metali u vidu finih čestica prašine mogu dospeti u atmosferu, odakle se talože u vodama i tlu. Bakar postaje jako fitotoksičan kada se nalazi u većoj koncentraciji u korenu. Takođe može biti jedan od uzroka inhibicije rastenja ili čak i smrti biljaka. Bakar je sastavni deo citohrom oksidaze i većina enzima kod kojih je

komponenta bakar reaguje sa O_2 i proizvode H_2O ili H_2O_2 (Marko, 2014). Cink je konstituent mnogih enzima i aktivator karbonske anhidraze (otpušta CO_2 iz bikarbonata. Pored lana i soje na nedostatak cinka je osetljiv i kukuruz. Mangan je sastavni deo mnogih enzima, a nezamenjivu ulogu ima u fotosintetičkom transportu. Gvožđe je potrebno za sintezu hlorofila, redukciju nitrita i sulfata, asimilaciju N_2 kao i transport elektrona. Kobalt je bitan element za više biljke jer potpomaže simbiotsku fiksaciju azota sa bakterijama (Nešković *et al.*, 2010).

Egzogeno dodati brasinosteroidi mogu imati široku primenu u redukciji stresa izazvanog biotičkim i abiotičkim faktorima (teški metali, herbicidi, slani stres, stres suše) (Gomes, 2011). Pokazano je da BRs imaju mogućnost da regulišu usvajanje elemenata iz spoljne sredine kao i da mogu uticati na smanjenje akumulacije teških metala i radioaktivnih elemenata u biljkama. Metali kao što su kadmijum, hrom, bakar, nikl se smatraju kao bitni zagađivači životne sredine (Dhillon and Dhillon, 1996). Kadmijum je ekstremno toksičan za biljke i može izazvati oksidativni stres a može uticati i na biosintezu hlorofila čime utiče i na proces fotosinteze. Pronađeno je da je došlo do povećanja biomase kod *Brassica juncea* kada su semena bila tretirana epibrasinolidom. Takođe, epibrasinolid je blokirao usvajanje i akumulaciju bakra u biljnim organima (Sharma *et al.*, 2008). Nova istraživanja otkrivaju uticaj brasinosteroida na redistribuciju elemenata u biljnom sistemu, čime se potvrđuje da brasinosteroidi ne utiču samo na toleranciju elemenata nepovoljnih za rastenje biljke, već i na akumulaciju istih u određenim delovima biljke (Khripach *et al.*, 2000). Iako su u semenu elementi kao što je cink, prisutni u niskim koncentracijama, oni su neophodni kako bi biljka mogla normalno da se razvije (Graham and Welch, 1996).

1.7.3.4. Uloga brasinosteroida u sekundarnom metabolizmu kod biljaka

Fenolna jedinjenja su široko rasprostranjena kod biljaka kao što su žitarice, povrće, voće i njihovi proizvodi. Ona pokazuju širok spektar biološke aktivnosti, antibakterijsko, antiinflamatorno, antialergijsko, hepatoprotektivno, antitrombinsko, antivirusno, antikarcinogeno i vazodilatorno dejstvo (Middleton *et al.*, 2000; Nardini and Ghiselli, 2003). Biljke postaju znatno otpornije na nepovoljne uslove spoljašnje sredine jer biljke sa povećanim sadržajem fenolnih jedinjenja ispoljavaju antifungalna i antibakterijska svojstva (Sarma and Singh, 2003). Fenolne kiseline se nalaze u većini

biljaka dok ih sisari ne mogu sintetisati ali su im potrebne za normalno funkcionisanje organizma. BRs indukuju sintezu etilena u krtolama krompira povećanjem nivoa terpenoida, a takođe uvećavaju i nivo fenola preko fenilpropanoidnog sintetskog puta. To potvrđuje da interakcija etilena i BRS-a igra ključnu ulogu u indukciji otpornosti na bolesti (Bajguz and Hayat, 2009). Tretmanom biljaka krompira brasinosteroidima, smanjena je učestalost plamenjače krompira (*Phytophthora infestans*). Povećanje otpornosti kod tretiranih krtola krompira sa BRs je povezano sa povećanjem nivoa ABA hormona i etilena i prisustvom fenolnih i terpenoidnih supstanci (Vasyukova *et al.*, 1994).

Zaštitni efekat 24-EBL na bolesti krastavca iskazan je preko povećane aktivnosti enzima peroksidaze i polifenoloksidaze koji su uključeni u metabolizam polifenola što ukazuje da su brasinosteroidi značajan faktor u povećanju otpornosti na bolesti izazvane glivičnim oboljenjima (Churikova and Vladimirova, 1997). Pronađeno je i da EBR utiče na sadržaj fenolnih komponenti kao i da uvećava antioksidativni kapacitet kod različitih vrsta grožđa (Xu *et al.*, 2014), a time i otpornost prema patogenima (Korableva *et al.*, 1999). Neke od fenolnih kiselina koje su pronađene u zrnu i u delovima lista kukuruza su: taninska kiselina, galna kiselina, vanilinska kiselina, O (orto)-kumarna kiselina, kafeinska kiselina, ferulinska kiselina, cinaminska kiselina, salicilna kiselina. Sve ove kiseline aktivno učestvuju u odbrani biljke od negativnih uslova spoljašnje sredine (Pandey *et al.*, 2013).

1.8 Uloga brasinosteroida u odgovoru biljaka na stres

BRs pokazuju antistres dejstvo, što otvara mogućnost njihove praktične upotrebe u biljnoj proizvodnji. Wilen *et al.*, (1995) je pratio efekat 24-EBL u odgovoru na ćeliju kulturu *Bromus inermis* pri stresu niskim i visokim temperaturama. 24-EBL je povećao toleranciju na visoke i niske temperature 20 puta kod ćelija *B. inermis* i indukovao sintezu toplotno-stabilnih polipeptida kao i na akumulaciju 90 kDa *heat-shock* proteinskih transkripata (*hsp90*). To znači da BRs mogu imati i ulogu u stvaranju tolerancije na toplo i hladno (Fujioka and Sakurai, 1997). BRs posreduju pri reakciji

biljaka na abiotske i biotske stresove, uključujući stres suše, saliniteta, ekstremnih temperatura i napada patogena (Clouse, 2002).

1.8.1 Uticaj brasinosteroida na reaktivne kiseonične i reaktivne azotne vrste

Reaktivni oblici kiseonika i reaktivni oblici oksida azota spadaju u jedne od najvažnijih slobodnih radikala u biološkim sistemima (Pistón *et al.*, 2014). Sve ove reaktivne vrste mogu reagovati sa molekulima prisutnim u ćelijskim strukturama i izazvati njihovu inaktivaciju. Radikali koji su nastali redukcijom kiseonika predstavljaju najznačajniju klasu slobodnih radikalskih vrsta u živim sistemima. Termin reaktivne kiseonične vrste se često koristi u naučnoj literaturi i nije samo zajednički termin koji obuhvata radikalske kiseonične vrste, već i neradikalske kiseonične forme kao što su vodonik-peroksid, singletni kiseonik i hipohlorna kiselina. Pored reaktivnih kiseoničnih vrsta, reaktivne azotne vrste su takođe značajne za biološke sisteme. Reaktivne kiseonične vrste (ROS), kao i reaktivne azotne vrste (RNS), proizvode se konstantno u normalnom ćelijskom metabolizmu (Cramer *et al.*, 2011).

Teški metali mogu uzrokovati stvaranje reaktivnih kiseoničnih vrsta različitim mehanizmima, što može dovesti do oksidativnog stresa čitave biljke (Štajner and Popović, 2008; Trudić *et al.*, 2012). ROS vrste mogu da menjaju gensku ekspresiju i modeliraju aktivnost specifičnih odbrambenih proteina, a mogu i da budu ekstremno štetne zbog svoje sposobnosti da oksiduju proteine, lipide, nukleinske kiseline, dovodeći do poremećaja u ćelijskoj strukturi i mutogeneze (Halliwell and Gutteridge, 1989). Održavanje normalnog nivoa različitih reaktivnih kiseoničnih i azotovih vrsta je u biljnoj ćeliji obezbeđeno raznim mehanizama neutralizacije koji zavise od opštih fizioloških uslova u biljci, kao i faze razvoja (Asada, 1999). Enzimi učestvuju delimičnom neutralisanju superoksid anjona i peroksida, a neki od njih su superoksid-dizmutaza (SOD), katalaza (CAT), glutation-reduktaza (GR), askorbat-peroksidaza (APx), tioredoksin i peroksi-redoksinska familija proteina (Bajguz and Hayat, 2009 i Mittler *et al.*, 2004). Antioksidativna odbrana, pored proteina uključuje i neproteinske skevendžere ROS-a i RNS-a, poput askorbata i glutationa, karotenoida, tokoferola, lipoične kiseline, fenolnih jedinjenja, poliamina i dr. (Noctor and Foyer, 1998). Svi ovi

sistemi odbrane od oksidativnog stresa, određuju redoks stanje ćelije i pojedinih organela, i regulišu gensku ekspresiju koja je povezana sa abiotičkim i biotičkim stresom. „Oksidansi, kao i antioksidansi, učestvuju u signalizaciji kako bi obezbedili neophodne informacije o potrebi aktivacije odbrambenih mehanizama, u zavisnosti od redoks ravnoteže, koristeći redoks osetljive receptore koji pokreću kinaza/zavisne ili nezavisne metaboličke kaskade kod viših biljaka. Visoke unutarćelijske koncentracije antioksidanata mogu da spreče nekontrolisanu oksidaciju ključnih ćelijskih komponenti“ (Marko, 2014).

Prethodna istraživanja su pokazala da egzogeno dodati BRs mogu uticati na aktivnost antioksidativnih enzima (Li *et al.*, 1998) Takođe je pronađeno da egzogeno dodati BRs mogu povećati aktivnost SOD kod pirinča i uticati na antioksidativnu aktivnost u zavisnosti od koncentracije egzogeno dodatog BRs-a (Mazorra and Núñez, 2000). Kada se klijanci kukuruza podvrgnu stresu izazvanom nedostatkom vode, pokazano je da se povećava aktivnost SOD, CAT, APx, kao i količina askorbinske kiseline i karotenoida (Li *et al.*, 1998). Pronađeno je i da BRs u zavisnosti od koncentracije menjaju aktivnost CAT, da utiču na smanjenje aktivnosti peroksidaze i askorbinske kiseline tokom osmotskog stresa kod sirka (*Sorghum vulgare*) (Vardhini and Rao 2003).

1.9 Primena kinetičkih i termodinamičkih merenja dehidracije u biljnom sistemu

Dehidracija je kompleksan termofizički i biohemijski proces koji obuhvata istovremeni prenos toplote i mase, koji je praćen uklanjanjem vode iz biljnog sistema. Uklanjanje vode iz uzoraka delova klijanaca kukuruza nije lako, imajući u vidu da postoji niz faktora koji mogu uticati na "prirodu" fizičkog mehanizma odlaska vode, kao što su koncentracije prisutnih hemijskih sastojaka (proteini, celuloza, hemiceluloza, lignin, ugljeni hidrati, ulja) (Lunn *et al.*, 2014). Naime, površinska voda iz sistema prelazi u paru i uklanja se u prvoj fazi, a potom dolazi do kretanja vode iz unutrašnjosti sistema na površinu, koja zatim biva naknadno uklonjena. Prenos vlažnosti iz unutrašnjosti sistema na njegovu površinu zavisi od strukture i osobina ispitivanog

sistema, koji je pod direktnim uticajem tipa veze između vode i hemijskih elemenata u biljnom sistemu. Proces dehidracije ne utiče samo na smanjenje sadržaja vode u biljnom sistemu, već takođe utiče i na druge fizičke i hemijske reakcije (Leopold, 1990), kao što je promena u aktivnosti enzima (Ntuli *et al.*, 2011), čime dolazi do metaboličkog disbalansa. Među biljkama koje su osetljive na povišene temperature, usled kojih dolazi do promena u metabolizmu šećera, enzima i proteina, spada i kukuruz (Leprince *et al.*, 1992).

Kinetička ispitivanja u izotermnim uslovima merenja su bitna da bi se procenile tačne vrednosti kinetičkih parametara i dobio pouzdan mehanizam reakcije vezan za proces dehidracije u različitim biološkim sistemima (Ojediran *et al.*, 2013.). Kinetičke studije se mogu zasnivati na fenomenološkom pristupu, koristeći neke od osnovnih (mehanističkih) parametara (hemijski elementi, hemijska jedinjenja). Za preliminarna kinetička istraživanja na osnovu pomeranja kinetičkih krivi sa promenom temperature duž vremenske ose, važno je rastojanje dveju kinetičkih krivi pri promeni temperature. Ukoliko je podjednako rastojanje između dveju kinetičkih krivi na različitim temperaturama, tada se preliminarno može pretpostaviti da se proces odvija po istom kinetičkom mehanizmu. Ukoliko rastojanje između dveju krivih nije jednako, tada se proces može odvijati preko dva reakciona mehanizma ili može doći do promene u odlučujućem reakcionom mehanizmu. To znači da ukoliko su kinetičke dehidracione krive strmije, u tom slučaju voda brže odlazi iz sistema. U slučaju kompleksnih procesa, moguće su izvesne nepouzdanosti u tumačenju kinetičkih karakteristika procesa koje mogu proisticati iz činjenice da može doći do velikih varijacija u vrednostima prividne energije aktivacije (E_a) sa stepenom konverzije, tokom celokupnog procesa. Prividna energija aktivacije je složena veličina koja u sebi sadrži promene energije aktivacije koja predstavlja kinetičku veličinu, a odnosi se na najmanju količinu energije potrebnu da bi se odigrala elementarna hemijska reakcija ($A \rightarrow B$). U slučaju kompleksnih procesa (koji sadrže više reakcionih stupnjeva, pri čemu se svaki od tih stupnjeva posmatra kao elementarna hemijska reakcija), oni se mogu odigravati preko uzastopnih ili paralelnih reakcija. Ukoliko postoje dve uzastopne reakcije ($A \rightarrow B \rightarrow C$), koje čine jedan složen proces, svaka od ovih reakcija se može posmatrati kao jedan elementarni stupanj koji se karakteriše svojstvenom vrednošću energije aktivacije (E_i , $i = 1, 2$). Prividna (efektivna)

energija aktivacije je kumulativna veličina i predstavlja sumu energija aktivacije ovih elementarnih stupnjeva izraženu kao: $E_a = \psi_1 \times E_1 + \psi_2 \times E_2$, pri čemu ψ_1 i ψ_2 predstavljaju doprinose (%) prvog i drugog elementarnog stupnja, redom. Da bi se ustanovilo da li postoje varijacije E_a sa α , često se koriste izokonverzije metode (Vyazovkin and Sbirrazzuoli, 2006). Step en dehidracije (konverzije) (α) predstavlja bezdimenzionalnu veličinu koja predstavlja reakcioni prinos u odnosu na kinetičku veličinu koja se može posmatrati u odnosu na reaktante ($1-\alpha$) ili na produkte (α). U našem slučaju, to se odnosi na vodu koja je isparila iz sistema. Ove metode omogućavaju izračunavanje vrednosti E_a bez modelističkih pretpostavki, odnosno bez unapred pretpostavljenog matematičkog oblika reakcionog modela. Takođe, ove metode omogućavaju da se iz oblika zavisnosti E_a sa α može izvući zaključak o opštoj mehanističkoj shemi ispitivanog procesa. Međutim, ovakve metode imaju određena ograničenja, jer je potrebno da se uvede reakcioni model kako bi se kompletirao kinetički mehanizam procesa.

“Master” krive prema Ozawa-inoj metodi (Ozawa, 1986) predstavljaju poređenje eksperimentalnih podataka koji obuhvataju vreme dehidracije i step en dehidracije transformisane u reakcione modele sa teorijskim kinetičkim krivama od kojih se svaka konstruiše za specifični kinetički model. Poređenjem ovih dveju krivih, može se ustanoviti po kom reakcionom mehanizmu voda odlazi iz klijanaca kukuruza. U realnim uslovima, termalni i hemijski uticaji, uključujući i pojavu difuzije i mehaničke degradacije, mogu značajno skratiti životni vek ispitivanog sistema. Primenom kinetičke analize moguće je predvideti maksimalnu korisnu radnu temperaturu, optimalnu temperaturu za rast, i proceniti vek trajanja klijanca posle gubitka vode. Procena vremena života je veoma korisna u razvoju, dizajnu i izboru procesnih postupaka u tretmanu uzoraka biljnog sistema tokom i nakon termičke obrade. Sa druge strane, termodinamički parametri se mogu koristiti kako bi se predvidela vrsta reakcije između molekula vode i biomolekula od kojih se dati sistem sastoji. Površinska karakterizacija bioaktivnih centara za desorpciju vode može biti adekvatno teorijski opisana kroz analizu ponašanja termodinamičkih veličina. Međutim, proces dehidracije može biti znatno otežan ako se ispitivani biosistem dodatno hemijski tretira. Da bi se razumele termodinamičke osobine biosistema, važno je razumeti interakciju između prisutnih molekula vode, energetske zahteve dehidratacionog

procesa, zatim poznavanje kinetičkih parametara adsorpcije i desorpcije, osobine vode, kao i fizičko hemijskih osobina molekula prisutnih u biosistemu (Kaya and Kahyaoglu, 2005).

Gubitak vode iz ćelija biljaka predstavlja veoma važan abiotički parametar. Ove promene mogu uticati na kompleksne termodinamičke i kinetičke fenomene vezane za strukturnu stabilnost i sve aspekte bioloških funkcija. Odgovor biljaka na desikaciju je povezan sa termodinamičkim i kinetičkim statusom vode prisutne u ćelijama, koji je važniji za status biljnog sistema, za razliku od ukupnog sadržaja vode prisutne u biljci. Status vode u biljci se može izraziti preko veličina povezanih sa energetske statusom molekula vode, kao što su parcijalna molarna *Gibbs*-ova slobodna energija ili potencijal vode. Ovakav termodinamički pristup se bazira na zakonu o dejstvu masa prilikom sorpcije (usvajanje) vode jer su promene u termodinamičkim parametrima direktno povezane sa odgovarajućim fizičkim i biološkim promenama koje doprinose desikacionom stresu i utiču na toleranciju biljke od isušivanja. Isušivanje biljke predstavlja prelazak vode iz tečnog u gasovito stanje. Temperatura utiče na isparavanje preko parcijalnog pritiska vodene pare u vazduhu i na energetski status vode u biljci, kako u prirodnom (nepromenjenom) stanju, tako i u dehidratisanom stanju. Porast temperature uzrokuje opadanje ravnotežnog sadržaja vode pri datoj relativnoj vlažnosti (aktivnost vode) (Holclajtner-Antunović, 2000). U izotermnim uslovima vazduh deluje kao membrana, tako da je uspostavljanje ravnoteže u sistemu sporo i zavisno od temperature. Porast temperature dovodi do opadanja ravnotežnog sadržaja vode u sistemu pri datoj relativnoj vlažnosti unutar biljke. Promena aktivnosti vode pri konstantnom sadržaju, pod uticajem temperature je prvenstveno posledica promene u vezivanju vode za dati biomolekul, disocijaciji vode i fizičkom stanju vode. Stoga je u praksi potrebno izračunati odgovarajuće termodinamičke veličine (dH^* , dG^* i dS^*), pod izotermnim uslovima, zbog toga što su dH^* , dG^* i dS^* u funkciji sadržaja vode u sistemu (Pwa, 1988)

Staklasti prelaz predstavlja vremensko-temperaturski zavisni prelaz drugog (II) reda, koji se karakteriše diskontinualnošću ili drugim rečima, promeni u nagibu krive neke od fizičkih, mehaničkih, električnih, termalnih i drugih osobina materijala u funkciji temperature (Rahman, 1995). Za ovaj proces tranzicije se smatra da pripada

reakciji drugog reda u kojoj ispitivani sistem menja svoje stanje ali ne i fazu. Korisnije je definisati staklasti prelaz kao promenu drugog reda po svojoj prirodi s obzirom da je svaka merna tehnika zasnovana na praćenju promene neke specifične osobine sistema. Bilo koja promena (u smislu preloma eksperimentalne krive ili njenog naglog rasta ili opadanja) se može okarakterisati kao postignuti prelaz (u fizičkom smislu) unutar nekog specifičnog temperaturnog opsega (Rahman, 2009).

Temperatura staklastog prelaza (T_g) predstavlja važnu veličinu, posebno u biološkim sistemima koji podležu fizičkim promenama i koji sadrže amorfne šećere, čije je prisustvo od velike važnosti tokom očuvanja biološkog sistema. Ovo proističe iz porasta molekularne pokretljivosti (smanjenje viskoznosti) iznad staklastog prelaza i formiranje visoko uređenog kristalnog stanja, što dovodi do gubitaka absorbovane vode u amorfnom sistemu. Brzina kristalizacije amorfni šećera zavisi od sadržaja vode i vrednosti temperature iznad staklastog prelaza $T - T_g$. Porast sadržaja vode dovodi do povećanje molekularne pokretljivosti što ubrzava kristalizaciju amorfni šećera putem smanjenja T_g (Roos and Karel, 1992). Takođe, zajedno sa šećerima, prisutni su i antioksidativni enzimi stresa. U biosistemu, zajedno sa šećerima, mogu biti prisutni i proteini vezani za procese tolerancije na dehidraciju. Jedna od grupa proteina koja pomaže biljci u prevazilaženju stresa izazvanog visokim temperaturama su LEA proteini, prisutni u nižim i višim biljkama. Iz literature je poznata interakcija šećera i proteina (posebno dehidrina) koji učestvuju u mehanizmima odbrane od dehidracije, niskih temperatura i osmotskog stresa (Close, 1996; 1997). Za ugljene hidrate prisutne kod biljaka otpornih na isušivanje se pretpostavlja se da imaju ulogu u zaštiti proteina i ćelijskih membrana. Takođe, nađeno je da šećeri učestvuju u formiranju staklastog matriksa u citoplazmi anhidrobiota (Buitink *et al.*, 1996). Formiranje staklastog matriksa u citoplazmi anhidrobiota rezultuje u imobilizaciji molekula citoplazme, što omogućava zaštitu organizama od stresa izazvanog povišenom temperaturom i gubitkom vode. Dehidrini (LEA grupa proteina) se kod biljaka nalaze u različitim ćelijskim kompartmentima. Najviše dehidrina je pronađeno u citoplazmatičnim endomembranama klijanaca kukuruza (Egerton-Warburton *et al.*, 1997), što sugerše da su ovi proteini uključeni u zaštitu ćelijskih membrana.

Zajedno sa šećerima, proteini stresa mogu odrediti fizičke osobine ispitivanih klijanaca hibrida kukuruza (sistema kao celine) tokom dehidratacionog stresa, tako da je

veoma važno odrediti temperature staklastog prelaza kada se sistem približava stanju isušenosti. Trebalo bi naglasiti da je staklasto stanje termodinamički nestabilno, tako da stabilnost dehidriranih membrana u staklastom šećernom matriksu zavisi od kinetičke stabilnosti staklastog stanja (Sun and Leopold, 1994).

2. CILJEVI RADA

2 CILJEVI

Predmet disertacije je ispitivanje efekta 24-epibrasinolida u širokom rasponu koncentracija na početne faze rastenja dva hibrida kukuruza (ZP 434 i ZP 704) koji pokazuju različitu toleranciju prema osmotskom stresu. S obzirom na različite genetičke predispozicije i nerazjašnjenu ulogu 24-epibrasinolida na početne faze rastenja i razvića kukuruza, kao i prevazilaženje stresa izazvanog sušom, naučni ciljevi doktorske disertacije su:

- Utvrđivanje stepena uticaja egzogeno dodatog 24-epibrasinolida na klijanje semena, promene u rastanju i biomasi klijanaca pomenutih hibrida kukuruza tokom perioda od sedam (7) dana.
- Utvrđivanje uticaja 24-epibrasinolida na promenu sastava fenolnih jedinjenja, šećera, mineralnih elemenata i fotosintetičkih pigmenata pomenutih hibrida kukuruza.
- Ispitivanje odgovora delova klijanaca u prisustvu 24-epibrasinolida na stres izazvan povišenom temperaturom primenom različitih kinetičkih i termodinamičkih metoda.
- Određivanje optimalne koncentracije 24-epibrasinolida koja bi mogla imati zaštitnu ulogu u ranim fazama razvića klijanaca pomenutih hibrida kukuruza.

3. MATERIЈAL I METODE

3 MATERIJAL I METODE

3.1 Hemikalije

Kao izvor aktivne supstance (24-epibrasinolid), korišćen je preparat “Epin-Ekstra”, proizveden od strane NEST-M (Russia, Moscow). Preparat je kupljen od Galenika-Fitofarmacija a.d., Beograd-Zemun.

3.2 Biljni materijal

Semena koja su korišćena u ovoj doktorskoj disertaciji predstavljaju proizvod “Instituta za kukuruz Zemun Polje”, Zemun polje, Srbija, starosti do godinu dana, dobijena u okviru istraživačkog projekta. Semena hibrida koja su korišćena:

a) Hibrid ZP704: Rodan klasičan hibrid osetljiv na sušu, FAO grupe zrenja 700, gaji se do 300 m nv., sa gustinom setve 55-60000 biljaka po 1 ha i procenjenim prinosom od 14-15 tona po 1 ha, tipa zuban žutog zrna.

b) Hibrid ZP434, rodan hibrid, tolerantan na sušu, FAO grupe zrenja 400, gaji se do 600 m nv., sa gustinom setve 70000 biljaka po 1 ha i procenjenim prinosom od 13 tona po 1 ha, tipa zuban žutog zrna (Anonymus g., 2016).

Tokom eksperimentalnog rada, korišćeni su delovi klijanca (plumula i radikula) semena hibrida kukuruza ZP 434 i hibrida ZP 704. Plumula i radikula su odvajani od klijanaca kukuruza i skladišteni u zamrzivač na -70°C .

3.3 Uslovi gajenja biljaka

Semena su pre isklijavanja podvrgnuta ispiranju u destilovanoj vodi. Semena (4×50 , čija je masa prethodno izmerena) su isklijavana u plastičnim kutijama zapremine 2 l ($24 \times 12 \times 12\text{cm}$) koje su zatvarane kako bi se sprečilo isparavanje tečnosti u kojoj su semena isklijavana. U kutije je stavljano po 50 semena na prethodno sterilisan filter papir (60 min na 105°C), koja su potom prelivana različitim koncentracijama rastvora od $5,2 \times 10^{-7}$, $5,2 \times 10^{-8}$, $5,2 \times 10^{-9}$, $5,2 \times 10^{-10}$, $5,2 \times 10^{-11}$, $5,2 \times 10^{-12}$, $5,2 \times 10^{-13}$, $5,2 \times 10^{-14}$, $5,2 \times 10^{-15}$ M 24-epibrasinolida. Kutije su potom stavljane u fitotron (Loške tovarne

hladilnikov Škofja Loka, d.d., Slovenia) na temperaturne, dan/noć 30/20°C, vremenske 12/12h, i svetlosne 110 - 160 $\mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ uslove iskljavanja (ISTA, 1996).

3.4 Fiziološka istraživanja

3.4.1 Ispitivanje klijavosti semena

Klijavost semena je izračunata kao srednja vrednost klijavosti semena u 4 kutije, pri istom tretmanu različitih koncentracija 24-EBL-a.

3.4.2 Određivanje morfometrijskih parametara klijanaca

Dužina, širina i debljina plumule, radikule i ostatka semena je merena korišćenjem nonijusa (pomoćno merilo, šubler) sa preciznošću od 1/10 mm. Masa odvojenih delova klijanaca (plumula, radikula, ostatak semena) merena je na analitičkoj vagi ("Radwag", Poland), tačnosti 0,1 mg. Merene mase su izražene u apsolutnim (mg) i/ili relativnim merama (masa organa / masa celog klijanca; mg/ g) (Farrar *et al.*, 1998). Merenje sveže mase klijanaca i mase nakon sušenja na 60, 105 i 130°C (Carbolite Gero GmbH & Co. KG) je iskorišćeno za termodinamičke i kinetičke proračune.

3.4.3 Ispitivanje vigora klijanaca

Pojam vigora se koristi kako bi se opisale fiziološke karakteristike klijanaca i predvidela sposobnost klijanca da brzo raste i da se izbori sa nepovoljnim uslovima životne sredine (Milosevic *et al.*, 2010). Procena vigora klijanaca je vršena kroz izračunavanje "Vigor Indeksa klijanaca-II" (SVI-II (Seedling Vigour Index-II)) dobijenih iz rezultata merenja klijavosti semena i ukupne suve mase klijanaca na 60°C. Izračunavanje je izvršeno prema formuli (Kharb *et al.*, 1994):

$$\text{Vigor Indeks klijanaca-II} = \frac{\text{Suva masa klijanca} \times \text{procenat klijavosti}}{100}$$

3.4.4 *Spektrofotometrijska analiza fotosintetičkih pigmenata*

Za izolaciju hlorofila i karotenoida korišćeno je po 20 mg zamrznutog biljnog materijala za svaki tretman i 2 ml 96% etanola. Ependorfe su stavljene u termo šejker i inkubacija je trajala 10 min na 70 °C. Etanol sa estrahovanim pigmentima prebačen je u kvarcnu kivetu i kvantifikacija sadržaja hlorofila i karotenoida vršena je na spektrofotometru (UV – visible Spektrofotometar, Agilent 8453), na tri talasne dužine: 470, 648 i 664 nm. Koncentracije fotosintetičkih pigmenata, računate u odnosu na suhu masu uzoraka, izračunate su prema sledećim formulama (Lichtenthaler, 1987):

$$C_{(a+b)} = 5,24 A_{664} + 22,24 A_{648} \text{ -ukupna količina hlorofila}$$

$$C_a = 13,36 A_{664} - 5,19 A_{648}$$

$$C_b = 27,43 A_{648} - 8,12 A_{664}$$

$$C_{(x+c)} = 1000 A_{470} - 2,13 C_a - 97,64 C_b / 209 \text{ -ukupna količina karotenoida}$$

3.5 Analiza šećera jonskom hromatografijom

3.5.1 *Hemikalije i rastvarači*

Svi standardi i rastvarači su bili analitičke čistoće. Acetonitril, mravlja kiselina, metanol i etanol (HPLC čistoće) kupljeni su od Merck-a (KGaA, Darmstadt, Germany). Ultračista voda (Thermofisher TKA MicroPure sistem za prečišćavanje vode, 0.055 µS/cm) korišćena je za pripremu standardnih rastvora, uzoraka i slepih proba (blankova). Standardi šećera: trehaloza, fruktoza, saharoza, maltoza, glukoza, arabinoza kupljeni su od Tokyo Chemical Industry, TCI, (Belgija), dok su riboza, rafinoza, izo-maltoza i panoza kupljeni od Tokyo Chemical Industry, TCI, (Tokyo, Japan); galaktitol, manitol, ramnoza i sorbitol kupljeni su od Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany). Filteri za prečišćavanje uzoraka (NY:0.22 µm, 13 mm, PTFE membrane 0.45 µm) kupljeni su od firme Supelco (Belefonte, PA, USA).

3.5.2 *Ekstrakcija šećera*

Odmerena je količina od 0.25 g uzorka svakog ispitivanog biljnog dela i ekstrahovana sa 5 mL ultračiste vode. Ekstrakcija je vršena uz primenu ultrazvučnog

kupatila tokom 30 minuta. Potom je izvršeno centrifugiranje na 4000 obrtaja u trajanju 10 minuta. Ekstrakcija je ponovljena dva puta, supernatant je sakupljen i čuvan na +4°C do upotrebe. Pre analize uzorci su profiltrirani kroz PTFE membranske filtre, veličine pora 0.22 µm.

3.5.3 *Određivanje profila šećera jonskom hromatografijom*

Analiza ispitivanih šećera izvršena je primenom DIONEX ICS 3000 DP hromatografskog sistema (Dionex, Sunnyvale, CA, USA) opremljenog kvaternarnom gradijentnom pumpom (Dionex, Sunnyvale, CA, USA). Za razdvajanje šećera je upotrebljena Carbo Pac PA100 sferna anjon-izmenjivačka kolona (4 × 250 mm), na radnoj temperaturi od 30°C. Upotrebljena mobilna faza se sastojala od linearnih gradijenata prikazanih u Tabeli 3 (protok 0.7 mL/min), pri čemu je A – 600 mM natrijum-hidroksid, B – 500 mM natrijum-acetat i C – ultra čista voda (TKA).

Tabela 3. Sastav mobilne faze sa promenom vremena.

Vreme (min)	%A	%B	%C
0 – 5.0	15	-	85
5.0 – 5.1	15	2	83
5.1 – 12.0	15	2	83
12.0 – 12.1	15	4	81
12.1 – 20.0	15	4	81
20.0 – 20.1	20	20	60
20.1 – 30	20	20	60

Pre analize, sistem je bio kondicioniran u toku 15 minuta mobilnom fazom koja se sastojala iz 15% A i 85% C. Svaki uzorak (25 µL) je razblažen 25 puta i injektovan pomoću ICS AS-DV 50 autosemplera (Dionex, Sunnyvale, CA, USA). Korišćen je elektrohemijski detektor sa zlatnom elektrodom kao radnom, dok je kao referentna korišćena Ag/AgCl elektroda. Ovom metodom određivan je sadržaj iz sprasanih uzoraka tretiranih na 130°C (Richter *et al.*, 2009, Wanek *et al.*, 2001, Hurtt *et al.*, 2004)-monosaharida (arabinoze, glukoze, fruktoze, riboze, ksiloze, ramnoze i manoze), disaharida (trehaloze, saharoze, izomaltoze, maltoze i melibioze), trisaharida

(izomaltotrioze, rafinoze, panoze i malotrioze) i šećernih alkohola – sorbitola i galaktitola.

3.6 Određivanje hemijskih elemenata u uzorcima

3.6.1 *Postupak ekstrakcije mikrotalasnom digestijom*

Mineralizacija jakim kiselinama potpomognuta mikrotalasnim zračenjem (Berghof, Speed wave 4, Germany) je korišćena da bi se ekstrahovali elementi iz uzoraka delova klijanaca kukuruza (plumula, radikula, ostatak semena). Digestirano je 0.5 g suvog uzorka dobijenog sušenjem svežih uzoraka 16 h na 105°C iz kontrolnih uzoraka klijanaca i klijanaca tretiranih koncentracijama 24-EBL-a od 5.2×10^{-9} M, 5.2×10^{-12} M and 5.2×10^{-15} M. Postupak digestije uzoraka je urađen po US EPA metodi 3051B (EPA 3051B, 2007) (sa Azotnom kiselinom (HNO_3), Hlorovodoničnom kiselinom (HCl) i Vodonik peroksidom (H_2O_2)).

3.6.2 *Određivanje koncentracija elemenata ICP-OES metodom*

Ekstrakti dobijeni mikrotalasnom digestijom su analizirani Spectro Genesis ICP-OES instrumentom sa Smart Analyzer Vision softverom (SPECTRO Analytical Instruments GmbH, Boschstr. 10. 47533 Kleve, Germany). Krive su određene na osnovu individualnih (Ultra Scientific U.S.A. (koncentracije 1 g L^{-1})) i multi standarda (SPS-SW2, LGC, UK) za ispitivane elemente Mangan (Mn), Natrijum (Na), Cink (Zn), Bakar (Cu), Hrom (Cr), Nikl (Ni), Kadmijum (Cd), Molibden (Mo), Kalcijum (Ca), Magnezijum (Mg), Olovo (Pb), Gvožđe (Fe), Fosfor (P), Kalijum (K), Arsen (As), Sumpor (S), Živa (Hg). Potvrde vrednosti su izvršene spajkovanjem (dodavanje poznate koncentracije analita konkretnom uzorku koji se analizira) na tri različite koncentracije (Tabela 4).

Tabela 4. Spajkovane vrednosti

Fe	50	5	5
Mn	10	1	0.1
Zn	5	0.5	0.05
Cu	10	1	0.1
Cr	5	0.5	0.05
Pb	5	0.5	0.05
Ni	5	0.5	0.05
Cd	5	0.5	0.05
As	20	2	0.2
Hg	5	0.5	0.05
Mo	1	0.1	0.01
S	3.3	3.3	0.33
Ca	100	10	1
Mg	50	5	0.5

3.7 Određivanje polifenolnog profila ekstrakata kljanaca kukuruza

3.7.1 *Hemikalije i rastvarači*

Svi korišćeni rastvarači bili su analitičkog stepena čistoće. 2-Aminoetildifenilborinat (2-Aminoethyl diphenylborinate, NTS) je proizveden od strane Fluka-e (Steinheim, Germany); metanol, etanol, aceton (svi HPLC čistoće), toluen, etil-acetat je proizveden od strane Merck-a (KGaA, Darmstadt, Germany); polietilenglikol 4000 (PEG) proizveden od strane Sigma-Aldrich-a (Steinheim, Germany); mravlja i sirćetna kiselina proizvedena od strane Zorka-e (Šabac, Srbija). Kertridži za sistem za ekstrakciju na čvrstoj fazi (SPE, solid phase extraction) korišćeni za ekstrakciju i koncentrovanje uzoraka bili su tipa Strata C18–E (500 mg/3 mL) proizvedeni od strane Phenomeneks-a (Thermo Fisher Scientific). Ultračista voda (ThermoFisher TKA MicroPure water purification system, 0.055 μ S/cm) je korišćena za pripremu ekstrakata. Filteri (13 mm, PTFE membrane 0.45 μ m) su proizvedeni od strane Supelco-a (Bellefonte, PA, USA).

3.7.2 *Optimizacija metode za ekstrakciju polifenola*

Metode koje su korišćene za izolovanje polifenola iz kukuruza predstavljaju modifikaciju metoda opisanih u prethodno navedenoj literaturi.

Izolovanje slobodnih polifenolnih jedinjenja:

Metod 1 – Masa od 1 g uzorka ekstrahovana je sa 5 mL hladne smeše etanol-voda (80 : 20, v/v), u toku 10 minuta upotrebom ultrazvučnog kupatila. Uzorci su prethodno bili tretirani na 130°C, a potom sprašeni. Nakon toga izvršeno je centrifugiranje na 4000 obrtaja u trajanju od 15 minuta. Ekstrakcija je ponovljena tri puta. Rastvori su sakupljeni i upareni do suva pomoću vakuum uparivača (45°C). Zatim su rastvoreni sa 2 mL vode i tako su čuvani na +4 °C do upotrebe (Ramos-Escudero *et al.*, 2012).

Metod 2 – Masa od 1 g uzorka ekstrahovana je sa 10 mL ohlađenog rastvora smeše etanol-voda (80 : 20, v/v), tokom 10 minuta na ultrazvučnom kupatilu. Nakon toga centrifugiran je (4000 obrtaja) tokom 10 minuta. Postupak je ponovljen tri puta. Dobijeni rastvor je uparen na zapreminu od 2 mL i čuvan na temperaturi od +4 °C do upotrebe. Dobijeni talog korišćen je za ekstrakciju vezanih polifenola, opisanu u nastavku (Ramos-Escudero *et al.*, 2012).

Metod 3 – Masa od 1 g uzorka ekstrahovana je tri puta sa 10 mL metanola, koji sadrži 1% HCl. Zatim je mešana 2 h na sobnoj temperaturi, u odsustvu svetlosti. Homogenizat je zatim centrifugiran 15 minuta na 4000 obrtaja. Nakon centrifugiranja, rastvori su spojeni i upareni do suvog na 40°C. Dobijeni talog je rastvoren sa 2 mL 1% HCl/MeOH i čuvan na +4°C do upotrebe (Del Pozo-Insfran *et al.*, 2006).

Metod 4 - Uzorak je homogenizovan sa 10 mL 50% (v/v) vodenog rastvora metanola koji sadrži 0.1% HCl. Homogenizat je ekstrahovan 24 h nakon čega je izvršena adsorpcija na SPE kertridžu. Prekondicioniranje kolone izvršeno je sa 3 mL metanola i 9 mL ultračiste vode. Uzorci su nanešeni bez prethodnog ceđenja, pod dejstvom vakuuma. Šećeri su isprani sa 6 mL vode. Polifenolna jedinjenja su eluirana sa kolone pomoću metanola (1.5 mL), čime je izvršeno izolovanje analita, njegovo prečišćavanje i obogaćivanje (Lopez-Martinez *et al.*, 2009).

Metod 5 – Masa od 0.5 g uzorka je ekstrahovana sa 10 mL 70% acetona (v/v) tokom 30 minuta na ultrazvučnom kupatilu, na sobnoj temperaturi. Zatim je izvršeno centrifugiranje 20 minuta, na 4000 obrtaja. Postupak je ponovljen tri puta. Dobijeni rastvori su upareni do suva i rastvoreni u 5 mL metanola.

Izolovanje vezanih polifenolnih jedinjenja:

Metod 6 - Nakon ekstrakcije slobodnih polifenolnih jedinjenja, talog je digestovan sa 10 mL natrijum-hidroksida na vodenom kupatilu (95°C) u trajanju od 30 minuta. Zatim je uklonjen kiseonik, provođenjem azota. Nakon toga je uzorak mešan 1h na sobnoj temperaturi. Smeša je zakišeljena ($\text{pH} < 2$) sa 2 mL HCl i ekstrahovana sa 10 mL heksana, da bi se uklonili lipidi. Dobijeni rastvor je ekstrahovan pet puta sa 10 mL etil-acetata. Frakcije etil-acetata su sakupljene i uparene do suva pod vakuumom (35°C). Vezana fenolna jedinjenja su rastvorena u 2 mL smeše metanol-voda (50 : 50, v/v) (Arnous *et al.*, 2001; Pedreschi and Cisneros-Zevallos 2007).

3.7.3 Polifenolni profili ekstrakata kukuruza dobijeni primenom tankoslojne hromatografije

Visoko-efikasna tankoslojna hromatografija (High-Performance Thin-Layer Chromatography, HPTLC) primenjena je za dobijanje polifenolnog profila uzoraka kukuruza. Ekstrakti kukuruza, zapremine 2 μl , naneti su na HPTLC pločice silika gela (Art. 5641, Merck, Darmstadt, Germany) dimenzija 20×10 cm, u obliku traka dužine 8 mm, upotrebom Automatic TLC sampler 4 (ATS4, CAMAG, Muttenz, Switzerland) aparata. Za razvijanje pločica korišćene su smeše toluene - etil-acetat - mravlja kiselina (4:7:1, v/v/v) za identifikaciju manje polarnih jedinjenja (hromatografski sistem 1 - HS1) i etil-acetat – voda - mravlja kiselina (17:2:2, v/v/v) za jedinjenja srednje i velike polarnosti (hromatografski sistem 2 – HS2). Hromatogrami su razvijeni u vertikalnoj kadi. Vreme dostizanja zasićenja kade parama rastvarača iznosilo je 20 minuta. Front rastvarača iznosio je 80 mm. Nakon razvijanja, hromatogrami su sušeni 2 minuta u struji toplog vazduha. Potom su zagrevane 3 minuta na 100°C na ploči za termostatiranje, TLC Plate Heater III (CAMAG) aparata i odmah zatim su uronjene u

0.5% rastvor NTS u etilacetatu u trajanju od 1 sekunde, upotrebom Chromatogram Immersion Device III (CAMAG) aparata. Nakon 5 minuta sušenja na sobnoj temperaturi u kapeli, hromatogrami su uronjeni u 5% rastvor PEG 4000 u dihlormetanu tokom 1 sekunde, u cilju intenziviranja boje i stabilizacije fluorescentnih zona. Fotografije su snimljene na 366 nm upotrebom sistema za video dokumentaciju (CAMAG Video documentation system) spregnutog sa Reprostar 3 (CAMAG) aparatom i čuvane u TIF formatu za dalju obradu.

3.8 Identifikacija fenolnih jedinjenja primenom masene spektrometrije visoke rezolucije (UHPLC-LTQ Orbitrap MS/MS)

3.8.1 *Hemikalije i rastvarači*

Svi standardi i rastvarači su bili analitičke čistoće. Acetonitril, mravlja kiselina, metanol i etanol (HPLC čistoće) kupljeni su od Merck-a (KGaA, Darmstadt, Germany). Ultračista voda (Thermofisher TKA MicroPure sistem za prečišćavanje vode, 0.055 $\mu\text{S}/\text{cm}$) korišćena je za pripremu standardnih rastvora, uzoraka i blankova. Standardi polifenolnih jedinjenja: kvercetin, apigenin, kempferol, luteolin, krisin, pinocembrin, galangin, naringenin, naringin, i rutin kupljeni su od švajcarskog proizvođača Fluka AG. Katehin, miricetin, cis, trans-abscisinska, p-kumarinska, kofeinska, 3-O-kafeoilkininska (hlorogenska), galna, i protokatehinska kiselina kupljeni su od firme Sigma Aldrich (Štajnhajm, Nemačka). Filteri za prečišćavanje uzoraka (13 mm, PTFE membrane 0.45 μm) kupljeni su od firme Supelco (Belefonte, PA, USA).

3.8.2 *Kvalitativna identifikacija fenolnih jedinjenja*

Pri ekstrakciji polifenola korišćen je prethodno opisan *Metod 1*. Polazni rastvor smeše flavonoida (luteolin, kvercetin, apigenin, kempferol, naringenin, krisin, pinocembrin i galangin) i fenolnih kiselina (kofeinska kiselina, p-kumarinska kiselina) koncentracije 1000 mg/l je pripremljen rastvaranjem standardnih supstanci u metanolu. Razblaživanjem polaznog rastvora metanolom pripremljena je serija radnih rastvora koncentracija: 0.025; 0.05; 0.10; 0.25; 0.50; 0.75 i 1.00 mg/l. Polazni i radni rastvori su

čuvani u mraku na 40°C. Kalibracione krive su dobijene korelisanjem površine pikova (apsorpcioni maksimum) sa koncentracijom standardnih rastvora. Sistem za ultraefikasnu tečnu hromatografiju (Ultra Performance Liquid Chromatography - UPLC) sastojao se od Accela 600 pumpe i Accela autosempler (Thermo Fisher Scientific) aparata. Kolona korišćena za analitičko razdvajanje je *Hypersil gold C18* kolona (50 × 2,1 mm, 1,9 µm veličina čestica) (Thermo Fisher Scientific). Mobilna faza je sastavljena od (A) vode sa 1% mravlje kiseline i (B) acetonitrila. Gradijentni program je bio: 0.0-10.0 min, 5-95% B; 10.0-12.0 min, 95% B; 12-12.2 min, 95-5% B; 12.2-15 min, 5% B. Injekciona zapremina za sve uzorke imala je vrednost od 5 µl, a brzina protoka je bila 300 µl/min.

Ultraefikasna tečna hromatografija je spojena sa linearnim jon trap-Orbitrap hibridnim masenim analizatorom visoke rezolucije, LTQ Orbitrap MS/MS (HESI-II, Thermo Fisher Scientific). Ovaj instrument ima mogućnost izvođenja MSⁿ eksperimenata uz istovremeno merenje tačne mase. Koristi operativni sistem Windows XP SP3 opremljen XCalibur softverom za obradu podataka. Ionizacija je izvedena u negativnom modu. Vrednosti parametara jonskog izvora su iznosili: napon jonskog izvora 5 kV, napon kapilara -40 V, napon cevi -80 V, temperatura kapilare 275 °C, glavni i pomoćni protok gasa (N₂) 42 i 11 proizvodnih jedinica. Maseni spektar je sniman u opsegu odnosa *m/z* 100-900. Za studije fragmentacije podaci koji zavise od snimanja su ostvareni kolizionom indukovanom disocijacijom (CID). Normalna koliziona energija (CID) indukovane disocijacije iznosila je 35 eV. Fenolna jedinjenja su identifikovana prema masenim spektrima ispitivanih jedinjenja. Masa identifikovanih molekula dobijena na osnovu UHPLC-LTQ Orbitrap MS/MS je poređena sa tačnom masom izračunatom primenom ChemSpider softvera kao referentne biblioteke identifikovanih jedinjenja.

3.9 Određivanje ukupne antioksidativne aktivnosti EPR metodom

Elektronska paramagnetna rezonantna spektroskopija (EPR), je rezonantna spektroskopska metoda koja se zasniva na rezonantnoj apsorpciji mikrotalasnog zračenja u magnetnom polju, u sistemima koji poseduju najmanje jedan nespareni

elektron. Ti sistemi mogu biti molekuli, joni, intermedijeri, radikali. Ova metoda korišćena je za procenu ukupne antioksidativne aktivnosti, odnosno proizvodnje ukupne količine ROS i RNS u klijancima. Sva EPR snimanja rađena su na EPR spektrometru Bruker Exlexsys E-540 u X-oblasti. Prilikom svih EPR merenja, korišćeni su sledeći eksperimentalni parametri: Centar polja 3506.3 G, širina polja 75 G, mikrotalasna frekvencija 9.85 GHz, mikrotalasna snaga 6.325 mW, modulaciona amplituda 2 G, modulaciona frekvencija 100kHz. Kvantifikacija EPR signala sastojala se od merenja broja preostalih spinova u sistemu nakon redukcije EPR signala spinske probe (3CP) od strane klijanaca kukuruza. Kao kontrolni signal uzeto je 30 µl 0.075 mM rastvor 3CP kupljen od Sigma–Aldrich-a (Steinheim, Germany), rastvorenog u dejonizovanoj vodi. Celi klijanci potapani su u 10 mL 0.075 µM rastvora 3CP. Nakon 60 min, 30µl rastvora uzorkovano je iz epruvete u kojoj se nalazio klijanac i prebačeno u EPR aparat radi očitavanja signala. Uzorkovanje je vršeno uvlačenjem rastvora u 5 cm dugačke gas-propusne teflonske kapilare (Zeus industries, Raritan, NJ) sa debljinom zida od 0.025 mm i unutrašnjim prečnikom od 0.6 mm. Dobijeni signali poređeni su sa EPR signalom kontrolnog uzorka, merenjem intenziteta srednjeg EPR pika. Sva snimanja rađena su na sobnoj temperaturi. Spektri su snimani i analizirani korišćenjem specijalizovanog softvera Xepir (Bruker GmbH) i Eleana (Larida.pl)).

3.10 Kinetički pristup ispitivanju mehanizma dehidracije i određivanje kinetičkih parametara

3.10.1 *Izotermalna (statička) merenja*

Izotermalna merenja su izvršena na visokoj temperaturi u pećnici (Carbolite Gero GmbH & Co. KG). Pećnica primenjuje brzinu grejanja od 30°C min⁻¹. Sva merenja su izvršena u statičkoj atmosferi kiseonika (bez kontinualnog protoka gasa). Prethodno odvojeni delovi 25 klijanaca oba hibrida kukuruza (ZP 434 i ZP 704) sa koncentracijama egzogeno dodatog hormona od 5.20×10^{-9} M, 5.20×10^{-12} M i 5.20×10^{-15} M i kontrolni uzorci su pojedinačno termički tretirani na $T = 60, 105$ i 130°C . Uzorci su stavljeni u pećnicu i podvrgavani su temperaturnom tretmanu u vremenskom opsegu od $t = 8\text{min}$ do $t = 30\text{min}$. Nakon toga, uzorci su stavljeni u eksikator i potom

podvrgnuti merenju. Zabeležene mase predstavljaju prosečne gubitke mase uzorka. Svaki eksperiment na datoj radnoj temperaturi je ponovljen tri puta.

Brzina dehidratacionog procesa može biti opisana opštom kinetičkom jednačinom za procese koji se odigravaju u čvrstoj fazi, u obliku:

$$\frac{d\alpha}{dt} = A \exp\left(-\frac{E_a}{RT}\right) \cdot f(\alpha), \quad (1)$$

gde je t vreme, A je pred-eksponencijalni faktor, E_a je prividna (efektivna) energija aktivacije, T je apsolutna temperatura, R je gasna konstanta, $f(\alpha)$ je matematički oblik reakcionog modela, koji zavisi od mehanizma ispitivanog procesa, a α predstavlja stepen konverzije, odnosno stepen dehidracije. Step en dehidracije se definiše preko relacije $\alpha = (m_o - m_t)/(m_o - m_f)$, gde je m_o masa uzorka na početku termo-analitičkog merenja (za $t=0$), m_t je trenutna masa uzorka u vremenu $t=t$ i m_f je masa uzorka na kraju merenja ($t=\infty$).

3.10.2 Metode za određivanje zavisnosti prividne (efektivne) energije aktivacije od stepena konverzije

Integralna izokonverzionna metoda (Baitalow *et al.*, 1999) se može predstaviti u vidu jednačine:

$$-\ln t_{\alpha,i} = \ln \left[\frac{A_\alpha}{g(\alpha)} \right] - \frac{E_{a,\alpha}}{RT_i}, \quad (2)$$

gde je $t_{\alpha,i}$ vreme potrebno da bi dostigla određena konverzionna vrednost (α) na datoj temperaturi (T_i). Stoga, vrednost prividne energije aktivacije na zadatim vrednostima α ($E_{a,\alpha}$) može se dobiti iz nagiba prave linije, zavisnosti $-\ln t_{\alpha,i}$ od $1/T_i$. Da bi se utvrdio oblik zavisnosti $E_{a,\alpha} = E_{a,\alpha}(\alpha)$ koji se može dobiti iz izotermnih eksperimentalnih podataka, često se koristi diferencijalna izokonverzionna metoda poznata kao Friedman-ova metoda (Friedman, 1964):

$$\ln\left(\frac{d\alpha}{dt}\right)_{\alpha,i} = \ln[A_{\alpha} \cdot f(\alpha)] - \frac{E_{a,\alpha}}{RT_i} \quad (3)$$

gde za $\alpha = \text{const.}$, grafik zavisnosti $\ln(d\alpha/dt)_{\alpha,i}$ od $1/T_i$ konstruisan na nakoliko izotermnih temperatura treba biti prava linija, iz čijeg nagiba nagib se može dobiti vrednost prividne energije aktivacije ($E_{a,\alpha}$) za datu vrednost α . Međutim, obe gore navedene metode ne omogućavaju izračunavanje pred-eksponencijalnog factora (A), niti pretpostavljaju oblik reakcionog modela (poznavanje tačnog matematičkog oblika funkcija $g(\alpha)$ i $f(\alpha)$).

3.10.3 Metode za određivanje reakcionog mehanizma procesa dehidratacije

3.10.3.1. Metoda redukovanog vremena

Reakcioni mehanizam se može odrediti iz eksperimentalnih podataka korišćenjem grafičke metode, poznate kao metoda “redukovanih vremena” (Sharp *et al.*, 1966; Hancock and Sharp, 1972). Izbor $g(\alpha)$ funkcije je baziran na osnovu oblika grafika koji najbolje predstavlja eksperimentalne podatke. Računajući vrednosti α za određeni kinetički model (Khawam and Flanagan, 2006; Ninan *et al.*, 1991) i nanošenjem ovih vrednosti naspram odnosa $t/t_{0.50}$ (gde $t_{0.50}$ predstavlja vrednost vremena koje odgovara stepenu konverzije $\alpha = 0.50$ ili “polu-život” reakcije). Sharp *et al.*, (1966) su formulisali 9 tipičnih kinetičkih krivih, od kojih svaka ima karakterističan izgled. Poređenje eksperimentalnih podataka na svim temperaturama sa teorijskim krivama na kojima su ucertane teorijski predviđene vrednosti α , omogućava nam da odaberemo realan kinetički model koji adekvatno može opisati proces od interesa (u ovom slučaju proces dehidratacije).

Jednačine brzine procesa se mogu svrstati u nekoliko glavnih kategorija reakcionih modela, kao što su: a) reakcije na granici faza, uključujući reakcije prvog reda (u Tabeli 5, model je označen F1(A1)), b) difuzione-kontrolisane reakcije i c) Avrami-Erofeev-ove jednačine (jednačine koje opisuju kinetiku nukleacije i kristalizacije novo formirane kristalne/amorfne faze) (Tabela 5). Međutim treba napomenuti, da analitički izrazi u Tabeli 5 i pored toga što izgledaju potpuno različito, odgovarajuće teorijske krive mogu izgledati veoma slično. Stoga izuzetan stepen

pouzdanosti mora postojati da bi se izvršilo jasno prepoznavanje po kome reakcionom mehanizmu se “pokoravaju” eksperimentalni podaci, tako da “razdvajanje” reakcionih modela unutar iste kinetičke grupe zahteva pažljivu i preciznu selekciju eksperimentalnih podataka i to do najmanje $\alpha = 0.70$ [70 %].

Tabela 5. Kinetički modeli predstavljeni u diferencijalnom obliku

Br.	Simbol	Ime funkcije	$g(\alpha)$	$f(\alpha)$	Odlučujući mehanizam reakcion
(I) Sigmoidalni oblik jednačine brzine procesa ili nasumična nukleacija i naknadni rast nove faze					
(1)	A1, F1	Avrami-Erofeev	$-\ln(1-\alpha)$	$(1-\alpha)$	Pretpostavljena nasumična nukleacija i naknadni rast, $n = 1$
(2)	A1.5	Avrami-Erofeev	$[-\ln(1-\alpha)]^{2/3}$	$(3/2)(1-\alpha)[- \ln(1-\alpha)]^{1/3}$	Pretpostavljena nasumična nukleacija i naknadni rast, $n = 1.5$
(3)	A2	Avrami-Erofeev	$[-\ln(1-\alpha)]^{1/2}$	$2(1-\alpha)[- \ln(1-\alpha)]^{1/2}$	Pretpostavljena nasumična nukleacija i naknadni rast, $n = 2$
(4)	A3	Avrami-Erofeev	$[-\ln(1-\alpha)]^{1/3}$	$3(1-\alpha)[- \ln(1-\alpha)]^{2/3}$	Pretpostavljena nasumična nukleacija i naknadni rast, $n = 3$
(5)	A4	Avrami-Erofeev	$[-\ln(1-\alpha)]^{1/4}$	$4(1-\alpha)[- \ln(1-\alpha)]^{3/4}$	Pretpostavljena nasumična nukleacija i naknadni rast, $n = 4$
(II) Usporavajući trend jednačine brzine procesa, (II.1.) Reakcije na granici faza					
(6)	R1, F0	Stepeni zakon	α	$(1-\alpha)^0$	Skupljajući disk
(7)	R2, F0.5	Stepeni zakon	$1-(1-\alpha)^{1/2}$	$2(1-\alpha)^{1/2}$	Skupljajući cilindar (cilindrična simetrija)
(8)	R3, F0.7	Stepeni zakon	$1-(1-\alpha)^{1/3}$	$3(1-\alpha)^{2/3}$	Skupljajuća sfera (sferična simetrija)
(III) Reakcije zasnovane na difuzionom mehanizmu					
(9)	D1	Parabolični zakon	α^2	$(1/2)\alpha$	Jednodimenzionalna difuzija
(10)	D2	Valensi-jeva jednačina	$\alpha + (1-\alpha)\ln(1-\alpha)$	$[-\ln(1-\alpha)]^{-1}$	Dvodimenzionalna difuzija (2-D)
(11)	D3	Jander-ova jednačina	$[1-(1-\alpha)^{1/3}]^2$	$(3/2)(1-\alpha)^{2/3}[1 - (1-\alpha)^{1/3}]^{-1}$	Trodimenzionalna difuzija (3-D), sferična simetrija
(12)	D4	Ginstling-Brounstein-ova jednačina	$1-2\alpha/3-(1-\alpha)^{2/3}$	$(3/2)[(1-\alpha)^{-1/3} - 1]^{-1}$	Trodimenzionalna difuzija (3-D), cilindrična simetrija

Eksperimentalne $\alpha = f(t/t_{0.50})$ krive se upoređuju sa kinetičkim modelima opisanim odgovarajućim matematičkim funkcijama, predstavljanim u svom diferencijalnom obliku.

3.10.3.2. Ozawa-ina metoda

Sledeća korisna metoda za identifikaciju reakcionog modela predstavlja metoda “Master“ krivih, koje se bazira na uvođenju generalizovanog vremena θ (Ozawa, 1986; Gotor *et al.*, 2000). U tom slučaju kinetička jednačina koja bi odgovarala procesu koji bi se odigravao na beskonačno aproksimiranoj temperaturi, zahteva uvođenje generalizovanog vremena θ , tako da je:

$$\theta = \int_0^t \exp\left(-\frac{E_a}{RT}\right) dt, \quad (4)$$

gde θ označava reakciono vreme koje se posmatra pri dostizanju odgovarajućeg α na beskonačnoj vrednosti temperaturi. U tom slučaju integralni oblik kinetičke jednačine poprima oblik:

$$g(\alpha) = \int_0^\alpha \frac{d\alpha}{f(\alpha)} = A \int_0^\theta d\theta = A \cdot \theta. \quad (5)$$

Korišćenjem referentne tačke $\alpha = 0.50$, dobija se konačni oblik jednačine po kojoj se konstruišu “Master“ krive (Ozawa, 1986) u obliku:

$$\frac{\left(\frac{d\alpha}{d\theta}\right)}{\left(\frac{d\alpha}{d\theta}\right)_{\alpha=0.50}} = \frac{f(\alpha)}{f(0.50)}, \quad (6)$$

gde $f(0.50)$ predstavlja konstantnu vrednost za datu funkciju kinetičkog (reakcionog) modela. Jednačina 6 pokazuje da za dato α , eksperimentalno određena vrednost redukovano-generalizovane brzine procesa, $(d\alpha/d\theta)/(d\alpha/d\theta)_{\alpha=0.50}$ i teorijski izračunate vrednosti $f(\alpha)/f(0.50)$ su ekvivalentni, kada je ispravno izabrana (primenjena) $f(\alpha)$

funkcija. Da bih se izračunala redukovano-generalizovana brzina procesa na datoj vrednosti α korišćenjem eksperimentalnih podataka, mora se prethodno poznavati vrednost prividne energije aktivacije (E_a).

3.10.4 *Određivanje vremena života biljnog sistema nakon gubitka vode*

Analiza vremena života je sprovedena simuliranjem ekstremnih spoljašnjih temperaturskih uslova pod uticajem 24-EBL-a, u koncentracijama od 5.2×10^{-9} , 5.2×10^{-12} , 5.2×10^{-15} M i kontrolnih uzoraka na hibrade ZP434 i ZP 704. Procenjeni vek trajanja ispitivanih sistema do totalnog kolapsa u sadržaju vode može se definisati kao vreme za koje gubitak mase uzorka dostigne 5 % od ukupne težine ($\alpha = 0.05$). Zamenom izraza za $f(\alpha)$, koji se odnosi na reakciju prvog reda (Jednačina 1), tada opšta kinetička jednačina poprima oblik $da/dt = A \cdot \exp(-E_a/RT) \cdot (1 - \alpha)$. Nakon postupka integracije, vreme života može se izračunati iz jednačine u sledećem obliku:

$$t_f = \frac{0.0513}{A} \exp\left(\frac{E_a}{RT}\right), \text{ za red reakcije } n=1 \quad (7)$$

Na osnovu jednačine 7 vreme života (t_f) može se izračunati kao aproksimativna vrednost, u tom smislu da se odnosi na kinetičku aproksimaciju procesa koji se odigrava po mehanizmu reakcije prvog reda ($n = 1$, n – je red reakcije).

3.11 Termodinamička analiza procesa dehidracije klijanaca

Aktivnost vode se u sistemu može opisati kao “efektivni” sadržaj vode. Temperaturska zavisnost promene aktivnosti vode (izotermni pomeraj), može se opisati *Claussius-Clapeyron*-ovom jednačinom:

$$\ln\left(\frac{a_{w2}}{a_{w1}}\right) = \frac{q + \lambda_w}{R} = \left(\frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_1}\right), \quad (8)$$

gde je q toplota sorpcije, λ_w je latentna toplota isparavanja za vodu (44.0 kJ kg⁻¹ na 25°C), R je univerzalna gasna konstanta, dok su a_{w1} i a_{w2} aktivnosti vode na različitim temperaturama (T_1 i T_2) pri datom ravnotežnom sadržaju vode.

Promene spoljašnjih (temperature i/ili vlage) i unutrašnjih faktora (stabilnost staklastog stanja), utiče na energetski status biljke u pogledu respiratornih procesa živih ćelija, što se može proceniti (izračinati) primenom sorpcione izoterme za koje važe sledeće jednačine (Vertucci and Leopold, 1984):

$$dH^* = \frac{R \cdot T_1 \cdot T_2}{(T_2 - T_1)} \ln \left(\frac{a_{w1}}{a_{w2}} \right), \quad (9)$$

$$dG^* = R(T_2 - T_1) \ln \left(\frac{a_{w1}}{a_{w2}} \right), \quad (10)$$

i

$$dS^* = \frac{(dH^* - dG^*)}{dT}, \quad (11)$$

gde pri datom sadržaju vode, a_{w1} i a_{w2} predstavljaju relativnu vlagu pri nižoj i višoj temperaturi T_1 i T_2 , redom. dH^* , dG^* and dS^* predstavljaju diferencijalnu entalpiju, diferencijalnu *Gibbs*-ovu slobodnu energiju i diferencijalnu entropiju dehidrataciju, redom. Ukupna (kumulativna) promena *Gibbs*-ove slobodne energije se može dobiti iz jednačine (Rizvi, 1995):

$$\Delta G^* = \Delta H^* - T_i \Delta S^*, \quad (12)$$

gde T_i predstavlja i -tu izabranu temperaturu.

3.11.1 *Entalpijsko-entropijski kompenzacioni efekat*

Linearna veza između entalpije (ΔH^*) i entropije (ΔS^*) procesa dehidratacije se opisuje jednačinom (McMinn and Magee, 2003):

$$\Delta H^* = \Psi - T_{iso} \cdot \Delta S^*, \quad (13)$$

gde T_{iso} predstavlja izokinetičku temperaturu ($^{\circ}\text{C}$), a Ψ predstavlja energetska konstantu (kJ mol^{-1}).

Izokinetička temperatura je karakteristična osobina površine materijala i predstavlja nagib prave u jednačini 12. Na osnovu linearne regresione analize veličine T_{iso} i Ψ se mogu izračunati na osnovu gore pomenute jednačine. Potvrda postojanja entalpijsko-entropijskog kompenzacionog efekta se ogleda kroz definiciju *harmonijske prosečne temperature* (T_{hm}), koja se može predstaviti jednačinom:

$$T_{hm} = \frac{N}{\sum_1^N \left(\frac{1}{T_i} \right)}, \quad (14)$$

gde N predstavlja ukupan broj korišćenih temperaturskih “nivoa” (nivo predstavlja jedinstvenu vrednost temperature izdvojenu iz skupa svih temperatura ($N=3$ gde je $N=3$ za tri različite korišćene temperature). Linearni kompenzacioni efekat važi u slučaju kada je $T_{iso} \neq T_{hm}$. Proces od interesa biće entalpijski “vođen” ukoliko je $T_{iso} > T_{hm}$, a entropijski vođen ako je $T_{iso} < T_{hm}$ (Leffler, 1955, 1965). T_{hm} je u funkciji datih temperaturskih nivoa u termalnim merenjima ali je nezavisan od prirode ispitivanog materijala, biljke u ovom slučaju.

3.11.2 Jednoslojni sadržaj vlažnosti

Razmatrajući relativnu ravnotežnu vlagu kao aktivnost vode, ravnotežni sadržaj vlažnosti i aktivnost vode mogu se uspostaviti za proces dehidratacije u razmatranim sistemima. Jednoslojni sadržaj vlažnosti (M) delova klijanaca može se dobiti iz standardne BET-ove (Brunauer-Emmett-Teller) (Brunauer *et al.*, 1938) ili modifikovane BET-ove jednačine. U ovom slučaju može se uspostaviti linearna zavisnost između jednoslojnog sadržaja vlažnosti i temperature (Menkov, 2000), koja je važnosti za

većinu bioloških sistema gde standardna BET-ova jednačina ne uzima u obzir temperaturski efekat dok ga modifikovana BET-ova jednačina uključuje, što se može predstaviti sledećim jednačinama:

$$M = \frac{(A + BT)Ca_w}{(1 - a_w)(1 - a_w + Ca_w)}, \quad (15)$$

i

$$M_m = A + BT, \quad (16)$$

gde su A, B i C konstante gore iznetih modela izoterma, M_m predstavlja jednoslojni sadržaj vlažnosti za modifikovanu BET-ovu jednačinu. Jednačina 14 postaje standardna BET-ova jednačina kada se izraz za jednoslojni sadržaj vlažnosti (Jednačina 15) direktno posmatra kao jedinstveni M_m član. S obzirom da standardna BET-ova jednačina ne uključuje temperaturski efekat, jednoslojni sadržaj vlažnosti treba razmatrati za svaku temperaturu ponaosob. Primenom nelinearne regresije, korišćenjem eksperimentalnih podataka na različitim temperaturama mogu se izračunati konstante A, B i C. Vrednosti dobijene iz modifikovane BET-ova jednačina, mogu se uporediti sa rezultatima dobijenim iz standardne BET-ove jednačine. Vrednost aktivnosti vode koja odgovara jednoslojnom sadržaju vlažnosti (a_{wm}) se može izračunati iz jednačine broj (14), zamenom $M = M_m$ (Menkov, 2000):

$$a_{wm} = \frac{C^{\frac{1}{2}} - 1}{C - 1}. \quad (17)$$

Iz jednačine 16 može se videti da je aktivnost vode koja odgovara jednoslojnom sadržaju vode nezavisna od temperature i da je obrnuto proporcionalna vrednosti konstante C.

3.11.3 Pritisak širenja

Pritisak širenja je bio prvi put definisan i izveden od strane Iglesias-a (1976) i Fasina-e (1999) i predstavljen je jednačinom:

$$\pi = \frac{k_B T}{A_m} \int_0^{a_w} \frac{M}{M_m a_w}, \quad (18)$$

gde je π pritisak širenja (J m^{-2}), k_B je Boltzmann-ova konstanta ($1.380 \times 10^{-23} \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$), a A_m predstavlja veličina površine molekula vode ($1.06 \times 10^{-19} \text{ m}^2$). Gornji integral se ne može rešiti ako je $a_w = 0.00$. Zbog toga, da bi se dobio pritisak širenja, gornji integral se rešava na taj način što se dati interval integracije deli u veoma male podintervale, prvo za $a_w = 0.00 - 0.05$, a zatim preostali deo od 0.05 do a_w . Za niske vrednosti a_w , integral se može rešiti primenom linearne aproksimacije (Henry-jev zakon) između M i a_w (Fasina *et al.*, 1999):

$$\pi = \frac{k_B T M}{A_m M_m}. \quad (19)$$

Integral u jednačini 17 u drugoj a_w oblasti (0.05 to a_w), može se rešiti posle usklađivanja (“fitovanja”) izotermnih podataka (M , a_w), pomoću odgovarajuće numerički izvedene jednačine čiji oblik zavisi od fizičkog ponašanja ispitivanog sistema tokom dehidracije. Spajanjem rezultata dobijenih iz posmatranih a_w oblasti (0.00 do 0.05 i od 0.05 do a_w), mogu se dobiti vrednosti pritiska širenja za bilo koju vrednost temperature i vrednosti aktivnosti vode.

3.11.4 Toplota isparavanja

Iganathane *et al.*, (2007) su predložili postupak za izražavanje izosterne sorpciono/desorpcione toplote. Claussius-Clapeyron-ova jednačina procesa isparavanja iz čiste vode se može predstaviti u obliku (Yang and Cenkowski, 1993):

$$\frac{1}{h_{fg}} \cdot \frac{\partial P_s}{P_s} = \frac{\partial T}{RT^2}. \quad (20)$$

Ako se u jednačini 19 P_s zameni aktuelnim pritiskom pare (P_o) u razmatranom biosistemu, a desna strana jednačine 19 ostane ista za paru iz čiste vode i paru iz vlažnosti posmatranog biosistema, može se dobiti sledeća jednačina:

$$\frac{1}{h_{fg}} \cdot \frac{\partial P_s}{P_s} = \frac{1}{L} \cdot \frac{\partial P_o}{P_o}. \quad (21)$$

Integracija (20) pri konstantnom sadržaju vlažnosti daje:

$$\ln(P_o) = \frac{L}{h_{fg}} \ln(P_s) + c_1, \quad (22)$$

gde je c_1 konstanta integracije. Saturacioni pritisak pare (P_s) na različitim temperaturama se može dobiti iz Rogers-Mayhew-ovog (1981) pristupa, tako da se naknadno pritisak pare u ispitivanom biosistemu može odrediti na osnovu jednačine:

$$P_o = a_w \cdot P_s. \quad (23)$$

Poznavanjem a_w vrednosti iz gore navedenih modela izoterme (BET jednačina i modifikovana BET jednačina) zajedno sa jednačinom 23 mogu najbolje opisati ravnotežni sadržaj vlažnosti u ispitivanim sistemima pod uticajem prisutnih faktora. Iz nagiba prave logaritamske zavisnosti $\ln(P_o)$ u funkciji $\ln(P_s)$, može se dobiti odnos toplote isparavanja vlažnosti u ispitivanom biosistemu naspram latentne toplote saturisane pare. Dobijene vrednosti L/h_{fg} se zatim matematički koreliraju sa vrednostima M kroz postupak nelinearne regresije, koja se može sprovesti u OriginLab® programu (opcija u OriginLab® za numeričko izračunavanje). Dobijene numeričke jednačine opisuju sa fizičkog stanovišta odnos L/h_{fg} i M . Takođe, matematički oblici izvedenih jednačina u sprezi sa numeričkim koeficijentima značajno mogu prikazati “stanje” ispitivanog biosistema tokom dehidratacionog stresa tokom povišenih temperatura.

3.11.5 Analiza temperatura staklastog prelaza (T_g)

Izračunavanje T_g i njenog ponašanja tokom dehidracije se može izvesti na bazi kinetičkih veličina. Konstruisanje krive koja daje zavisnost polu-vremena ($t_{0.50}$) je vreme koje se postiže za 50% konverzije (α -stepen dehidracije) u funkciji temperature (T), i omogućava određivanje vrednosti T_g . Vrednost T_g se može odrediti iz preseka tangenti na krivu, gde se povlačenje tangenti vrši na zakrivljenim delovima iste krive. Dobijena

kriva odlikava ponašanje eksperimentalnih tačaka koje prate zavisnost $t_{0.50} = t_{0.50}(T)$. Na taj način, dobijena kriva se može opisati odgovarajućom funkcionalnom zavisnošću koja se može dobiti putem numeričke analize (opcija u OriginLab® za numeričko izračunavanje) ponašanja eksperimentalnih tačaka.

3.11.6 Statistička merenja

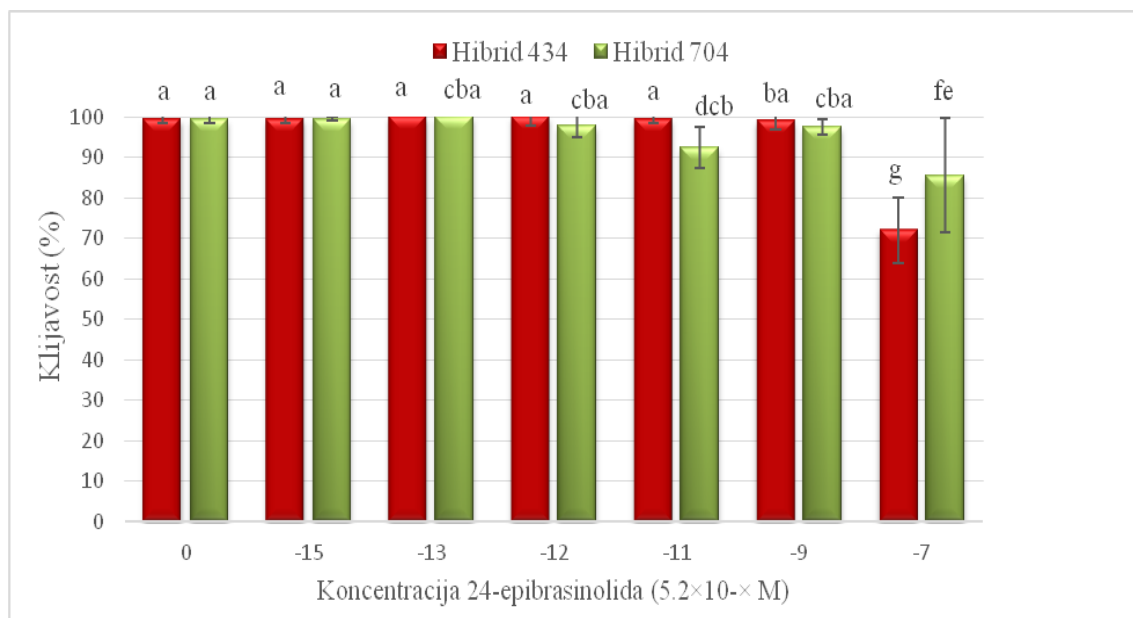
Dobijeni rezultati su nakon provere normalnosti Kolmogorov-Smirnovim testom, podvrgnuti analizi standardne varijanse (One and Two-way ANOVA testovi). Srednje vrednosti sadržaja šećera, mineralnih elemenata i fotosintetičkih pigmenata u delovima klijanaca kukuruza, su dobijene korišćenjem Tukey HSD testa. Takođe, isti test je primenjen i u slučaju dobijanja srednjih vrednosti morfometrijskih parametara klijanaca. Statistička značajnost primenjena u svim testovima je bila $P < 0.05$. Statistička analiza je izvršena primenom softverskih programa STATISTICA v.7 (StatSoft, Inc.) i IBM SPSS Statistics v.20 (SPSS, Inc.).

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4 REZULTATI I DISKUSIJA

4.1 Uticaj 24-EBL-a na klijanje

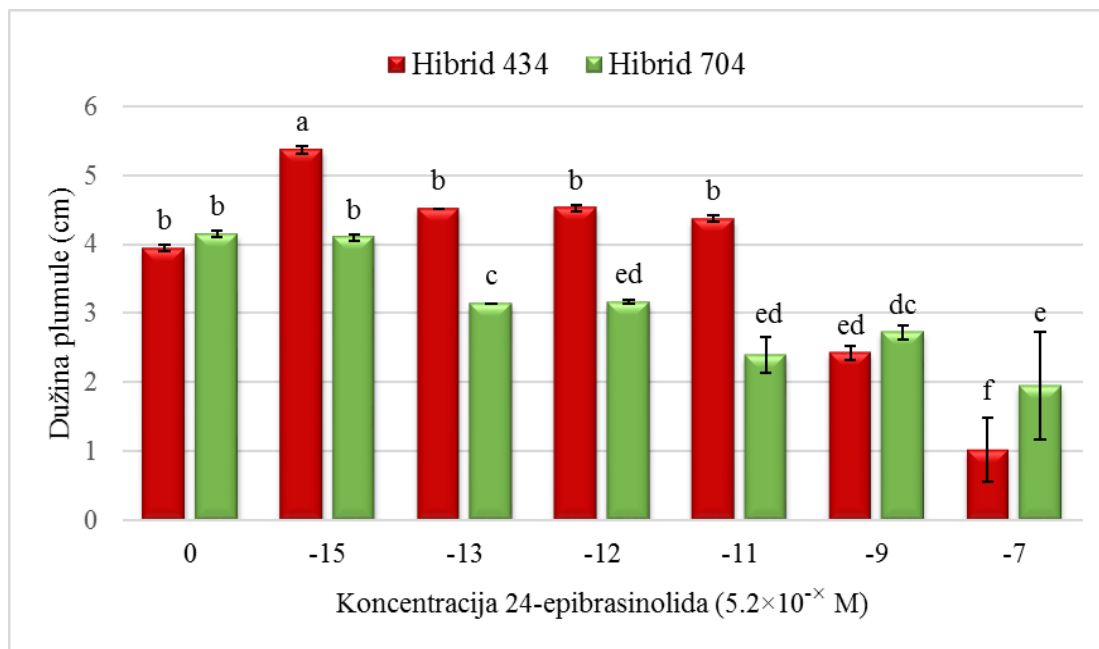
U ovom radu praćen je uticaj egzogeno dodatog 24-EBL-a na klijavost semena kukuruza hibrida ZP 434 i hibrida ZP 704. Na osnovu dobijenih rezultata (Slika11) može se uočiti da različite koncentracije 24-EBL-a imaju različit uticaj na klijavost semena hibrida ZP 704 i ZP 434. Najveći efekat se uočava pri najvišim koncentracijama gde klijavost iznosi 86% za ZP 434 i 72% za ZP 704, za razliku od kontrolnih uzoraka čija klijavost iznosi skoro 100%. Posmatrajući razlike u uticaju različitih koncentracija na klijavost, primećuju se male varijacije na svim ispitivanim koncentracijama osim na najvišoj koncentraciji (5.2×10^{-7} M), gde dolazi do najvećeg pada klijavosti za hibrid ZP 704 u poređenju sa kontrolom. Kod hibrida ZP 434, najveći uticaj je takođe zapažen pri koncentraciji 24-EBL-a od 5.2×10^{-7} sa statistički najznačajnijim razlikama u odnosu na kontrolu. Posmatrajući razliku između hibrida može se uočiti da hibrid ZP 704 pokazuje veću osetljivost od hibrida ZP 434 kao i da hibrid ZP 434 postiže klijavost blizu 100% pri dejstvu svih koncentracija 24-EBL-a dok hibrid ZP704 pokazuje takav trend jedino pri najnižoj ispitivanoj koncentraciji 24-EBL-a.



Slika 11. Efekat različitih koncentracija 24-EBL-a na klijavost hibrida ZP 434 i ZP 704. Vrednosti praćene istim slovom nisu statistički značajno različite ($P < 0.05$) prema Takijevom (Tukey's) HSD testu.

4.2 Uticaj 24-EBL-a na rastenje i akumulaciju biomase

Posmatrajući hibrid ZP 434, sve koncentracije 24-EBL-a, osim najviših (5.2×10^{-7} i 5.2×10^{-9}) M su uticale na izduživanje dužine plumule u odnosu na kontrolu. Na osnovu dobijenih rezultata (Slika 12), može se zaključiti da je hibrid ZP 704 imao vrednosti dužine plumule bliske kontrolnim uzorcima samo pri najnižoj koncentraciji 24-EBL-a od 5.2×10^{-15} M, dok su sve ostale koncentracije imale statistički značajan inhibitorski efekat na dužinu plumule. Za hibrid ZP 434, najviše vrednosti su dobijene pri niskim koncentracijama 24-EBL-a. Kod hibrida ZP 434 statistički značajne razlike u dužini plumule su bile samo pri koncentracijama 24-EBL-a od 5.2×10^{-7} , 5.2×10^{-9} i 5.2×10^{-15} , dok je hibrid ZP 704 ispoljio veću osetljivost na različite koncentracije 24-EBL-a, sa više statistički značajnih različitosti. Klijanje semena i izduživanje klijanaca su direktno zavisni od sinergističkog efekta brasinosteroida i giberelina (Matusmoto *et al.*, 2016 and Tanaka *et al.*, 2003) kao i uticaja giberelina na ekspresiju gena (Gupta and Chakrabarty, 2013; Li and He, 2013) i aktivnost α -amilaze, jednog od ključnih enzima u degradaciji rezervi skroba (Yamaguchi *et al.*, 2013).



Slika 12. Efekat različitih koncentracija 24-EBL-a na dužinu plumule klijanaca hibrida ZP 434 i ZP 704. Vrednosti praćene istim slovom nisu statistički značajno različite ($P < 0.05$) prema Takijevom (Tukey's) HSD testu

Prema rezultatima prikazanim u Tabeli 6, hibrid ZP 434 se odlikuje višim vrednostima mase plumule i radikule u odnosu na hibrid ZP 704. Mase klijanaca koje su bile blizu vrednosti kontrole su ostvarene pri koncentraciji 24-EBL-a od 5.2×10^{-13} i 5.2×10^{-12} M za hibrid ZP 434, dok su težine značajno odstupale pri svim ostalim koncentracijama hormona.

Tabela 6. Efekat različitih koncentracija 24-EBL-a na svežu masu (g g^{-1}) plumule i radikule klijanaca hibrida ZP 434 i ZP 704

Koncentracija 24-EBL-a	Relativna sveža masa plumule (g g^{-1})		Relativna sveža masa radikule (g g^{-1})	
	ZP 434	ZP 704	ZP 434	ZP 704
Kontrola	0.0449 ^{cb}	0.0419 ^{dc}	0.0518 ^{dc}	0.0482 ^{fed}
5.2×10^{-15}	0.04771 ^{ba}	0.0375 ^{ed}	0.0548 ^{ab}	0.0456 ^{gf}
5.2×10^{-13}	0.04473 ^{cb}	0.0336 ^{hgfe}	0.0529 ^{cb}	0.0486 ^{fedc}
5.2×10^{-12}	0.04573 ^{cb}	0.0347 ^{gfe}	0.0531 ^{cb}	0.0491 ^{edc}
5.2×10^{-11}	0.04125 ^{dc}	0.0283 ⁱ	0.0575 ^a	0.0451 ^{gf}
5.2×10^{-9}	0.0343 ^{gfe}	0.0317 ^{ihgf}	0.0459 ^{gf}	0.0454 ^{gf}
5.2×10^{-7}	0.0293 ^{ihg}	0.0286 ^{ih}	0.0367 ⁱ	0.0394 ^{ih}

Vrednosti praćene istim slovom nisu statistički značajno različite ($P < 0.05$) prema Takijevom (Tukey's) HSD testu

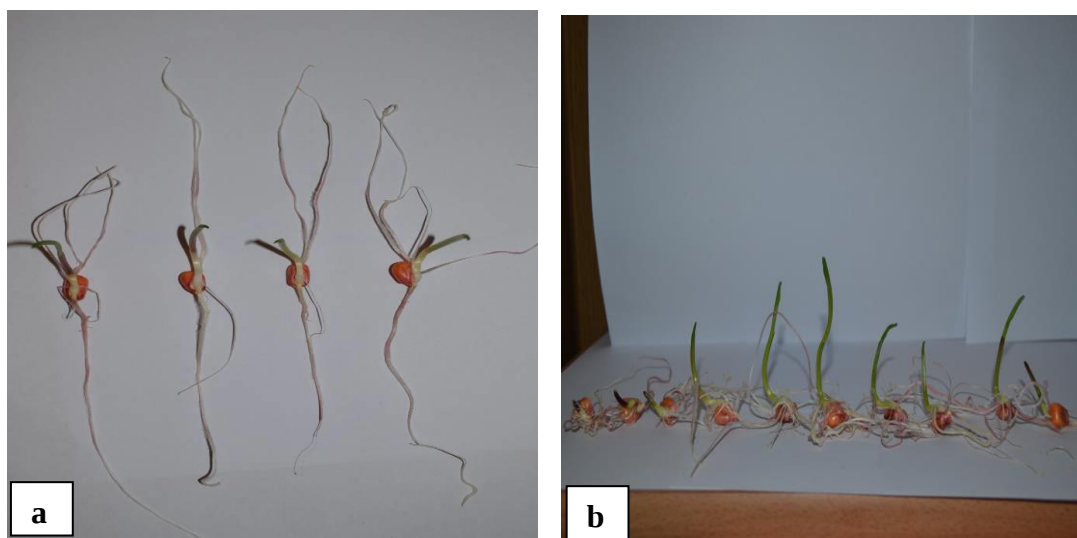
Takođe, za hibrid ZP 434 se može zaključiti i da su niže koncentracije 24-EBL-a (5.2×10^{-15} , 5.2×10^{-13} i 5.2×10^{-12}) imale stimulatorni efekat na biomasu plumule, dok je stimulatorni efekat kod radikule prisutan kako pri niskim, tako i pri višim koncentracijama 24-EBL-a (5.2×10^{-15}). Hibridi ZP 434 i ZP 704 su različito reagovali u odnosu na koncentracije prisutnog 24-EBL-a, klijanac hibrida ZP 434 je u prisustvu nižih koncentracija hormona, u odnosu na kontrolne uzorke, imao veću masu i plumule (5.2×10^{-15} i 5.2×10^{-12}) i radikule (5.2×10^{-15} , 5.2×10^{-13} , 5.2×10^{-12} , 5.2×10^{-11} , dok je suprotno tome, hibrid ZP 704 imao uvećanu masu radikule pri koncentracijama 24-EBL-a od 5.2×10^{-13} i 5.2×10^{-12} .

Poznato je da brasinosteroidi i auksini deluju sinergistički kada je u pitanju ćelijsko izduživanje (Zhang *et al.*, 2009) i upravo izduživanje i povećanje mase

klijanaca može biti povezano sa genima indukovanim brasinosteroidima za koje se zna da su rani auksinski geni (Li and Chory, 1999; Darley *et al.*, 2001).

Dokazano je da brasinosteroidi, ako se egzogeno dodaju biljci, mogu inhibirati rastenje korena i lateralnih korenskih formacija (Clouse and Sasse 1998; Clouse 2011), što je u skladu sa rezultatima dobijenim pri višim koncentracijama 24-EBL-a. Može se pretpostaviti da najveći uticaj na početne faze razvoja klijanaca imaju ukršteni signalni putevi brasinosteroida i ostalih esencijalnih fitohormona i da niske koncentracije 24-EBL-a, utičući na ekspresiju gena zajedno sa auksinima i giberelinima deluju na izduživanje klijanaca, dok njegove visoke koncentracije verovatno utiču na favorizovanje jasmonata i aktivaciju DELLA proteina, negativnih regulatora giberelina (Gallego-Bartolomé *et al.*, 2012).

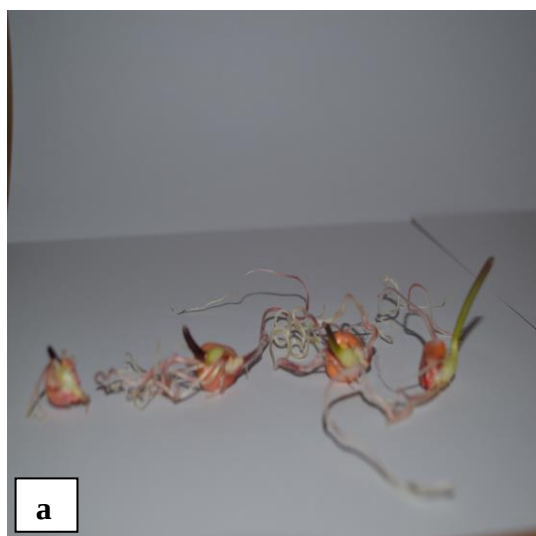
Slike 13., 14 i 15 prikazuju izgled klijanaca različitih hibrida kukuruza. Kao što se može videti na slikama, klijanci različito reaguju pri različitim koncentracijama 24-EBL-a, kako po pitanju plumule, tako i radikule.



Slika 13. Spoljašnji izgled klijanaca hibrida kukuruza ZP 434 tretiranih različitim koncentracijama 24-EBL-a ((a) predstavlja uticaj niskih koncentracija 24-EBL-a na klijance u poređenju sa kontrolnim uzorkom (s leva na desno), (b) predstavlja klijance tretirane svim ispitivanim koncentracijama 24-EBL-a (s leva na desno, od više ka nižoj koncentraciji))



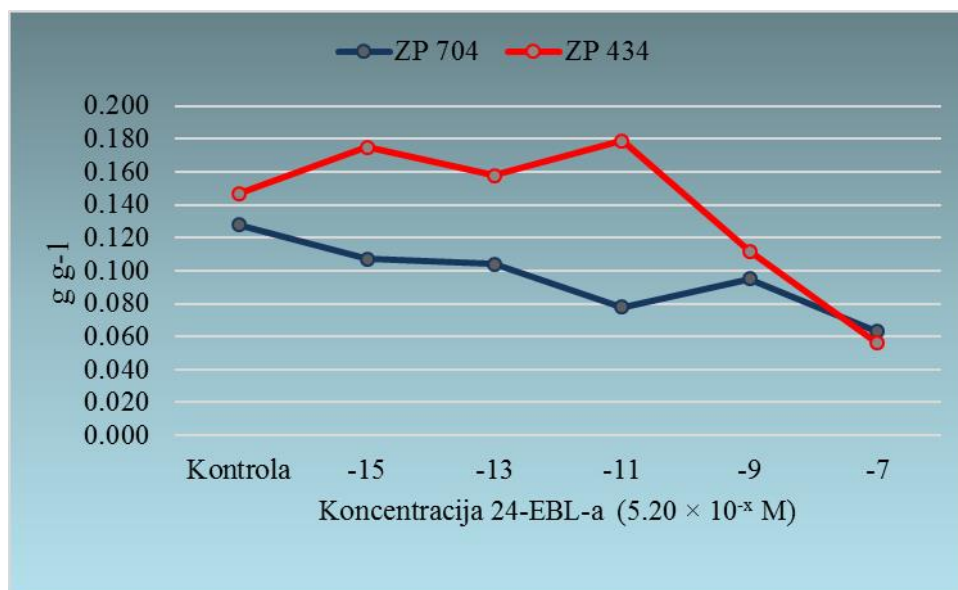
Slika 14. Spoljašnji izgled klijanaca hibrida kukuruza ZP 704 tretiranih različitim koncentracijama 24-EBL-a ((a) predstavlja uticaj niskih koncentracija 24-EBL-a na klijance u poređenju sa kontrolnim uzorkom (s leva na desno), (b) predstavlja klijance tretirane svim ispitivanim koncentracijama 24-EBL-a (s leva na desno, od više ka nižoj koncentraciji))



Slika 15. Spoljašnji izgled klijanaca hibrida kukuruza ZP 704 (a) i hibrida ZP 434 (b) tretiranih visokim koncentracijama 24-EBL-a

4.3 Uticaj 24-EBL-a na Vigor indeks II klijanaca kukuruza

Bitne ciljeve moderne poljoprivrede predstavljaju minimalna ulaganja i primena agrotehničkih mera, uz simultano povećanje prinosa (Holá *et al.* 2010 and Richards *et al.* 2000).



Slika 16. Efekat različitih koncentracija 24-EBL-a na Vigor indeks II (g g⁻¹) klijanaca hibrida ZP 434 i ZP 704

Hibrid ZP 434 je imao veće vrednosti SVI-II pri nižim koncentracijama 24-EBL-a u poređenju sa kontrolnim uzorcima, dok je hibrid ZP 704 imao niže vrednosti SVI-II na svim koncentracijama, u poređenju sa kontrolnim uzorcima. Ovi rezultati potvrđuju pretpostavku da bi niže koncentracije 24-EBL-a mogle unaprediti vigor klijanaca i inicijalne faze rastanja i razvića klijanaca kukuruza koji imaju smanjen vigor. Iz literature je poznato da klijanci sa uvećanom biomasom u ranim stadijumima razvića, dužom plumulom i radikulom i visokim procentom klijavosti mogu biti identifikovani kao klijanci koji će se u budućnosti razviti u otpornije biljke sa višim rastom (Mondo *et al.* 2013).

Posmatrajući SVI-II (Slika 16), a imajući u vidu literaturne podatke gde je primećeno da brasinosteroidi mogu povećati razviće i prinos kod žitarica (Mitchell and Gregory, 1972), može se pretpostaviti da bi klijanci hibrida ZP 434, tretiranih niskim koncentracijama 24-EBL-a imali veće šanse za preživljavanje i toleranciju različitih negativnih uticaja životne sredine.

4.4 Uticaj 24-EBL-a na fotosintetičke pigmente

Na osnovu rezultata (Tabela 7), uočava se da postoji statistički značajna razlika između kontrolne grupe biljaka i biljaka tretiranih 24-EBL-om. Sve koncentracije 24-EBL-a dovode do smanjenja količine ukupnih hlorofila.

Tabela 7. Efekat različitih koncentracija 24-EBL-a na hlorofil a, hlorofil b i ukupne karotenoide (mg kg⁻¹) plumule klijanaca hibrida ZP 434

Koncentracija 24-EBL-a	Chl a	Chl b	Chl a/Chl b	Ukupni chl	Ukupni Car
Kontrola	1903 ^a ± 31	3513 ^a ± 35	0.54	5416	2516 ^d ± 6
-15	1687 ^b ± 6	3267 ^b ± 15	0.52	4954	3323 ^a ± 15
-12	1503 ^c ± 38	2737 ^c ± 12	0.55	4240	2826 ^b ± 29
-9	1357 ^d ± 40	2517 ^d ± 21	0.54	3874	2680 ^c ± 10

Vrednosti praćene istim slovom nisu statistički značajno različite (P<0.05) prema Takijevom (Tukey's) HSD testu

Niske vrednosti odnosa fotosintetičkih pigmenata, posmatrajući oba hibrida kukuruza (Tabela 7 i Tabela 8), ukazuju na slabu aktivnost fotosintetičkog aparata kod plumule, što i nije iznenađujuće za rane stadijume rastenja i razvića klijanaca (Babani and Lichtenthaler, 1996). Međutim, ovi podaci pokazuju i da većina asimilata kao što su šećeri, neophodnih za rastenje plumule i radikule, u ranim stadijumima razvića klijanaca, dolazi iz semena (Thomas and Rodriguez 1994).

Tabela 8. Efekat različitih koncentracija 24-EBL-a na hlorofil a, hlorofil b i ukupne karotenoide (mg kg⁻¹) plumule klijanaca hibrida ZP 434

Koncentracija	Chl a	Chl b	Chl a/Chl b	Ukupni chl	Ukupni Car
Kontrola	1817 ^a ± 71	2350 ^a ± 70	0.77	4167	1187 ^b ± 6
-15	1407 ^a ± 49	2203 ^{ab} ± 55	0.64	3610	2363 ^a ± 59
-12	1377 ^a ± 15	2190 ^b ± 44	0.63	3567	2363 ^a ± 49
-9	1300 ^b ± 20	2237 ^{ab} ± 67	0.58	2537	2283 ^a ± 15

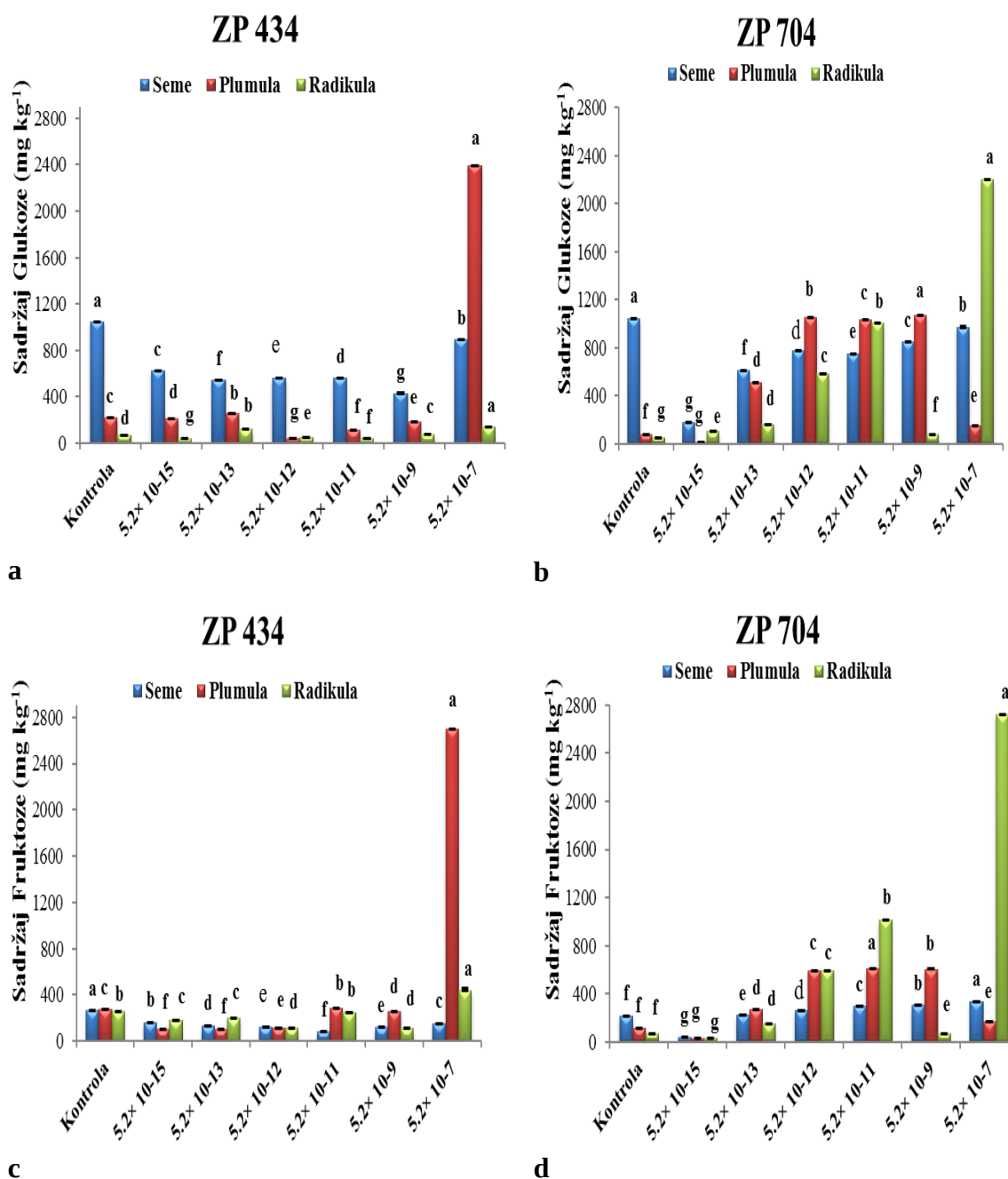
Vrednosti praćene istim slovom nisu statistički značajno različite (P<0.05) prema Takijevom (Tukey's) HSD test

4.5 Uticaj 24-EBL-a na sadržaj šećera u delovima klijanca

U uzorcima semena, plumule i radikule oba hibrida (ZP 434 i ZP 704) identifikovano i kvantifikovano je šesnaest šećera za ceo koncentracioni opseg 24-EBL-a, kao i u kontrolnim uzorcima koji nisu tretirani 24-EBL-om. Određeno je 7 monosaharida, 5 disaharida, 4 trisaharida i dva šećerna alkohola. Praćen je uticaj različitih koncentracija 24-EBL-a na sadržaj šećera u različitim delovima klijanaca hibrida ZP 704 i hibrida 434. Na osnovu dobijenih rezultata, posmatrajući sve delove klijanca, uočavaju se razlike u sadržaju svih šećera između dva posmatrana hibrida. Kod hibrida ZP 704, posmatrajući radikulu, uočava se linearan rast sadržaja glukoze, od kontrole ka višim koncentracijama, sve do koncentracije 24-EBL-a od 5.2×10^{-11} , kada dolazi do naglog pada u sadržaju glukoze. Pri najvišoj koncentraciji 24-EBL-a može se uočiti najveći sadržaj glukoze u radikuli. Plumula sadrži, kada je u pitanju hibrid ZP 704, približno istu koncentraciju glukoze pri koncentracijama 24-EBL-a od 5.2×10^{-13} do 5.2×10^{-8} , dok na najvećoj koncentraciji dolazi do značajnog pada sadržaja glukoze.

Fruktoza je jedan od gradivnih elemenata saharoze, glavnog transportnog i jednog od glavnih metaboličkih šećera, i nema posebnog značaja u procesima klijanja semena žitarica (Lewis *et al.*, 2000). Hibridi različito reaguju na najveću koncentraciju 24-EBL-a, kada je u pitanju sadržaj glukoze i fruktoze u plumuli i radikuli. Količina glukoze i fruktoze je znatno veća u radikuli hibrida ZP 704 pri najvišoj koncentraciji, dok je situacija obrnuta u slučaju hibrida ZP 434.

Glukoza ne samo da predstavlja primarni supstrat u disanju (Noctor and Foyer, 1998), već je i osnovni monomer pri sintezi skroba (Komor, 2000; Geiger *et al.*, 2000) i saharoze (Komor, 2000), a njena transformacija u fruktozu i obratno putem različitih formi enzima invertaze (Ribaut, 2006) predstavlja osnovnu determinantu preraspodele asimilata između biljnih organa. Nađeno je i da (Slika 17) kod klijanaca hibrida ZP 434 sadržaj glukoze raste u radikulama tretiranim 24-EBL koncentracija 5.2×10^{-12} i 5.2×10^{-15} M, u odnosu na kontrolne uzorke, dok je kod semenskog ostatka (RoS) situacija obrnuta.



Slika 17. Uticaj 24-EBL-a od (a) do (d) na sadržaj glukoze i fruktoze (X osa predstavlja koncentracioni gradijent 24-EBL-a)

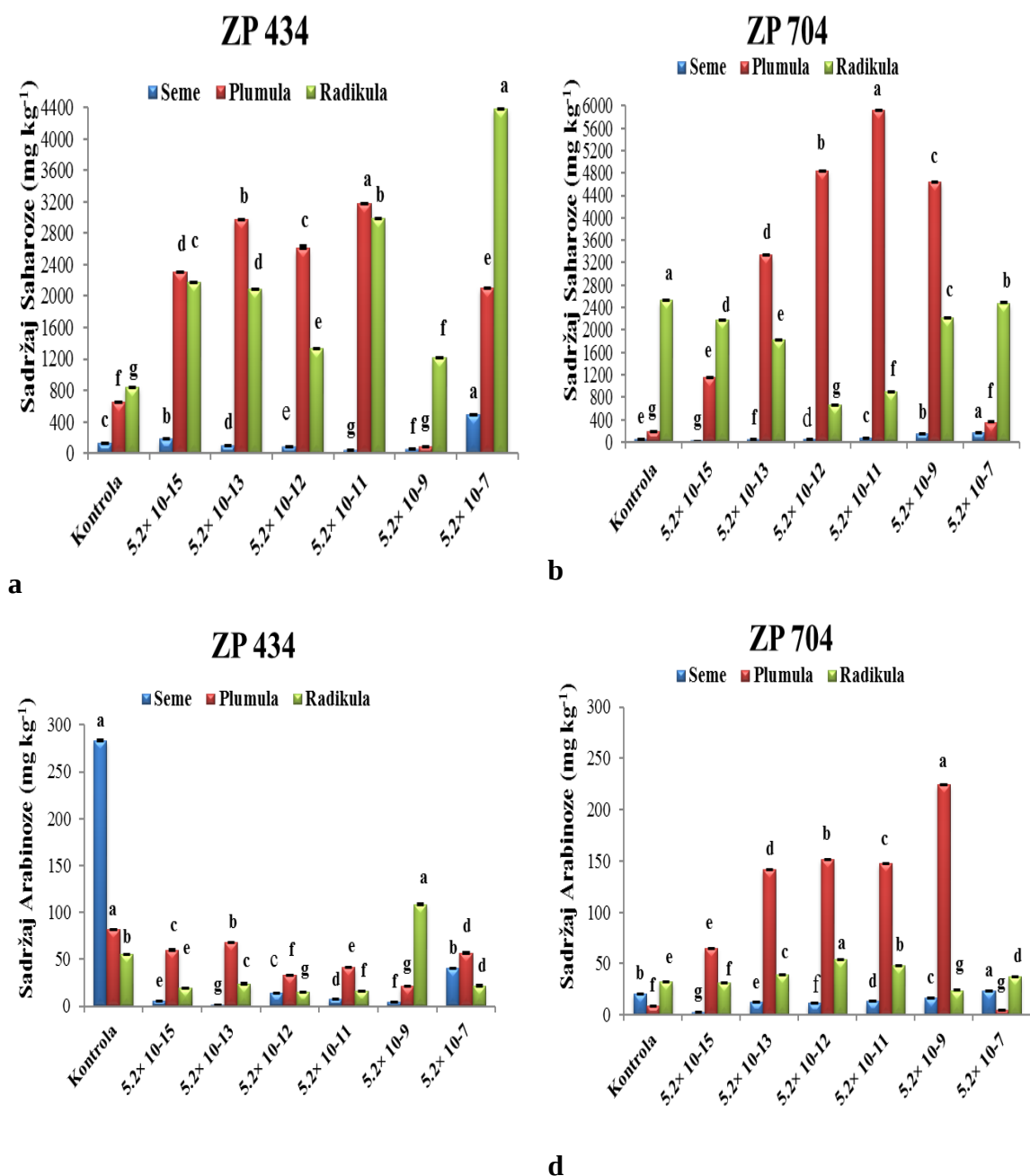
Saharoza je glavni transportni šećer u floemu velike većine viših biljaka (Giaquinta, 1983; Komor, 2000), kao i jedan od privremenih skladišnih šećera u vakuoli ćelije, ali se njena sinteza odvija u citosolu mezofila lista (Hellmann *et al.*, 2000). Posmatrajući sadržaj saharoze (Slika 18), može se zaključiti da je sadržaj iste veći i u plumuli i u radikuli u odnosu na RoS, što ukazuje na korišćenje saharoze pri izduživanju delova klijanaca oba hibrida. Najviše koncentracije saharoze su uočene pri

koncentracijama 24-EBL-a od 5.2×10^{-13} do 5.2×10^{-9} , posmatrajući plumulu hibrida ZP 704, dok radikula istog hibrida ima visok sadržaj saharoze pri svim koncentracijama osim 5.2×10^{-7} M i kontrolnim uzorcima. Posmatrajući hibrid ZP 434, dolazi do naglog pada sadržaja saharoze u plumuli, kada su u pitanju egzogeno dodate koncentracije 24-EBL-a od 5.2×10^{-9} do 5.2×10^{-7} M.

Analizom sadržaja disaharida u uzorcima oba ispitivana hibrida, zapaža se da je saharoza prisutna u najvećoj koncentraciji, što objašnjava i visok sadržaj molekula glukoze i fruktoze (monosaharida koji grade molekul saharoze) u ovim uzorcima, dok je najmanje zastupljen disaharid melibioza (Slika 24). Sadržaj arabinoze u uzorcima plumule hibrida ZP 704 tretiranih koncentracijom 24-EBL-a od 5.2×10^{-9} do 5.2×10^{-15} M je veći u odnosu na kontrolni uzorak. Arabinoza ulazi u sastav biopolimera hemiceluloze i pektina, koji učestvuju u izgradnji ćelijskog zida biljaka. Povećan sadržaj ovog šećera u pomenutim uzorcima utiče na bolji rast biljke.

U slučaju hibrida ZP434 arabinoza je zastupljena u najvećoj koncentraciji u kontrolnom uzorku ostatka semena dok se u plumuli i radikuli gubi (osim u slučaju uzoraka tretiranih sa koncentracijom 24-EBL-a od 5.2×10^{-9}), ukazujući na činjenicu da 24-EBL ima inhibitorno dejstvo na sadržaj arabinoze u hibridu ZP 434.

Povećavanjem koncentracije 24-EBL-a, dolazi i do povećanja sadržaja arabinoze u plumulama hibrida ZP 704, dok je slučaj obrnut kod hibrida ZP 434, sve do koncentracije 24-EBL-a od 5.2×10^{-9} M. Pri najvišim koncentracijama 24-EBL-a, može se zapaziti da je sadržaj arabinoze veoma nizak u plumulama hibrida ZP 704, dok to nije slučaj za hibrid ZP 434. Takođe, zapaža se i da je najveći sadržaj arabinoze u RoS kod hibrida ZP434, dok kod hibrida ZP 704 to nije slučaj.



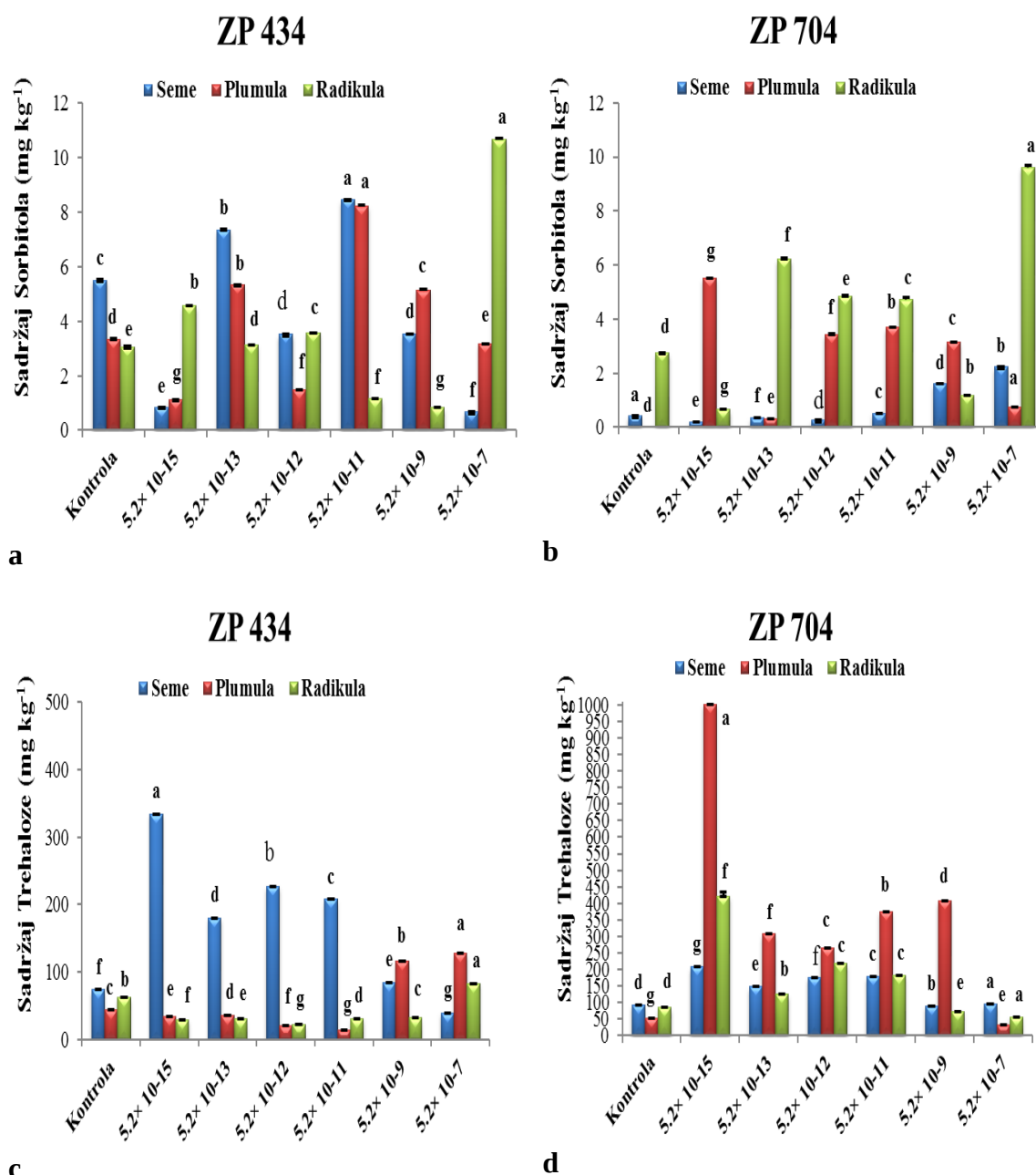
Slika 18. Uticaj 24-EBL-a od (a) do (d) na sadržaj sahara i arabinoze (X osa predstavlja koncentracioni gradijent 24-EBL-a).

Zapaža se da tretman klijanaca hibrida ZP 704 različitim koncentracijama 24-EBL-a ima vrlo neravnomeran uticaj na sadržaj sorbitola u plumulama i radikulama tih klijanaca, dok je sadržaj tog šećernog alkohola veoma nizak u ostatku semena tih klijanaca (Slika 19). Nasuprot tome, tretman klijanaca ZP 434 različitim koncentracijama 24-EBL, osim tretmana najvišom (5.2×10^{-7} M) i najnižom (5.2×10^{-15}

M) koncentracijom 24-EBL dovodi do značajne akumulacije sorbitola u ostatku semena i plumulama klijanaca ovog hibrida, dok tretmani 24-EBL-om koncentracija 5.2×10^{-11} i 5.2×10^{-9} M deluju supresivno na sadržaj ovog šećernog alkohola u radikulama ZP 434 (Slika 19).

Uočeno je da da tretman klijanaca ZP 704 24-EBL-om nižih primenjenih koncentracija (od 5.2×10^{-15} do 5.2×10^{-11} M) uvećava sadržaj trehaloze u ostatku semena, odnosno kontrolnih uzoraka, pri čemu je sadržaj tog šećera u uzorcima tretiranim najvišim koncentracijama 24-EBL (5.2×10^{-9} i 5.2×10^{-7} M) približno isti onom kod kontrolnih klijanaca (Slika 19). Sličan trend promene sadržaja trehaloze pod uticajem 24-EBL se zapaža i u ostatku semena klijanaca ZP 434 (Slika 19).

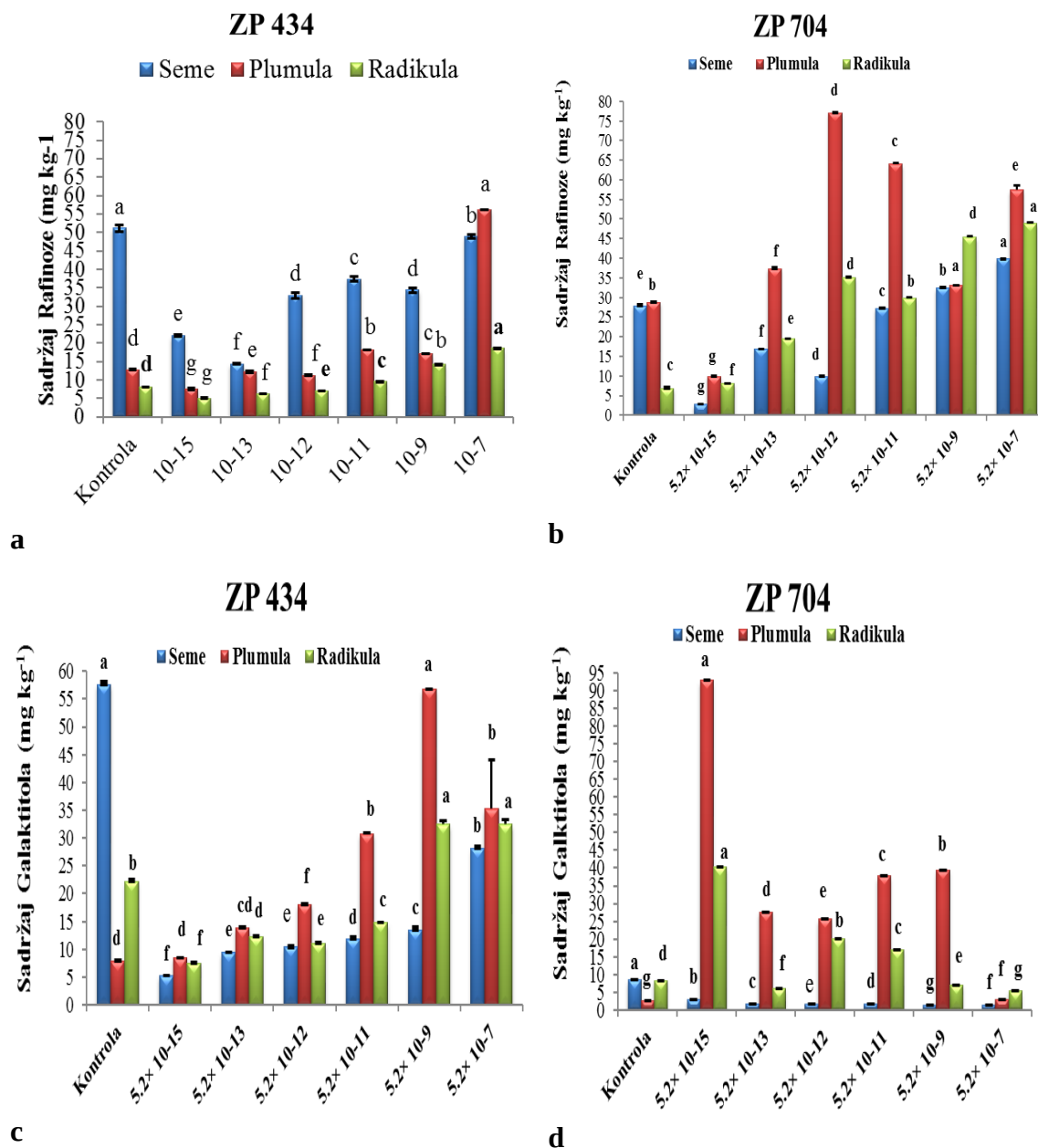
Pri tretmanu 24-EBL-om klijanaca hibrida ZP 704, zapažamo da je sadržaj ovog protektivnog šećera u plumuli i radikuli ovih klinanaca veći u odnosu na kontrolu, sve do tretmana visokim koncentracijama (5.2×10^{-9} i 5.2×10^{-7} M) 24-EBL-a, gde je sadržaj trehaloze bio približno sličan kontroli. To nije bio slučaj kod plumula i radikula klijanaca ZP 434, jer je sve do tretmana 24-EBL-om visokih koncentracija (5.2×10^{-9} i 5.2×10^{-7} M) sadržaj trehaloze niži od kontrole, tj. situacija je obrnuta u odnosu na klijanace hibrida ZP 704 (Slika 19).



Slika 19. Uticaj 24-EBL-a od (a) do (d) na sadržaj sorbitola i trehaloze. (X osa predstavlja koncentracioni gradijent 24-EBL-a)

Primećeno je (Slika 20) da najviše galaktitola ima u plumuli hibrida ZP 704, tretiranog nižim koncentracijama 24-EBL-a, dok je kod hibrida ZP 434 potpuno obrnuta situacija. Kod hibrida ZP 434, zapaža se linearan rast sadržaja galaktitola kada sa povećanjem koncentracije 24-EBL-a, kada je u pitanju radikula. Zapažamo da je sadržaj rafinoze u plumulama i radikulama oba hibrida tretiranih 24-EBL-om, počev od koncentracije od 5.2×10^{-13} M, pa ka višim, generalno gledano viši u odnosu na sadržaj

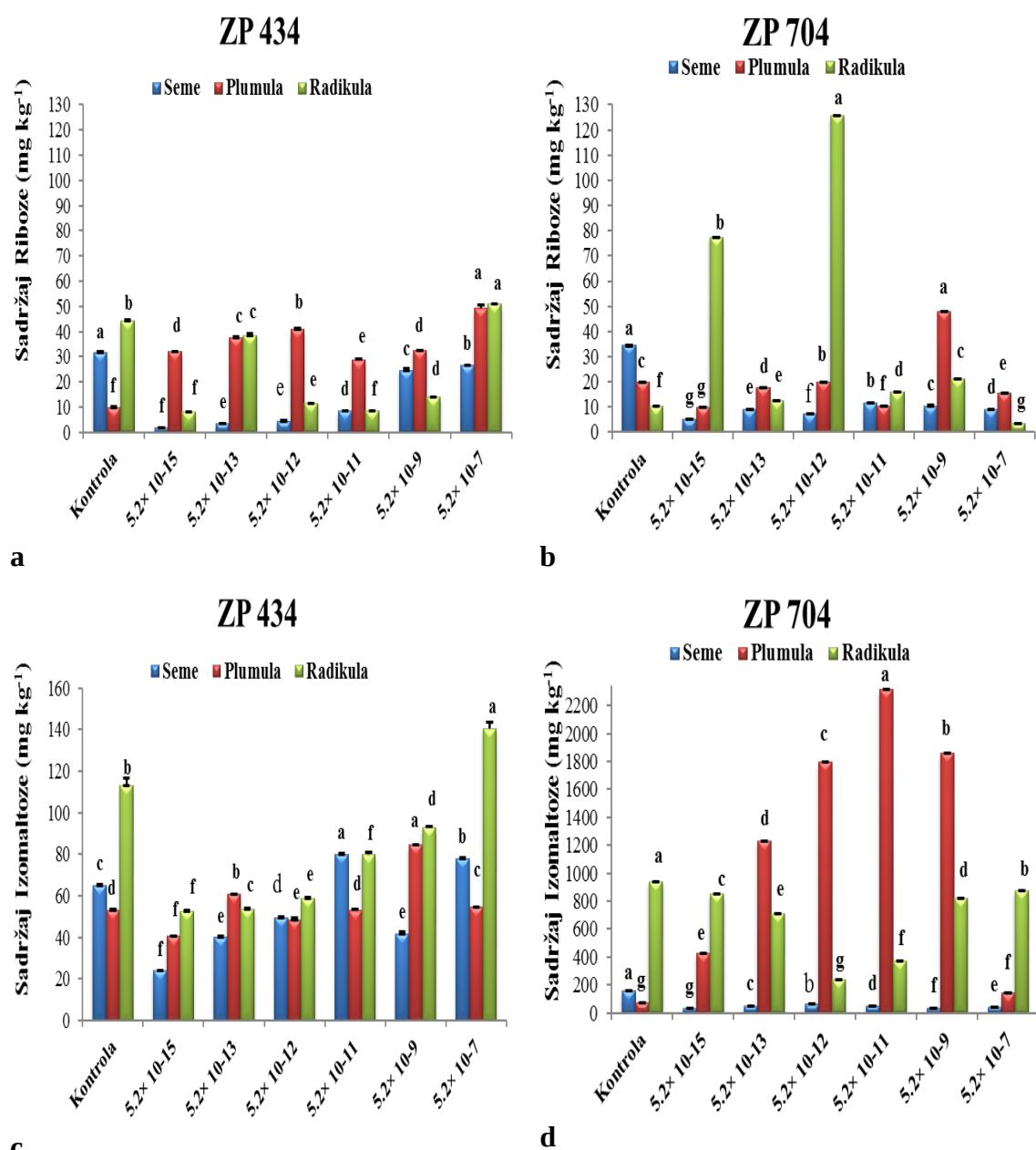
tog šećera u istim organima kontrolnih klijanaca, dok se taj efekat na sadržaj rafinoze u ostatku semena oba hibrida primećuje tek pri tretmanu najvišim koncentracijama (5.2×10^{-9} i 5.2×10^{-7} M) 24-EBL-a.



Slika 20. Uticaj 24-EBL-a od (a) do (d) na sadržaj rafinoze i galaktitola. (X osa predstavlja koncentracioni gradijent 24-EBL-a)

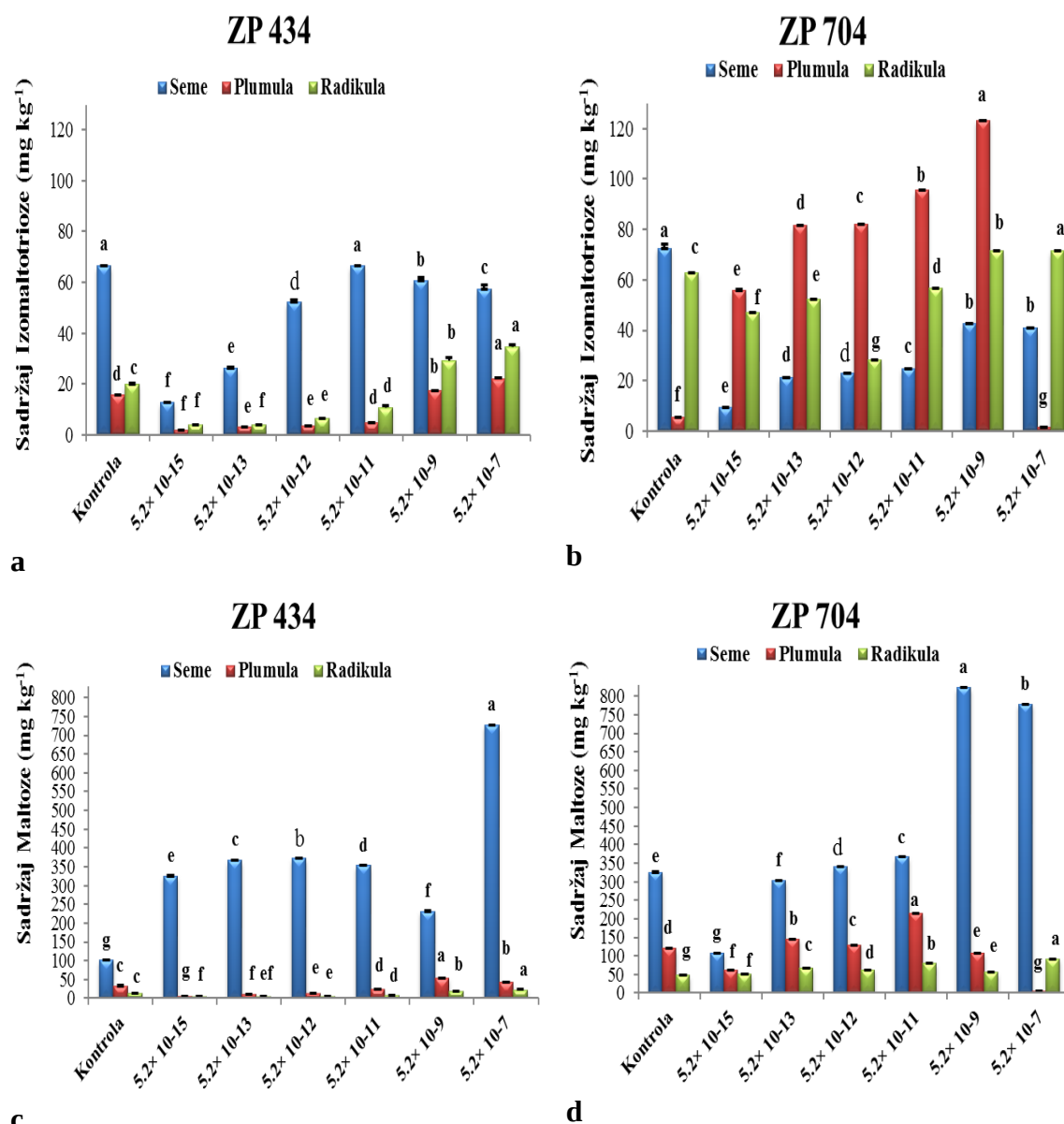
Na osnovu Slike 21 se uočava da je koncentracija riboze znatno veća kod klijanaca hibrida ZP 434 nego kod hibrida ZP 704. Kod hibrida ZP 434 na visokim

koncentracijama 24-EBI-a dolazi do značajnog povećanja koncentracije riboze. Količina riboze je kod oba ispitivana hibrida najmanja u ostatku semena. Kod hibrida ZP 704 uočava se da povećanjem koncentracije 24-EBL-a, od kontrole do 5.2×10^{-11} dolazi do linearnog povećanja koncentracije izmaltoze u plumuli. Količina izomaltoze kod hibrida ZP 434 je značajno manja nego kod hibrida ZP 704. Maksimalan zabeležen sadržaj je oko 150 mg kg^{-1} u ostatku semena pri tretmanu od 5.2×10^{-8} , dok kod hibrida ZP 704 sadržaj iznosi i preko 2000 mg kg^{-1} .



Slika 21. Uticaj 24-EBL-a od (a) do (d) na sadržaj riboze i izomaltoze. (X osa predstavlja koncentracioni gradijent 24-EBL-a)

Najzastupljeniji trisaharid u uzorcima hibrida ZP 704 i semenu hibrida ZP 434 je izomaltotrioza (Slika 22), dok je u uzorcima plumule i radikule hibrida ZP434 najzastupljenija rafinoza (Slika 20). Kao i za druge ispitivane šećere i kod izomaltotrioze se uočava razlika u količini kod dva ispitivana hibrida. Kod hibrida ZP 434 se uočava znatno veća koncentracija ovog šećera u ostatku semena u odnosu na plumulu i radikulu. Kod hibrida ZP 704, u plumuli dolazi do linearnog rasta sadržaja šećera sa povećanom koncentracijom 24-EBL-a, dok je na najvišoj koncentraciji 24-EBL-a veoma niska količina ovog šećera.

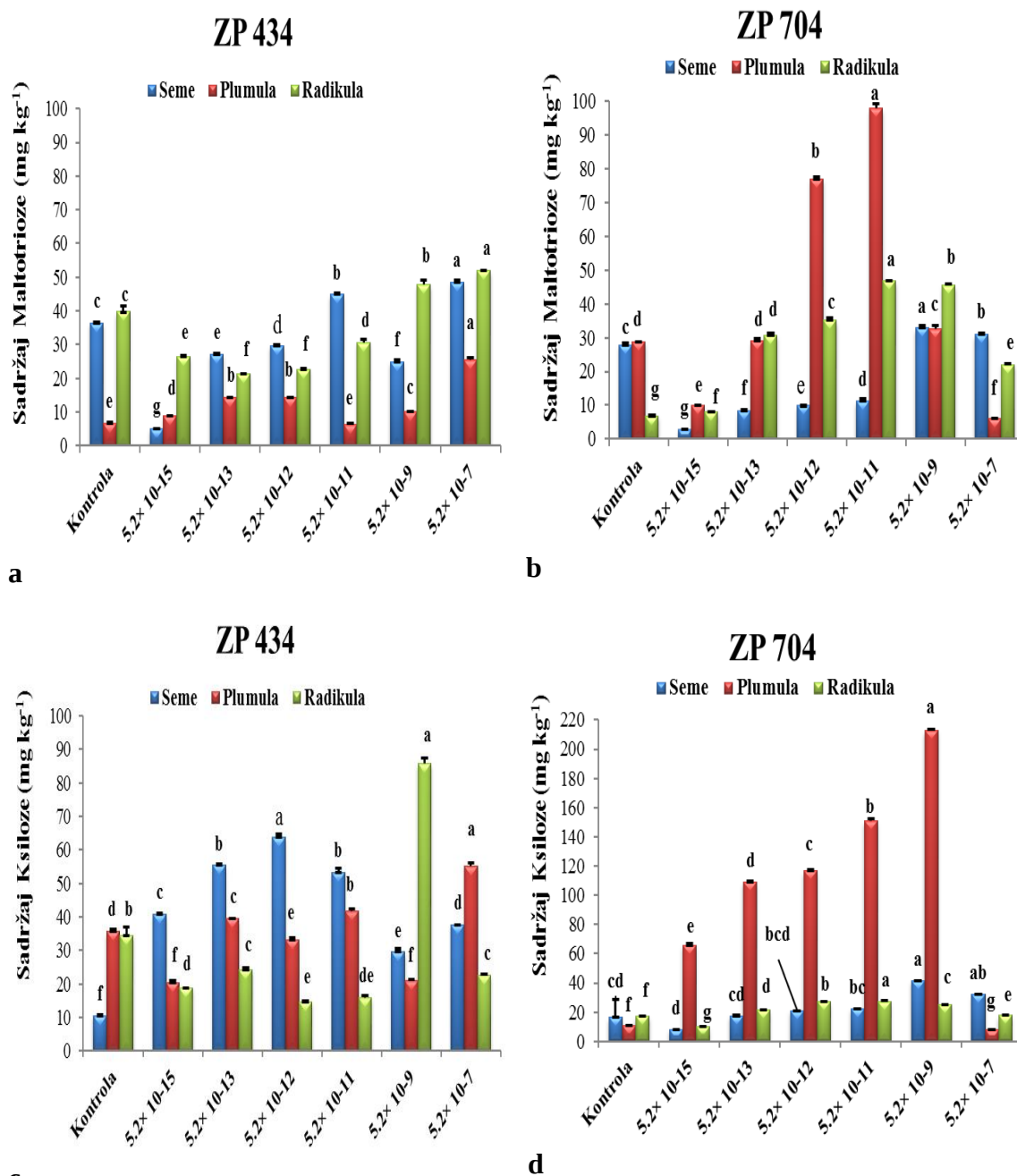


Slika 22. Uticaj 24-EBL-a od (a) do (d) na sadržaj izomaltotrioze i maltoze. (X osa predstavlja koncentracioni gradijent 24-EBL-a)

Maltoza se u ispitivanim uzorcima plumule i radikule nalazi u znatno manjim količinama u odnosu na RoS, posmatrajući oba ispitivana hibrida. Kod hibrida ZP 434, na najvišoj koncentraciji 24-EBL-a se uočava u ostatku semena najveća koncentracija ovog šećera. Pokazano je i da je na niskim koncentracijama 24-EBL-a od 5.2×10^{-15} do 5.2×10^{-11} M zabeležen nizak sadržaj maltoze u radikuli. Visok sadržaj u ostatku semena govori o značaju maltoze kao rezervnog šećera u semenu (Simpson and Naylor, 1962).

Pri analizi sadržaja šećera maltotrioze nalazimo da u plumulama klijanaca hibrida ZP 704 postoji neravnomeran uticaj tretmana 24-EBL-om različitih koncentracija, što je slučaj i kod plumula klijanaca ZP 434 (Slika 23). U slučaju radikula klijanaca ZP 704, počev od tretmana 24-EBL-om 5.2×10^{-13} M, pa ka višim koncentracijama, sadržaj ovog šećera je iznad sadržaja kod kontrolnih klijanaca, dok se takva pojava dešava kod radikula klijanaca ZP 434 tek pri najvišim koncentracijama 24-EBL (5.2×10^{-9} i 5.2×10^{-7} M), što važi i za slučaj sadržaja maltotrioze u ostatku semena (Slika 23).

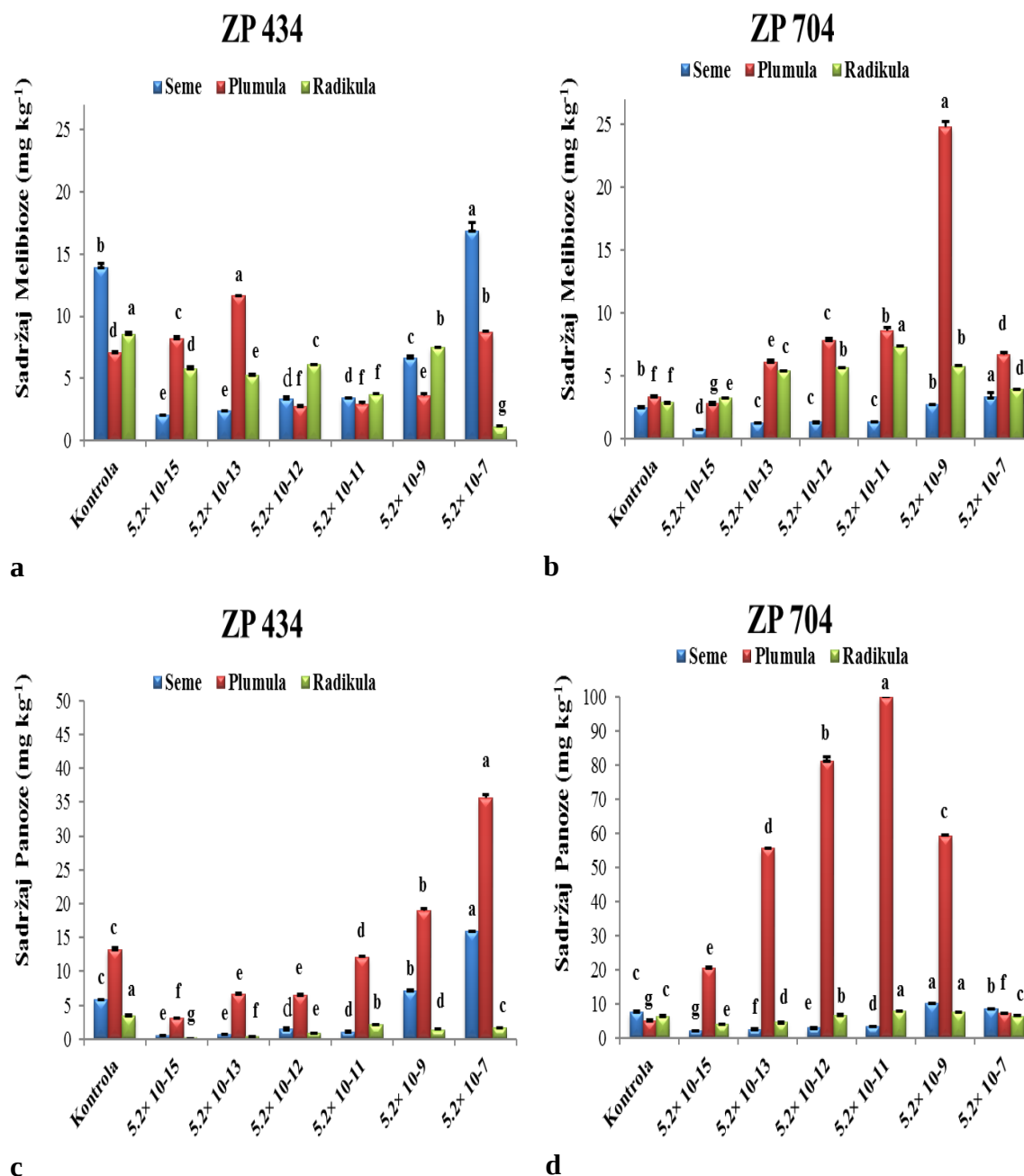
Kod hibrida ZP704, uočava se trend linearnog rasta sadržaja ksiloze, osim na najvišoj koncentraciji 24-EBL-a, gde dolazi do značajnog smanjenja sadržaja u plumuli. Kod radikule se za isti hibrid ne uočava značajna promena u sadržaju ovog šećera pri različitim koncentracijama 24-EBL-a. Takođe, uočeno je da na nižim koncentracijama 24-EBL-a ima najviše ksiloze u ostatku semena kod hibrida ZP 434, u odnosu na ostatak semena tretiranih višim koncentracijama 24-EBL-a.



Slika 23. Uticaj 24-EBL-a od (a) do (d) na sadržaj maltotrioze i ksiloze. (X osa predstavlja koncentracioni gradijent 24-EBL-a)

Najveći sadržaj melibioze je pronađen kod hibrida ZP 704, pri egzogeno dodatoj koncentraciji 24-EBL-a od 5.2×10^{-9} M. Sve koncentracije dodatog 24-EBL-a su imale značajan uticaj na sadržaj melibioze u svim delovima klijanca. Kada je u pitanju hibrid ZP 434, sve egzogeno dodate koncentracije 24-EBL-a su imale značajan uticaj na sadržaj melibioze u svim delovima klijanca. Posmatrajući hibrid ZP 434, najveći sadržaj

panoze može se uočiti pri najvišoj koncentraciji egzogeno dodatog 24-EBL-a. Takođe, primećuje se i da je sadržaj panoze znatno viši u plumuli hibrida ZP 704 u odnosu na ZP 434, posmatrajući sve koncentracije dodatog 24-EBL-a osim 5.2×10^{-9} M.

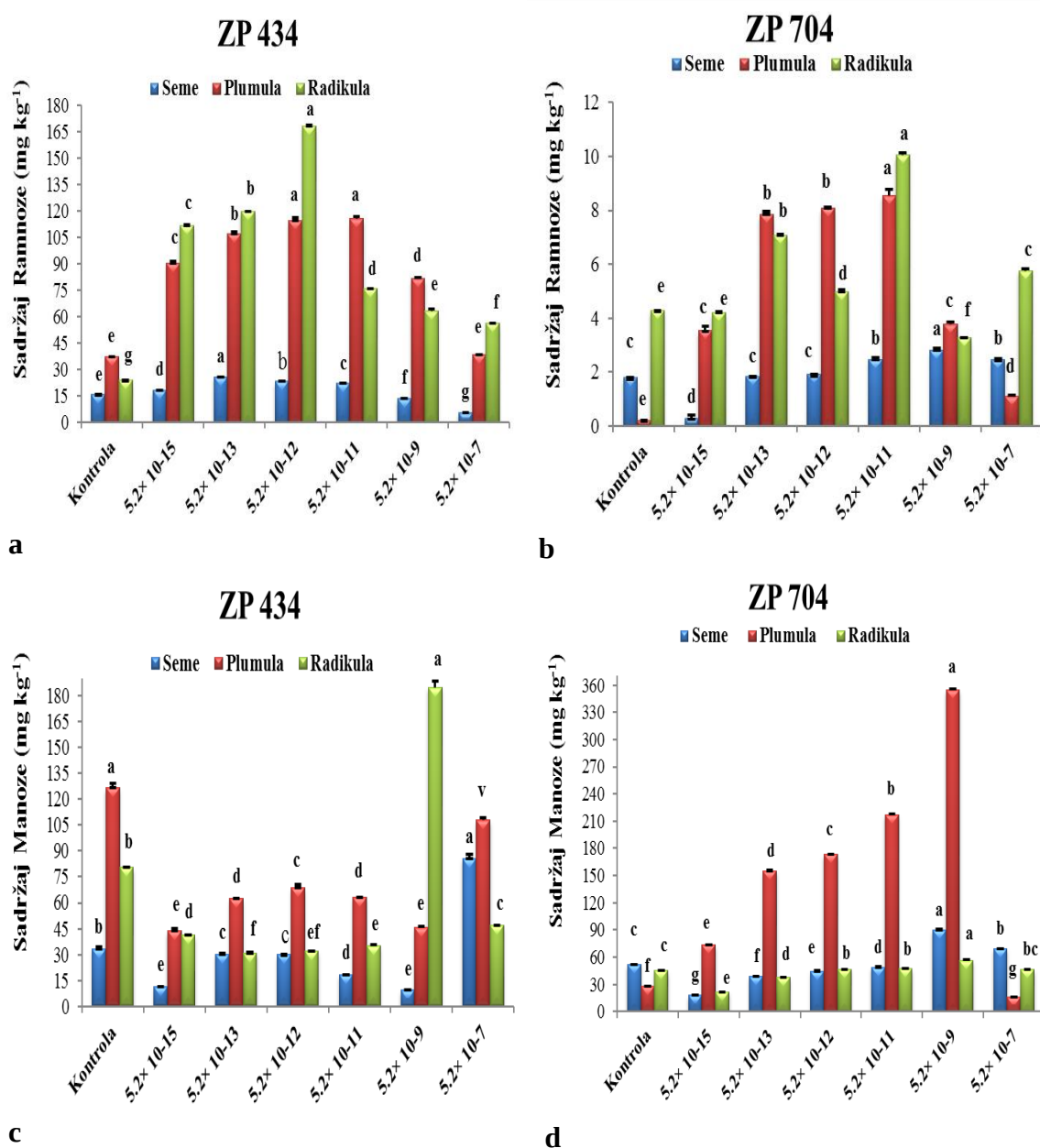


Slika 24. Uticaj 24-EBL-a od (a) do (d) na sadržaj melibioze i panoze. (X osa predstavlja koncentracioni gradijent 24-EBL-a)

Tretman klijanaca kukuruza 24-EBL-om, povišava sadržaj ramnoze u plumulama i radikulama hibrida ZP 704 (od 5.2×10^{-15} , pa do 5.2×10^{-11} M) i ZP 434

(od 5.2×10^{-15} , pa do 5.2×10^{-7} M) (Slika 25). Zapaža se i da je sadržaj ramnoze mnogo viši u delovima klijanaca hibrida ZP 434, nego kod hibrida ZP 704.

Manoza kod hibrida ZP 704 ima linearan rast sadržaja sa povećanjem koncentracije 24-EBL-a u plumuli, gde je i veća količina ovog šećera u odnosu na radikulu. Kod hibrida ZP 434 uočava se nagli porast sadržaja manoze u radikuli pri koncentracijama 24-EBL-a od 5.2×10^{-9} . Posmatrajući sadržaj ramnoze, uočava se znatno viši sadržaj ovog šećera u hibridu ZP 704 u odnosu na hibrid ZP 434.



Slika 25. Uticaj 24-EBL-a od (a) do (d) na sadržaj ramnoze i manoze. (X osa predstavlja koncentracioni gradijent 24-EBL-a)

4.6 Uticaj 24-EBL-a na sadržaj hemijskih elementa u delovima klijanaca

U slučaju hibrida ZP 704, može se zaključiti da sve koncentracije 24-EBL-a utiču na preraspodelu cinka i mangana. Klijanci kukuruza tretirani nižim koncentracijama 24-EBL-a, su imali smanjen sadržaj cinka u plumuli dok je u ostalim delovima klijanca sadržaj bio izjednačen. Ovo može biti jedan od razloga slabijeg rastenja klijanaca hibrida ZP 704 tretiranog različitim koncentracijama 24-EBL-a. Slučaj je obrnut kod hibrida ZP 434 pa bi se to moglo smatrati razlogom povećane biomase rastućih tkiva (Pearson and Rengel, 1994). Količine mangana u radikuli kontrolnih klijanaca i klijanaca tretiranih različitim koncentracijama 24-EBL-a su bile ujednačene, dok su ostali delovi klijanca bili podložniji uticaju fitohormona. Bakar ulazi u sastavni deo enzima citohrom oksidaze koja ima važnu ulogu u procesu ćelijskog disanja (Nešković *et al.*, 2010). Zapaženo je da je došlo do povećanja u produkciji biomase kod klijanaca *Brassica juncea*, u slučaju kada su semena bila pred tretirana različitim koncentracijama 24-EBL-a (5.2×10^{-7} , 5.2×10^{-9} , 5.2×10^{-11} M), i izložena povećanim koncentracijama bakra (Sharma and Bhardwaj 2007). U slučaju najniže ispitivane koncentracije 24-EBL-a (5.2×10^{-15}), (Tabela 9) očigledno je blokiranje distribucije bakra i ovi podaci bi mogli da znače da bi biljke kukuruza tretirane 24-EBL-om mogle da dostignu optimalan rast na području zagađenom bakrom. Iz literature je poznato da različite koncentracije 24-EBL-a mogu smanjiti toksični efekat kadmijuma (Hayat *et al.*, 2007). U slučaju klijanaca tretiranih najnižim koncentracijama 24-EBL-a, može se zaključiti da su hrom i nikl blokirani u semenu, dok je kadmijum delimično ograničen na seme, a delimično distribuiran u plumulu. Sličan inhibitorni efekat brasinosteroida na usvajanje nikla je takođe primećen i opisan u literaturi (Sharma *et al.*, 2008). Iz ovih nalaza o redistribuciji visoko toksičnih elemenata na nivou klijanca, može se zaključiti da kukuruz tretiran različitim, uglavnom niskim (5.2×10^{-15}) koncentracijama 24-EBL-a, može preživeti područja zagađena teškim metalima. Molibden je visoko mobilan element kroz različita biljna tkiva (Bittner, 2014) i ta činjenica može biti jedan od razloga zašto koncentracije molibdena nisu značajno promenjene u svim delovima klijanaca tretiranih različitim koncentracijama 24-EBL-a. Iz Tabele 9 se takođe može zaključiti da 24-EBL ne utiče na sadržaj magnezijuma u klijancima.

Tabela 9. Uticaj različitih koncentracija 24-EBL-a na sadržaj hemijskih elemenata (mg kg⁻¹) u delovima klijanca hibrida ZP 704.

Koncentracija 24-EBL-a	Mn	Na	Zn	Cu	Cr	Ni
ZP 704						
Kontrola Plumula	3.1 ^a ±0.65	109.5 ^a ±11.3	980.3 ^a ±175	59.7 ^a ±7.90	5.83 ^a ±0.68	0.33 ^a ±0.04
-9 Plumula	2.5 ^{ab} ±0.26	101.5 ^a ±13.9	86.3 ^b ±13.3	3.27 ^b ±0.49	0.67 ^b ±0.01	0.26 ^a ±0.04
-12 Plumula	2.7 ^{ab} ±0.07	90.1 ^a ±8.2	58.9 ^b ±6.2	1.99 ^b ±0.20	0.31 ^b ±0.08	0.13 ^b ±0.02
-15 Plumula	1.8 ^b ±0.09	82.2 ^a ±10.6	51.7 ^b ±3.6	1.43 ^b ±0.3	0.17 ^b ±0.02	0.04 ^c ±0.00
Kontrola radikula	1.8 ^b ±0.2	137.1 ^a ±13.9	407.6 ^a ±46.6	23.26 ^a ±2.8	2.42 ^a ±0.46	0.26 ^b ±0.01
-9 Radikula	2.3 ^b ±0.29	162.2 ^a ±16.3	82.4 ^b ±5.2	2.45 ^b ±0.07	0.57 ^b ±0.07	0.13 ^c ±0.02
-12 Radikula	3.8 ^a ±0.36	155.3 ^a ±32.8	67.2 ^b ±6.1	2.71 ^b ±0.41	0.45 ^b ±0.05	2.28 ^a ±0.02
-15 Radikula	2.5 ^b ±0.5	144.4 ^a ±6.8	47.0 ^b ±9.3	1.86 ^b ±0.18	0.38 ^b ±0.06	0.28 ^b ±0.06
Kontrola RoS	2.9 ^b ±0.37	194.3 ^a ±45.2	80.7 ^a ±12.3	4.29 ^a ±0.95	1.09 ^c ±0.07	0.39 ^b ±0.07
-9 RoS	4.7 ^a ±0.32	108.94 ^b ±9.0	77.6 ^a ±2.5	2.54 ^{bc} ±0.29	0.43 ^d ±0.03	0.18 ^b ±0.04
-12 RoS	5.5 ^a ±0.38	113.2 ^b ±12.0	50.2 ^b ±6.3	3.57 ^{ab} ±0.17	2.78 ^a ±0.20	1.51 ^a ±0.18
-15 RoS	5.6 ^a ±0.48	64.2 ^b ±2.6	57.1 ^b ±4.2	1.78 ^c ±0.27	2.17 ^b ±0.12	1.97 ^a ±0.38

Vrednosti praćene istim slovom nisu statistički znaćajno različite (P<0.05) prema Takijevom (Tukey's) HSD testu.

Tabela 9. (Nastavak) Uticaj različitih koncentracija 24-EBL-a na sadržaj hemijskih elemenata (mg kg^{-1}) u delovima klijanca hibrida ZP 704.

Koncentracija	Cd	Mo	Mg	Fe	K	P
24-EBL-a	ZP 704					
Kontrola Plumula	0.28 ^a ±0.02	0.07 ^a ±0.02	252.9 ^{ab} ±38.25	33.23 ^a ±2.08	1746.77 ^{ab} ±234.45	631.53 ^c ±54.04
-9 Plumula	0.21 ^{ab} ±0.06	0.07 ^a ±0.01	285.3 ^a ±32.31	10.73 ^c ±2.0	1756.40 ^a ±127.2	2362.07 ^a ±186.99
-12 Plumula	0.17 ^b ±0.01	0.06 ^a ±0.01	230.5 ^{ab} ±20.01	23.13 ^b ±6.04	1272.73 ^c ±110.53	1982.87 ^b ±109.65
-15 Plumula	0.14 ^b ±0.06	0.06 ^a ±0.01	207.5 ^b ±15.38	0.00 ^d ±0.00	1358.13 ^{bc} ±79.74	2015.63 ^b ±97.0
Kontrola radikula	0.21 ^a ±0.01	0.05 ^b ±0.01	116.5 ^c ±14.70	3.13 ^c ±0.06	1588.23 ^b ±149.81	1431.63 ^c ±24.93
-9 Radikula	0.14 ^b ±0.01	0.04 ^b ±0.01	236.5 ^a ±25.50	11.23 ^c ±1.66	3199.23 ^a ±662.92	3064.97 ^a ±228.25
-12 Radikula	0.22 ^a ±0.03	0.08 ^a ±0.01	174.5 ^b ±26.40	60.50 ^a ±7.98	1995.53 ^b ±211.39	1772.23 ^{bc} ±115.08
-15 Radikula	0.23 ^a ±0.04	0.04 ^b ±0.01	131.2 ^{bc} ±12.19	27.47 ^b ±8.52	1974.9 ^b ±382.91	1968.70 ^b ±162.03
Kontrola RoS	0.23 ^b ±0.07	0.06 ^b ±0.02	429.5 ^b ±73.88	30.70 ^c ±2.92	598.20 ^{bc} ±78.86	946.70 ^d ±144.55
-9 RoS	0.30 ^b ±0.08	0.08 ^b ±0.01	752.3 ^a ±59.22	25.20 ^c ±2.01	1137.33 ^a ±219.46	5424.70 ^a ±507.12
-12 RoS	0.69 ^a ±0.24	0.12 ^a ±0.02	761.5 ^a ±146.63	121.9 ^a ±10.6	1004.53 ^{ab} ±217.52	4564.70 ^b ±139.34
-15 RoS	0.17 ^b ±0.03	0.09 ^{ab} ±0.01	501.3 ^{ab} ±99.8	57.73 ^b ±1.58	448.03 ^c ±76.31	3194.97 ^c ±172.56

Vrednosti praćene istim slovom nisu statistički značajno različite ($P < 0.05$) prema Takijevom (Tukey's) HSD testu.

Tabela 10. Uticaj različitih koncentracija 24-EBL-a na sadržaj hemijskih elemenata (mg kg^{-1}) u delovima klijanca hibrida ZP 434.

Koncentracija 24-EBL-a	Mn	Na	Zn	Cu	Cr	Ni
	ZP 434					
Kontrola Plumula	3.94 ^a ±0.39	351.41 ^a ±31.00	312.80 ^a ±18.03	21.52 ^a ±2.31	2.04 ^a ±0.09	0.75 ^a ±0.10
-9 Plumula	2.88 ^b ±0.59	374.52 ^a ±26.86	98.31 ^b ±16.78	3.59 ^b ±0.16	0.47 ^b ±0.03	0.75 ^a ±0.01
-12 Plumula	3.28 ^{ab} ±0.16	286.59 ^b ±6.06	78.73 ^b ±1.25	3.18 ^b ±0.10	0.42 ^b ±0.01	0.85 ^a ±0.14
-15 Plumula	2.72 ^b ±0.09	207.41 ^c ±21.59	68.21 ^b ±9.58	2.49 ^b ±0.19	0.21 ^c ±0.01	0.66 ^a ±0.02
Kontrola radikula	1.96 ^a ±0.28	427.06 ^b ±43.73	209.96 ^a ±27.54	12.58 ^a ±0.92	1.32 ^a ±0.04	0.75 ^a ±0.04
-9 Radikula	1.51 ^{ab} ±0.11	250.96 ^c ±35.42	54.92 ^b ±4.36like	2.33 ^b ±0.05	0.32 ^b ±0.02	0.66 ^a ±0.05
-12 Radikula	1.82 ^{ab} ±0.27	710.01 ^a ±92.93	61.83 ^b ±10.94	2.65 ^b ±0.09	0.21 ^c ±0.01	0.72 ^a ±0.17
-15 Radikula	1.34 ^b ±0.13	265.12 ^c ±27.25	56.83 ^b ±8.05	2.24 ^b ±0.12	0.29 ^{ab} ±0.05	0.53 ^a ±0.05
Kontrola RoS	4.44 ^a ±0.52	154.57 ^b ±21.06	97.53 ^a ±5.48	4.55 ^a ±0.49	0.69 ^a ±0.02	0.68 ^{ab} ±0.10
-9 RoS	4.12 ^a ±0.55	209.02 ^a ±30.69	71.08 ^b ±5.25	2.77 ^b ±0.16	0.43 ^b ±0.03	0.79 ^a ±0.07
-12 RoS	4.64 ^a ±0.30	162.89 ^{ab} ±8.04	59.19 ^{bc} ±5.41	2.45 ^{bc} ±0.03	0.32 ^c ±0.06	0.72 ^{ab} ±0.04
-15 RoS	4.15 ^a ±0.16	146.68 ^b ±4.18	52.75 ^c ±2.23	1.93 ^c ±0.06	0.17 ^d ±0.02	0.59 ^b ±0.05

Vrednosti praćene istim slovom nisu statistički značajno različite ($P < 0.05$) prema Takijevom (Tukey's) HSD testu.

Tabela 10. (Nastavak) Uticaj različitih koncentracija 24-EBL-a na sadržaj hemijskih elemenata (mg kg^{-1}) u delovima klijanca hibrida ZP 434.

Koncentracija	Cd	Mo	Mg	Fe	K	P
24-EBL-a	ZP 434					
Kontrola						
Plumula	<0.05	0.12 ^a ±0.03	277.47 ^a ±14.89	13.33 ^a ±0.51	979.70 ^b ±108.4	770.03 ^a ±64.01
-9 Plumula	<0.05	0.14 ^a ±0.01	268.04 ^a ±29.10	13.27 ^a ±1.01	1412.83 ^a ±89.44	350.07 ^b ±44.64
-12 Plumula	<0.05	0.15 ^a ±0.02	227.75 ^a ±26.36	5.97 ^b ±0.81	1334.4 ^a ±94.81	212.80 ^c ±18.56
-15 Plumula	<0.05	0.13 ^a ±0.03	240.8 ^a ±19.56	6.17 ^b ±0.46	1214.80 ^{ab} ±157.26	213.07 ^c ±20.21
Kontrola radikula	<0.05	0.13 ^a ±0.01	123.13 ^a ±11.16	1.07 ^d ±0.15	1185.5 ^b ±257.74	282.73 ^b ±53.81
-9 Radikula	<0.05	0.10 ^a ±0.02	114.81 ^a ±11.19	17.77 ^b ±0.96	1761.33 ^a ±104.01	225.93 ^{ab} ±73.95
-12 Radikula	<0.05	0.14 ^a ±0.02	131.09 ^a ±19.39	8.93 ^c ±1.25	1435.63 ^{ab} ±133.35	131.63 ^b ±27.53
-15 Radikula	<0.05	0.12 ^a ±0.03	106.87 ^a ±6.69	20.83 ^a ±1.61	1428.77 ^{ab} ±97.90	104.27 ^b ±12.20
Kontrola RoS	<0.05	0.13 ^b ±0.01	609.61 ^a ±38.76	11.23 ^a ±1.07	714.70 ^a ±166.48	1090.73 ^a ±100.15
-9 RoS	<0.05	0.17 ^a ±0.01	569.32 ^a ±58.61	0.00 ^c ±0.00	482.20 ^{ab} ±122.39	411.97 ^b ±16.14
-12 RoS	<0.05	0.15 ^{ab} ±0.01	619.1 ^a ±99.53	3.77 ^b ±0.06	450.73 ^{ab} ±179.43	381.03 ^b ±36.84
-15 RoS	<0.05	0.13 ^b ±0.01	549.93 ^a ±46.54	11.03 ^a ±0.35	326.70 ^b ±54.31	316.43 ^b ±8.82

Vrednosti praćene istim slovom nisu statistički značajno različite ($P < 0.05$) prema Takijevom (Tukey's) HSD testu.

Molibden ima bitnu ulogu u mehanizmu asimilacije azota kao kofaktor nitrata reduktaze, važnog enzima u procesu transformacije neorganske forme nitrata usvojenog iz zemlje. I molibden i mangan su veoma značajni u procesu fotosintetske foto-oksidacije vode (Marschner, 1995). Iz rezultata se može zaključiti da hemijski elementi kao što je mangan, natrijum, nikl, molibden i magnezijum nisu znatno promenjeni u odnosu na kontrolu, pod uticajem različitih koncentracija 24-EBL-a (Tabela 10), dok je ovaj fitohormon delimično uticao na koncentraciju cinka u ispitivanim klijancima.

Rezultati pokazuju da je redistribucija bitnih hemijskih elemenata ostala delimično nepromenjena dok su potencijalno toksični elementi ostali blokirani pre ulaska u vitalne delove biljke, što bi moglo biti od velikog značaja za bolje rastenje i zaštitu kukuruza u uslovima moguće povećane koncentracije teških metala u zemljištu. Kao potvrda ove pretpostavke bi moglo da posluži i izduživanje plumule kod klijanca, na koju su niže koncentracije 24-EBL-a imale stimulatorni efekat dok je biomasa radikule ostala u granicama kontrolnih uzoraka (Tabela 6). Tretman klijanaca oba ispitivana hibrida sa različitim koncentracijama 24-EBL-a utiče na smanjenje bakra u vitalnim delovima klijanca (Tabela 9 i 10), tako da se može pretpostaviti da 24-EBL ima pozitivan efekat u smislu izbegavanja potencijalnih toksičnih efekata nastalih prilikom nagomilavanja u delovima klijanca kukuruza.

Transport natrijuma tokom slanog stresa je još uvek nedovoljno proučen ali istraživanja sugerišu da određene biljke imaju kompartimente za skladištenje toksičnih količina natrijuma. Verovatno da ovaj fenomen pomaže biljkama u prevazilaženju stresa soli (Britto and Kronzucker, 2015). Uzimajući u obzir činjenicu da 24-EBL utiče na nagomilavanje natrijuma u korenu klijanaca, pogotovu u slučaju hibrida ZP 704 (Tabela 9), i nešto manje ali ipak dovoljno kod hibrida ZP 434, može se pretpostaviti da klijanci tretirani nižim koncentracijama 24-EBL-a mogu imati veće šanse za da se razviju u normalnu biljku u uslovima slanog stresa (Anuradha and Rao, 2003). 24-EBL u nižim koncentracijama takođe utiče na redistribuciju bakra i hroma u slučaju hibrida ZP 434 (Tabela 10), i ova činjenica bi mogla da se iskoristi kao bitan parametar pri izboru pravog tipa hemijskih tretmana koji bi pomogli u prevazilaženju nepovoljnih uticaja stresa toksičnim elementima u zagađenom području.

Iako ispitivanja vezana za distribuciju hemijskih elemenata nisu sprovedena u ogledima sa gajenjem biljaka u zemljanom supstratu, rezultati jasno pokazuju da niske koncentracije 24-EBL-a, utiču na distribuciju teških metala u vitalne delove klijanca na samom početku rastenja. Ovi rezultati, zajedno sa gore pomenutom literaturom, impliciraju da je 24-EBL uključen u zaštitu bilja od stresa toksičnim elementima (Hayat and Ahmad, 2010) i da bi kukuruz tertian različitim koncentracijama 24-EBL-a mogao biti korišćen na mestima zagađenim teškim metalima.

Uzimajući u obzir činjenicu da je klijavost ostala relativno stabilna za slučaju oba hibrida (Slika 11), zajedno sa višim rastom klijanaca (u slučaju hibrida ZP 704), u poređenju sa kontrolom, kao i dokaz da nije došlo do distribucije potencijalno toksičnih hemijskih elemenata u vitalne delove klijanca, kandiduje ove hibride tretirane 24-EBL-om, za gajenje na zagađenom zemljištu.

Kukuruz poseduje veliku biomasu (Semenčenko *et al.*, 2013), tako da čak i minimalne promene u usvajanju hemijskih elemenata mogu rezultovati u eliminaciji toksičnih elemenata iz zagađenog područja. Posmatrajući hibride ZP 704 i ZP 434, može se zaključiti da pod uticajem 24-EBL-a dolazi do smanjene distribucije toksičnih elemenata unutar klijanaca i da ih to čini pogodnim za rastenje na zagađenom području, ali ih upravo taj razlog ne čini pogodnima za fitoremedijaciju zagađenog zemljišta.

4.7 Određivanje polifenolnog profila ekstrakata klijanaca kukuruza

4.7.1 Optimizacija metode za ekstrakciju polifenola

U ovoj doktorskoj disertaciji je analiziran i polifenolni profil hibrida kukuruza ZP 434 i ZP 704. Analizirano je 24 uzorka, 9 uzoraka plumule za ceo koncentracioni opseg 24-EBL-a, 1 uzorak radikule sa koncentracijom 24-EBL-a od 5.2×10^{-11} M, kao i kontrolni uzorci koji nisu tretirani 24-EBL-om, uporedo za oba hibrida. Analizirani ekstrakti klijanaca prikazani su u Tabeli 11.

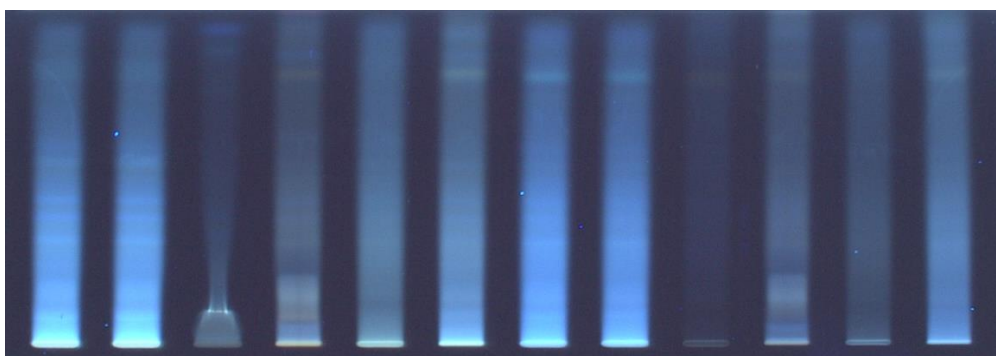
Tabela 11. Brojevi analiziranih ekstrakata klijanaca.

Redni broj	ZP434	Redni broj	ZP704
1	K\1 plumula	13	K\2 plumula
2	10^{-7} \ 1 plumula	14	10^{-7} \ 2 plumula
3	10^{-8} \ 1 plumula	15	10^{-8} \ 2 plumula
4	10^{-9} \ 1 plumula	16	10^{-9} \ 2 plumula
5	10^{-10} \ 1 plumula	17	10^{-10} \ 2 plumula
6	10^{-11} \ 1 plumula	18	10^{-11} \ 2 plumula
7	10^{-12} \ 1 plumula	19	10^{-12} \ 2 plumula
8	10^{-13} \ 1 plumula	20	10^{-13} \ 2 plumula
9	10^{-14} \ 1 plumula	21	10^{-14} \ 2 plumula
10	10^{-15} \ 1 plumula	22	10^{-15} \ 2 plumula
11	K\1 radikula	23	K\2 radikula
12	10^{-11} \ 1 radikula	24	10^{-11} \ 1 radikula

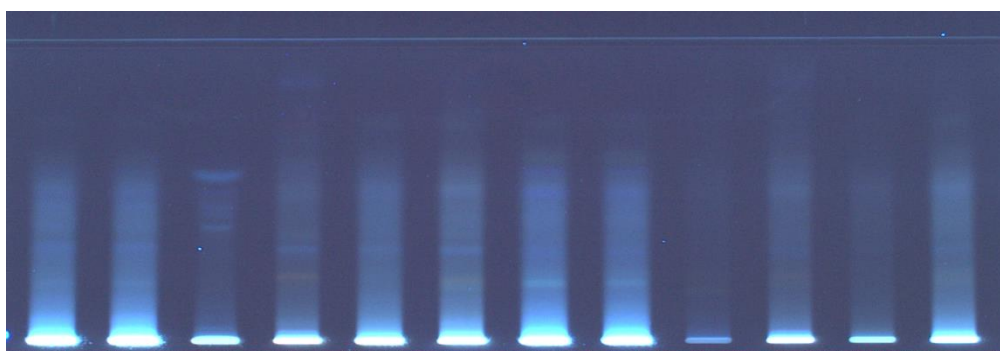
S obzirom na nepostojanje standardne metode za ekstrakciju polifenola iz osjetljivih uzoraka kao što su delovi klijanaca kukuruza, istraživanje je obuhvatilo optimizaciju metode ekstrakcije polifenola, njihovo razdvajanje i identifikaciju primenom visoko-efikasne tankoslojne hromatografije, obradu dobijenih hromatografskih slika i multivarijantnu analizu podataka.

Izolovanje polifenola iz klijanaca. U cilju određivanja metode kojom bi se izolovala najveća količina polifenola iz klijanaca, uzorci su tretirani prema postupcima navedenim u eksperimentalnom delu. Optimizacija metode za ekstrakciju polifenola rađena je na uzorcima semena kukuruza koja su bila tretirana koncentracijom 24-EBL-a od 5.2×10^{-15} M, paralelno za oba hibrida.

Pripremljeni uzorci su potom analizirani pomoću HPTLC-a primenom hromatografskih uslova za određivanje polifenola u uzorcima hrane, opisanim u literaturi (Leticia *et al.*, 2011; De la Parra *et al.*, 2007). Smeša toluen : etil-acetat : mravlja kiselina korišćena je kao mobilna faza za analizu flavonoida, dok je sistem etil acetat : mravlja kiselina : sirćetna kiselina : voda korišćen za fenolne kiseline. Na Slici 26. prikazani su hromatogrami ekstrakata dva semena hibrida kukuruza pripremljenih prema prethodno opisanim postupcima. Utvrđeno je da se optimalni rezultati, koji podrazumevaju najveći broj hromatografskih zona za oba hibrida i obe klase polifenolnih jedinjenja, dobijaju primenom prve metode. U tom smislu, dalje su pripremljeni uzorci plumule i radikule za ceo koncentracioni opseg 24-EBL-a, kao i kontrolne uzorke, prema odabranom postupku.



a



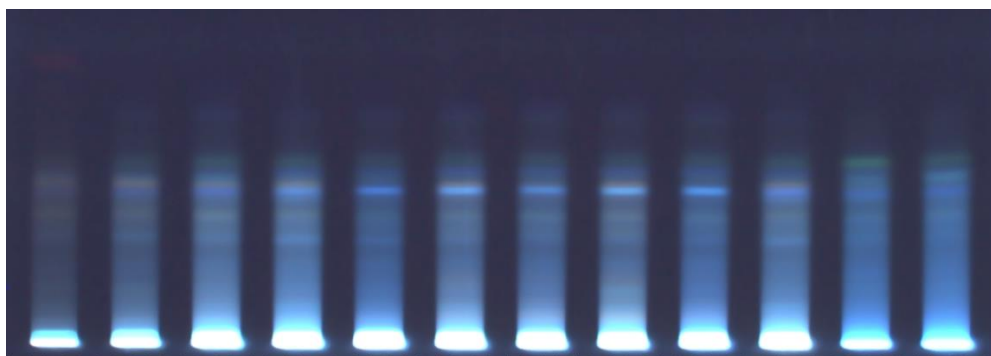
b

Slika 26. Hromatogrami klijanaca, a) hromatografski sistem 1, b) hromatografski sistem 2. Hromatogrami 1-6 (s leva na desno): hibrid 434, postupci ekstrakcije 1-6, hromatogrami 7-12 (s leva na desno): hibrid 704, postupci ekstrakcije 1-6.

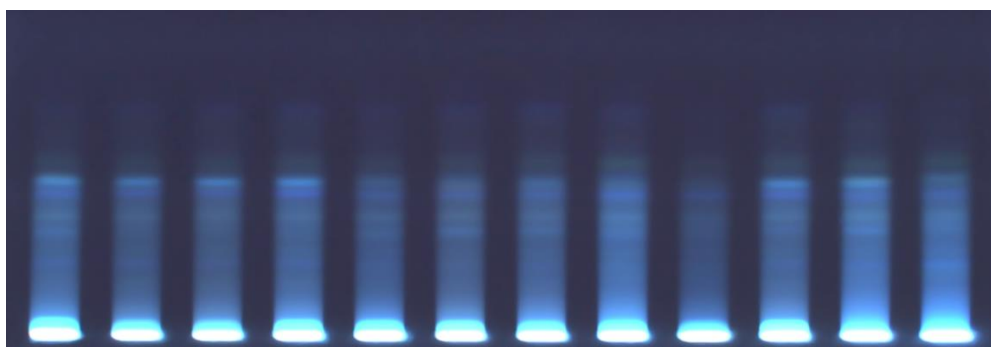
4.7.2 HPTLC polifenolni profili ekstrakata kukuruza

Polifenolni profili analiziranih uzoraka klijanaca dobijeni su primenom visoko-efikasne tankoslojne hromatografije. HPTLC uslovi su optimizovani u cilju što boljeg razdvajanja slabo, srednje i veoma polarnih fenolnih jedinjenja. Primenjena su dva različita hromatografska sistema (HS), HS1 za manje polarnu frakciju i HS2 za srednje i veoma polarnu frakciju, koji predstavljaju modifikaciju uslova prethodno opisanih u literaturi (Leticia *et al.*, 2011; De la Parra *et al.*, 2007)

Hromatogrami dobijeni primenom HS1 prikazani su na Slici 27. Utvrđeno je postojanje velikog broja polarnijih jedinjenja koja se jače adsorbuju na površini silika gela. Pored toga, nepolarniji flavonoidi kao što su flavonoli, flavanoni i izoflavonoidi se pojavljuju se na većim R_F vrednostima kao narandžaste, plave i zelene zone. Takođe, polifenolni profili uzoraka plumule i radikule su slični.



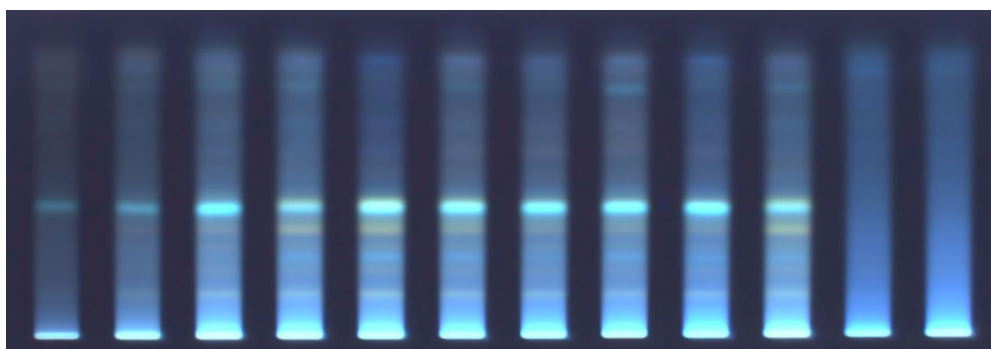
a



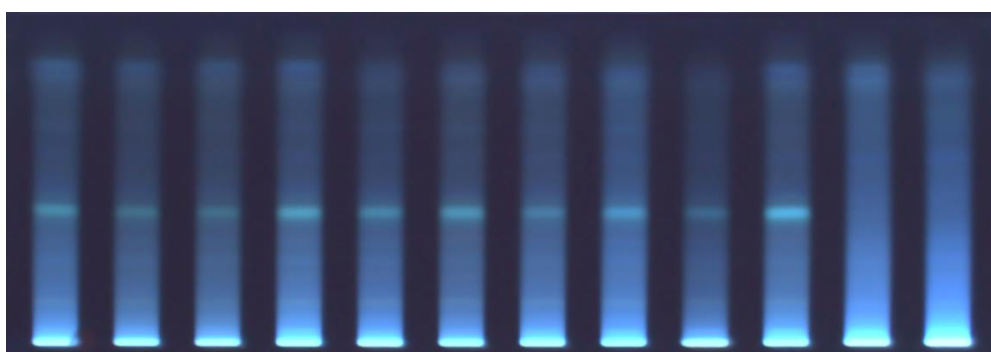
b

Slika 27. Hromatogrami dobijeni primenom HS1, a) uzorci 2-10, 1, 11,12, b) uzorci 14-22, 13, 23, 24.

U cilju boljeg definisanja hromatografskog profila polarnijih jedinjenja prisutnih u ekstraktima klijanaca, primenjen je drugi sistem koji je sadržavao mobilnu fazu veće elucione moći. Hromatogrami koji su dobijeni primenom HS2 su prikazani na Slici 28. Korišćenjem mobilne faze relativno velike elucione moći omogućeno je razdvajanje srednje i jako polarnih komponenata, uglavnom polarnijih fenolnih kiselina, kao što su hlorogena, galna i elaginska kiselina, kao i različitih flavonoid aglikona, apigenina, kvercetina, kempferola i drugih glikozida (Milosavljević, 1994). Na hromatogramima ekstrakata plumule dominira jedna plavo obojena zona na R_F vrednosti između 0.4 i 0.5, kao i nekoliko manje intenzivnih plavih i narandžastih zona na nižim R_F vrednostima. Takođe, sadržaj polarnijih komponenata se značajno razlikuje u uzorcima plumule i radikule. Hromatogrami ekstrakata radikule gotovo da ne sadrže pomenuta jedinjenja.



a

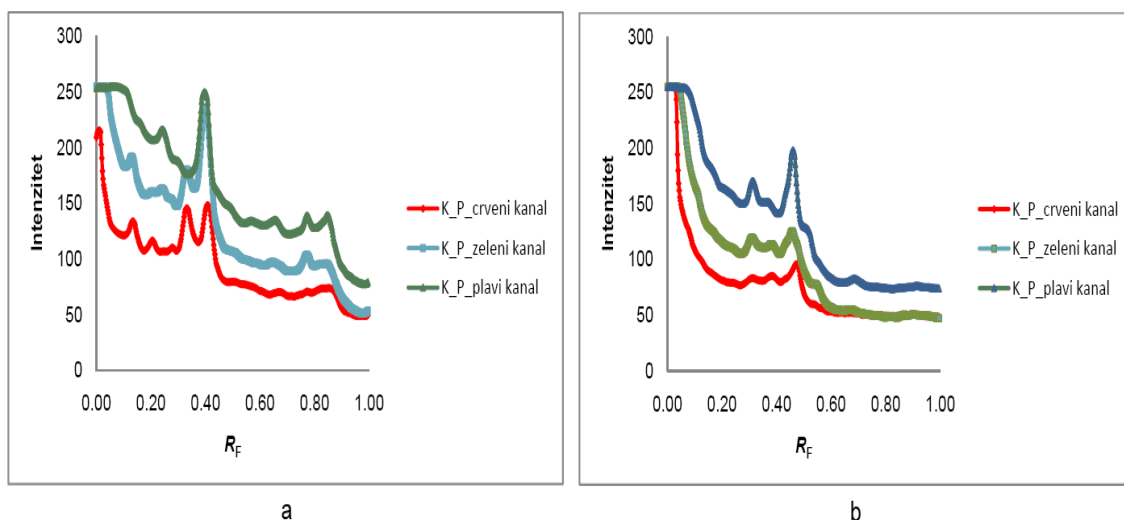


b

Slika 28. Hromatogrami dobijeni primenom HS2, a) uzorci 2-10, 1, 11,12, b) uzorci 14-22, 13, 23, 24.

U cilju dalje analize dobijenih rezultata urađena je multivarijantna analiza slike, kao i klasifikaciona metoda-Analiza glavnih komponenata (Principal Component Analysis – PCA). Dobijeni hromatogrami sačuvani su kao slike koje su potom obrađene primenom programa Image J (<http://imagej.nih.gov/ij/>, ver. 1.47q, Rasband W. National Institutes of Health saglasno proceduri koja je objavljena u literaturi (Leticia *et al.*, 2011). Podaci su potom eksportovani za dalju hemometrijsku obradu.

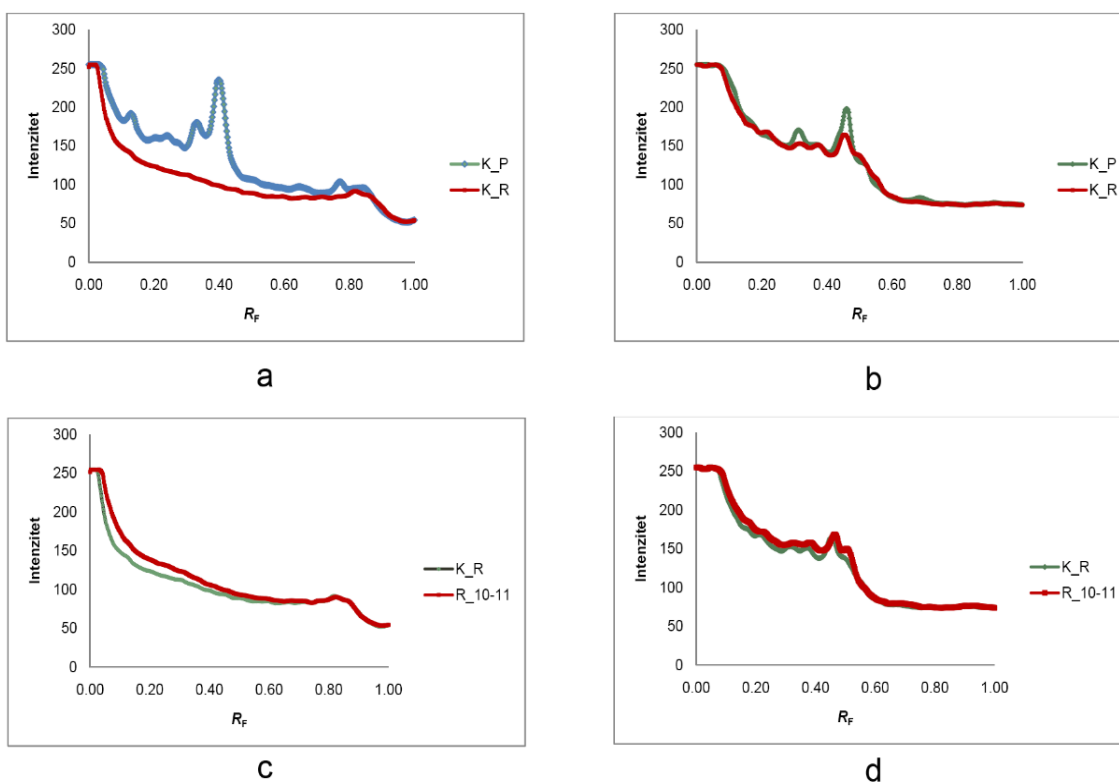
Iz Slike 29. može se videti da hromatogrami ekstrakata klijanaca sadrže zone različitih boja. Kako bi se povećala selektivnost i razlikovanje jedinjenja na osnovu boje nakon hromatografskog razvijanja, svaka slika je podeljena na tri kanala, crveni, zeleni i plavi. Na taj način, polifenolna jedinjenja iz klijanaca, koja nisu dovoljno razdvojena ali daju zone različitih boja pod vidljivom svetlošću, mogu biti preciznije definisana korišćenjem odgovarajućeg kanala. Primenom ovog postupka dobija se grafik sa jasno definisanim granicama između pikova, što dovodi do manjih grešaka u proceni oblasti ispod pikova koji se preklapaju. Na ovaj način, od svakog hromatograma u boji dobijaju se nova tri, za svaki od kanala, u sivoj skali. Grafik zavisnosti intenziteta sive boje od R_F vrednosti dobijen za kontrolni uzorak plumule hibrida ZP434, za sva tri kanala i oba hromatografska sistema, prikazan je na Slici 29.



Slika 29. Polifenolni profil kontrolnog uzorka plumule hibrida ZP434, za sva tri kanala dobijen primenom a) HS2, b) HS1.

Na osnovu dobijenih grafika, za dalju analizu izabrani su rezultati dobijeni korišćenjem zelenog kanala za HS2, odnosno plavog kanala za HS1 zbog jasnije

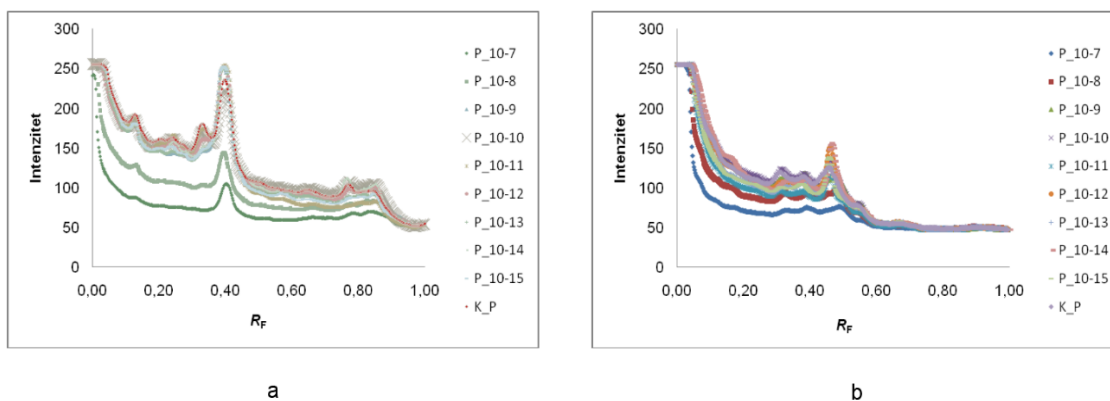
definisanih pikova, većeg broja pikova, kao i većeg intenziteta u odnosu na preostala dva kanala. Upoređivanjem polifenolnih profila kontrolnog uzorka plumule sa kontrolnim uzorkom radikule, utvrđeno je postojanje značajne razlike u sadržaju polifenolnih jedinjenja kada se razvijanje hromatograma vrši korišćenjem HS2 (Slika 30 (a)), za razliku od HS1 koji daje gotovo identične profile (Slika 30 (b)). Ovo ukazuje na činjenicu da uzorci radikule ne sadrže polarnija jedinjenja kao što su fenolne kiseline, aglikone i glikozide, dok je sadržaj nepolarnijih flavonoida gotovo identičan. Takođe, utvrđeno je da ne postoji razlika u sadržaju polifenola u kontrolnom uzorku radikule i uzorku radikule tretiranom 24-EBL-om (Slika 30 (c) i (d)).



Slika 30. Polifenolni profil kontrolnih uzoraka plumule i radikule hibrida ZP434 dobijen primenom a) HS2, b) HS1, polifenolni profil kontrolnog uzorka radikule i uzorka radikule tretiranog 24-EBL-om koncentracije 5.2×10^{-11} dobijen primenom c) HS2, d) HS1.

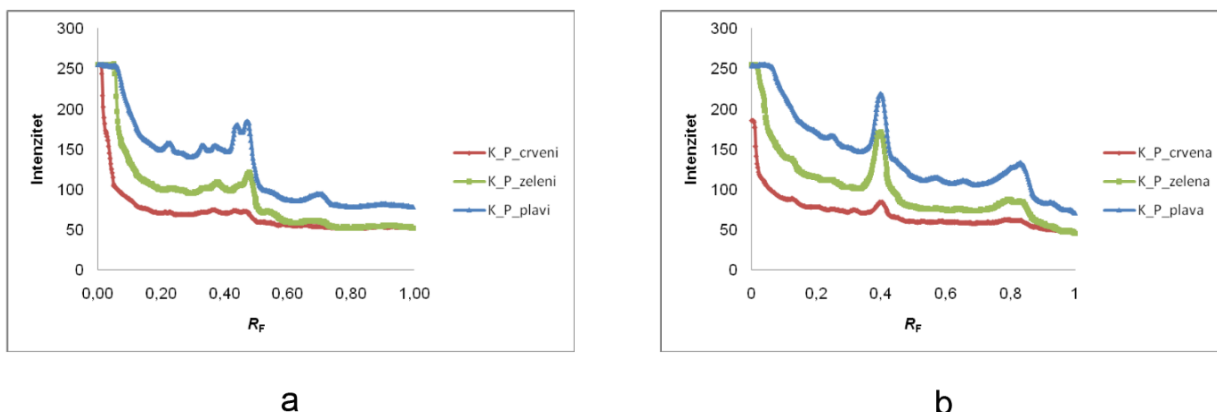
Kod uzoraka plumule tretiranih 24-EBL-om koncentracije 5.2×10^{-7} i 5.2×10^{-8} , uočava se niži sadržaj polifenola u odnosu na kontrolni uzorak. Uzorci tretirani nižim koncentracijama 24-EBL-a 5.2×10^{-9} do 5.2×10^{-15} pokazuju polifenolni profil sličan

kontrolnom uzorku plumule ukazujući na činjenicu da visoke koncentracije 24-EBL-a imaju inhibiran efekat na sadržaj polifenola. Ovakav trend uočava se u oba hromatografska sistema. Grafici zavisnosti intenziteta boje od R_F vrednosti dobijeni za uzorke plumule hibrida ZP 434, za ceo koncentracioni opseg 24-EBL-a i oba hromatografska sistema, prikazan je na Slici 31.



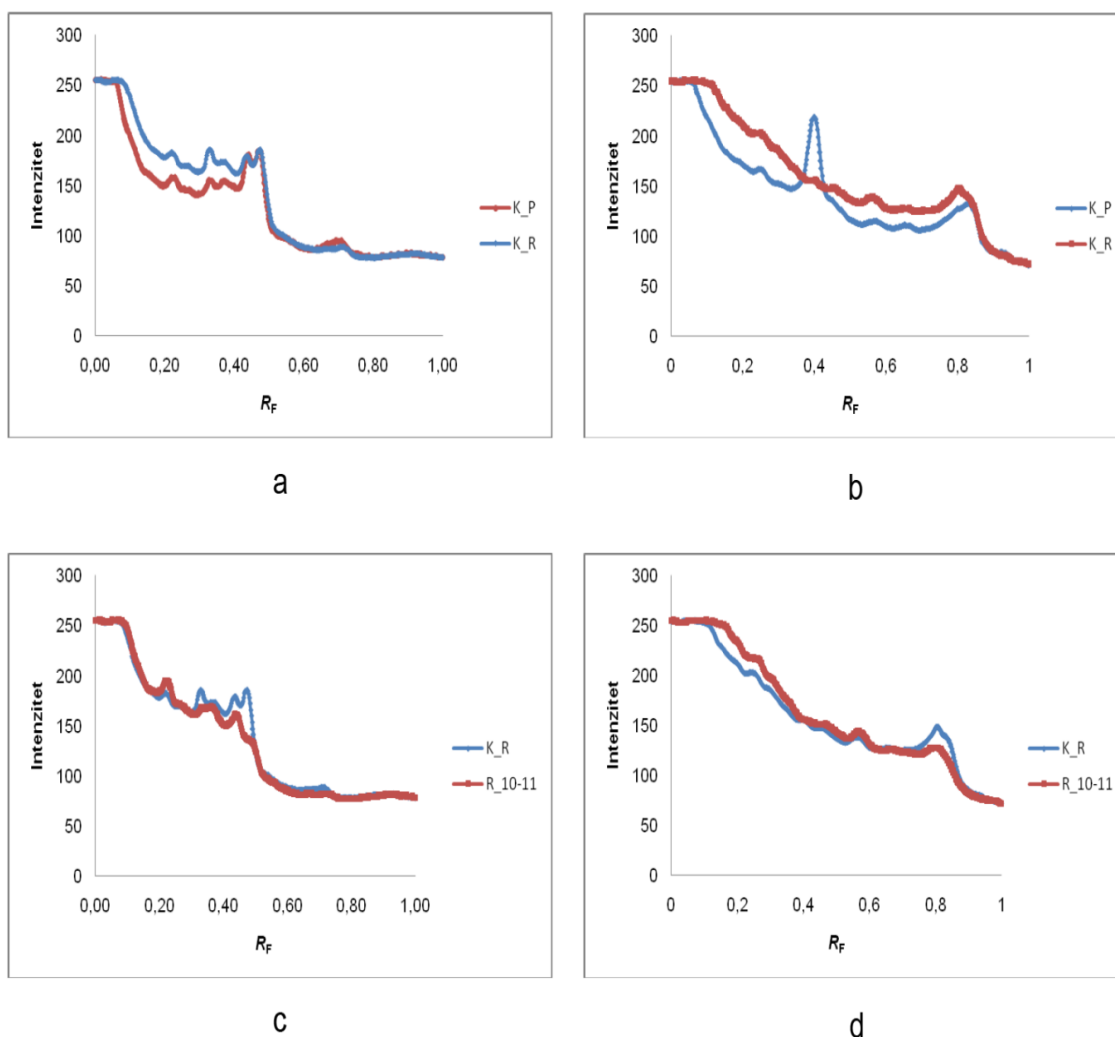
Slika 31. Polifenolni profil plumule uzoraka ZP434 tretiranih 24-EBL-om koncentracija 10^{-7} - 10^{-15} M i kontrolnog uzorka dobijenih primenom a) HS2, b) HS1.

Grafik zavisnosti intenziteta boje od R_F vrednosti dobijen za kontrolni uzorak plumule hibrida ZP 704, za sva tri kanala i oba hromatografska sistema, prikazan je na Slici 32. Na osnovu dobijenih grafika, za dalju analizu izabrani su rezultati plavog kanala za oba hromatogrfska sistema zbog jasnije definisanih pikova, većeg broja pikova, kao i većeg intenziteta u odnosu na preostala dva kanala.



Slika 32. Polifenolni profil kontrolnog uzorka plumule hibrida ZP 704, za sva tri kanala dobijen primenom a) HS1, b) HS2

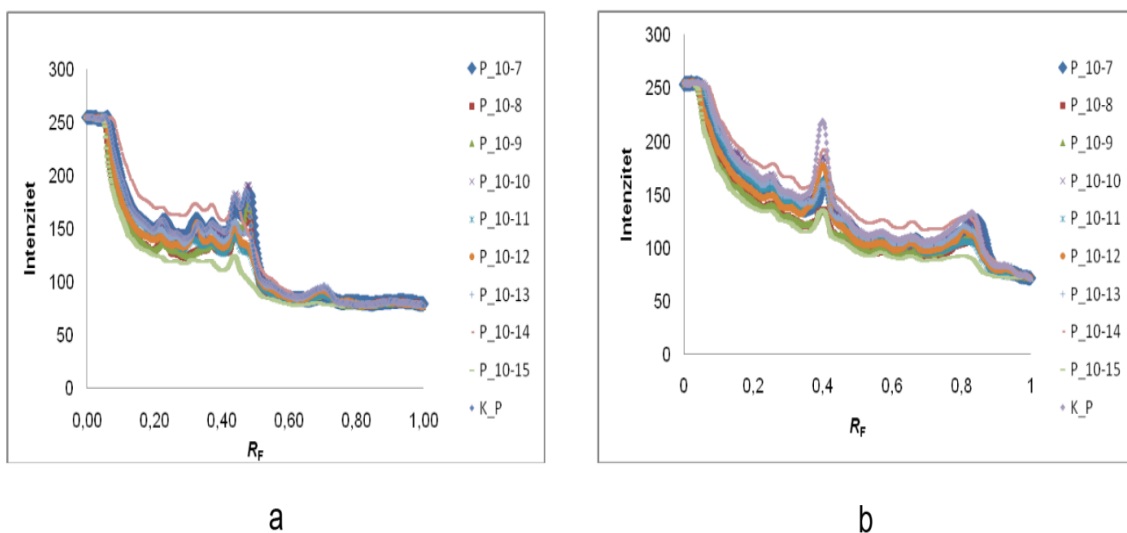
Upoređivanjem polifenolnih profila kontrolnog uzorka plumule sa kontrolnim uzorkom radikule, nije utvrđeno postojanje značajne razlike u sadržaju polifenolnih jedinjenja kada se razvijanje hromatograma vrši korišćenjem HS1 (Slika 33 (a)), za razliku od HS2 (Slika 33 (b)) koji ukazuje na činjenicu da uzorci plumule sadrže polarnija jedinjenja kao što su fenolne kiseline, aglikone i glikozide, dok je sadržaj nepolarnijih flavonoida gotovo identičan. Takođe, utvrđeno je da ne postoji razlika u sadržaju polifenola u kontrolnom uzorku radikule i uzorku radikule tretiranom 24-EBL-om (Slika 33 (c) i (d)).



Slika 33. Polifenolni profil kontrolnih uzoraka plumule (K_P) i radikule (K_R) hibrida ZP704 dobijen primenom a) HS1, b) HS2, polifenolni profil kontrolnog uzorka radikule i uzorka radikule tretiranog 24-EBL-om koncentracije 5.2×10^{-11} (R_10-11) dobijen primenom c) HS1, d) HS2

Kod uzorka plumule tretiranog 24-EBL-om u koncentraciji od 5.2×10^{-15} uočava se najniži sadržaj polifenola, dok se za uzorak plumule sa koncentracijom 24-EBL-a od 5.2×10^{-14} dobija profil koji pokazuje najveći sadržaj polifenolnih jedinjenja. Kontrolni uzorak, kao i uzorci plumule sa ostalim koncentracijama hormona se nalaze između ovih graničnih vrednosti. Ovakav trend uočen je kod oba primenjena hromatografska sistema.

Grafici zavisnosti intenziteta boje od R_F vrednosti dobijeni za uzorke plumule hibrida ZP704, za ceo koncentracioni opseg 24-EBL-a i oba hromatografska sistema, su prikazani na Slici 34.

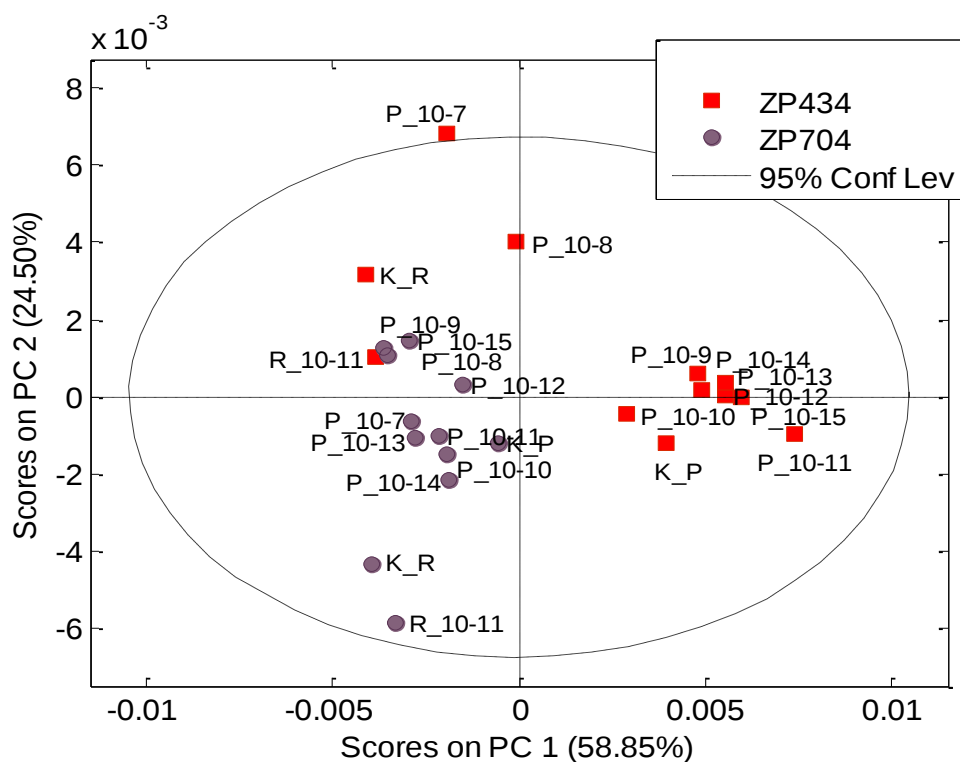


Slika 34. Polifenolni profil plumule uzorka hibrida ZP704 tretiranih fitohormonima koncentracija od 5.2×10^{-7} do 5.2×10^{-15} mmol i kontrolnog uzorka dobijenih primenom a) HS1, b) HS2.

U cilju utvrđivanja postojanja razlike između dva hibrida, urađena je analiza glavnih komponenata na podatke dobijene za HS2. Matrica podataka sastojala se od 24 objekta (ispitivanih uzoraka) i 452 varijable. Varijable predstavljaju intenzitete u pikselima duž 452 duge linije. Varijable predstavljaju intenzitete sive boje u pikselima u svakoj tački hromatograma od mesta nanošenja do fronta rastvarača.

Dobijeni PCA model sastoji se od četiri glavne komponente kojima se objašnjava 96.40% ukupnog varijabiliteta među podacima. Prva glavna komponenta

obuhvata 58.85% varijabiliteta, dok kumulativna varijansa objašnjena pomoću prve dve komponente iznosi 83.35%. Uzajamne projekcije zbirova latentnih varijabli, za prve dve glavne komponente, prikazane su na Slici 35.



Slika 35. Analiza glavnih komponenta primenjena na podatke dobijene za HS2.

Na grafiku se mogu uočiti dva klastera koji odgovaraju uzorcima dva genotipa ukazujući na činjenicu da se isti mogu razlikovati prema sadržaju polifenolnih jedinjenja. Unutar svakog hibrida, uzorci radikule formiraju podklaster udaljen u odnosu na uzorke plumule. Takođe, uzorci plumule ZP 434 hibrida sa koncentracijom 24-EBL-a od 5.2×10^{-7} i 5.2×10^{-8} su izdvojeni u odnosu na ostale uzorke iz iste serije.

4.8 Određivanje fenolnog profila kukuruza primenom masene spektrometrije visoke rezolucije

4.8.1 Identifikacija fenolnih jedinjenja

Poređenjem sa masenim spektrima standarda identifikovani su galna, protokatehinska kiselina i rutin. Dok je identifikacija ostalih jedinjenja, u nedostatku standarda vršena poređenjem tačne mase $[M-H]^-$ deprotonovanog molekula i predviđenog mehanizma fragmentacije sa literaturnim podacima. Na taj način u analiziranim uzorcima kukuruza je identifikovano ukupno 19 fenolnih jedinjenja.

Identifikovana jedinjenja sa retencionim vremenima, srednjim vrednostima monoizotopskih masa, srednjim vrednostima izračunatih masa i masenim fragmentima su prikazana u Tabeli 12.

Identifikacija fenolnih kiselina i njihovih derivata. Analizom dobijenih masenih spektara, uočeno je da identifikovane fenolne kiseline i njihovi derivati (Tabela 12) pokazuju isti put fragmentacije koji podrazumeva gubitak molekula CO_2 . *p*-kumarinska kiselina ima deprotonovan $[M-H]^-$ molekulski jon na 163 m/z i $[M-H-CO_2]^-$ produkt jon na m/z 119. Estri fenolnih kiselina fragmentišu se raskidanjem estarske veze između alkohola i fenolnih kiselina, pri čemu nastaje fragment na m/z 191 (Jedinjenje 3.). Pored toga postoji mogućnost gubitka molekula H_2O , što je slučaj kod protokatehinske kiseline, pri čemu nastaje fragment na m/z 135 ili gubitka metil grupe (ferulinska kiselina). Fragmentacije derivata cimetne kiseline (9, 10) su opisane u literaturi (Parveen *et al.*, 2004). Hemijske strukture identifikovanih fenolnih kiselina su predstavljene u nastavku (Tabela 12 i 13).

Ferulinska kiselina (4-metoksi-3-hidroksi-cinaminska kiselina) je identifikovana u svim analiziranim uzorcima kukuruza, što potvrđuje činjenicu da je najzastupljenija fenolna kiselina kod biljaka koje pripadaju porodici trava. Žitarice su posebno bogate ovim jedinjenjem, gde se može naći kao slobodna ili u obliku estara vezanih u ćelijskom zidu (Rouau *et al.*, 2003; Leticia *et al.*, 2009).

Tabela 12. Strukturne formule fenolnih kiselina (derivata cimetine kiseline)

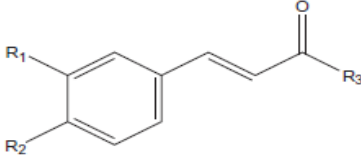
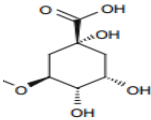
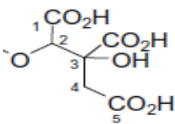
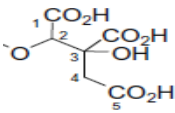
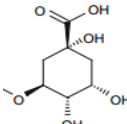
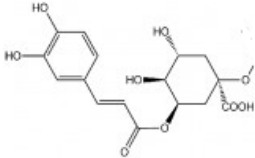
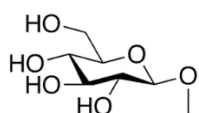
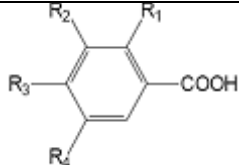
Skelet osnovnog jedinjenja				
				
Broj pika	Jedinjenje	R ₁	R ₂	R ₃
1	Ferulinska kiselina	OCH ₃	OH	OH
2	p-Koumarinska kiselina	OH	H	OH
3	Hlorogenska kiselina	OH	OH	
9	2-O-Feruloil hidroksicinaminska kiselina	OH	OCH ₃	
10	2-O-Kafeoil hidroksicinaminska kiselina	OH	OH	
11	3-O-Feruloil kininska kiselina	OH	OCH ₃	
12	4-Metoksicinaminska kiselina	H	OCH ₃	OH
13	3.4.5-Trimetoksi-cinaminska kiselina	OCH ₃	OCH ₃	OH
14	Cinarin	OH	OH	
15	Acil-β-D-glukozid sinapinske kiseline	OCH ₃	OCH ₃	

Tabela 13. Strukturne formule fenolnih kiselina (derivati benzojeve kiseline)

Skelet osnovnog jedinjenja					
					
Broj pika	Jedinjenje	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
4	Protokatehinska kiselina	H	OH	OH	H
5	Vanilinska kiselina	H	OCH ₃	OH	H
6	Galna kiselina	H	OH	OH	OH
7	Gentizinska kiselina	OH	H	OH	H
8	4-Hidroksibenzojeva kiselina	H	H	OH	H

Identifikacija flavonoida. Kod određivanja flavonoida u negativnom modu, najčešće se dobijaju fragmenti koji nastaju gubitkom funkcionalnih grupa, kao što su H₂O, CO, C₂H₂O i CO₂. Metilovani ili metoksilovani flavonoidi su karakteristični po gubitku CH₃ grupe. Metilovani ili metoksilovani flavonoidi su karakteristični po gubitku CH₃ grupe. Na osnovu toga, može se reći da su za analizu puta fragmentacije flavonoida najkorisniji oni fragmenti koji nastaju u retro-Dils-Alder-ovoj (RDA) reakciji.

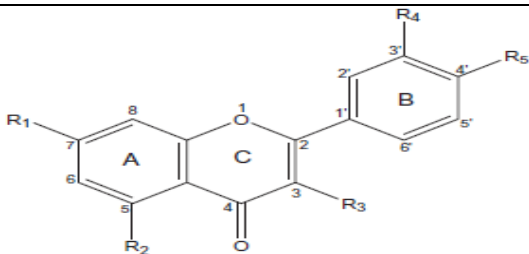
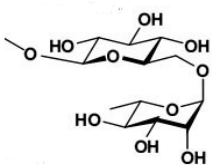
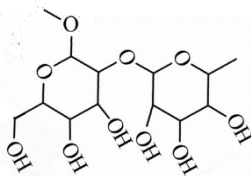
Ma *et al.*, su predložili način za identifikaciju fragmentacionog puta flavonoida u negativnom jonizacionom modu, tako što su tri prstena u flavanskoj strukturi obeležili sa A, B, i C, a dobijene RDA fragmente sa [^{i,j}A]⁻ i [^{i,j}B]⁻. Veze na C prstenu su obeležene brojevima od 0 do 4, radi lakšeg numerisanja fragmenata. Tako, na primer, [^{1,3}A]⁻ fragmentacioni jon koji nastaje prilikom RDA fragmentacije nesupstituisanih flavona, flavonola, flavanona, i flavanonola iznosi 151 m/z.

Kaempferid pripada grupi flavonola, u masenim spektrima daje fragmente na m/z 284 i m/z 243, koji nastaju gubitkom CH₃ grupe i CO-CO grupe. Rutin ili kvercetin-3-O-rutinozid, je flavonol-O-glikozid koji je takođe identifikovan preko standarda. Analizom masenog spektra rutina dobijen je [M-H]⁻ molekulski jon na 609

m/z i fragmentacioni jon na 301 m/z, koji odgovara masi kvercetina ($[M-H-rutinozid]^-$) (Brolis *et al.*, 1998).

Flavonolni diglikozidi kao što je kaempferol-7-O-neohesperidozid (kaempferol-ramnozil-($\alpha 1 \rightarrow 2$)-glukozid) i kaempferol-3-rutinozid (kaempferol-ramnozil-($\alpha 1 \rightarrow 6$)-glukozid) imaju istu molekulsku masu (594). Razlika je samo u položaju šećerne jedinice i tipu glikozidne veze između dva molekula monosaharida.

Tabela 14. Strukturne formule flavonida identifikovanih u uzorcima kukuruza.

Skelet osnovnog jedinjenja						
Broj pika	Jedinjenje	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
16	Kaempferid	OH	OH	OH	H	OCH ₃
17	Tangeritin	OCH ₃	OCH ₃	H	H	OCH ₃
18	Rutin	OH	OH		OH	OH
19	Kempferol-3-O-Rutinozid	OH	OH		H	OH

U uzorcima plumule hibrida ZP 434 identifikovana su jedinjenja 1, 4, 5, 9, 10, 11, 12, 14, 16, 18 i 19, dok je u radikuli potvrđeno prisustvo jedinjenja 1, 2, 5, 6, 7, 8, 12, 13 i 14. U uzorcima hibrida ZP 704 identifikovan je manji broj fenolnih jedinjenja.

Za plumulu su karakteristična jedinjenja 1, 3 i 15, dok su u radikuli pronađena jedinjenja 1, 14 i 17 (Tabela 15).

Tabela 15. Fenolna jedinjenja identifikovana u uzorcima kukuruza upotrebom UHPLC-LTQ OrbiTrap MS/MS.

Broj Pik a	Identifikovana jedinjenja	t _R (min)	Izračunata masa, [M-H] ⁻	Nadena masa,[M- H] ⁻	Δ Pp m	Fragmentacija	Reference
Fenolne kiseline i njihovi derivati							
1	Ferulinska kiselina	7.03	193.05008	193.0408	1.45	178 [M-H-CH ₃] ⁻ , 149 [M-H-CO ₂] ⁻	36. 37
2	p-Kumarinska kiselina	6.67	163.03952	163.03934	1.1	119 [M-H-CO ₂] ⁻	46
3	Hlorogena kiselina	5.31	353.08726	353.08615	3.14	191 [C ₇ H ₁₁ O ₆] ⁻	45
4	Protokatehinska kiselina	4.66	153.01878	153.01884	- 0.39	135 [M-H-H ₂ O] ⁻ , 109 [M-H-CO ₂] ⁻	35.47
5	Vanilinska kiselina	5.92	167.03443	167.03423	1.20	123 [M-H-CO ₂] ⁻	48
6	Galna kiselina	5.96	169.01370	169.0136	0.59	125 [M-H-CO ₂] ⁻	47
7	Gentizinska kiselina	4.66	153.01878	153.01897	- 1.24	109 [M-H-CO ₂] ⁻	35
8	4- Hidroksibenzoe va kiselina	5.5	137.02387	137.02391	- 0.29	93 [M-H-CO ₂] ⁻	48
9	2-O-Feruloil hidroksicimetna kiselina	5.82	383.06144	383.06070	1.93	189 [M-H-ferulinska kis- 171[M-H-ferulinska kis- H ₂ O] ⁻ , 127 [M-H-ferulinska kis- H ₂ O-CO ₂] ⁻ ,	35
10	2-O-Kafeoil hidroksicimetna kiselina	4.88	369.04579	369.04480	2.68	207 [M-H-kafeoil] ⁻ , 189 [M-H-kafeinska kiselina] ⁻ , 127 [M-kafeinska kiselina- H ₂ O- CO ₂] ⁻	45.35
11	3-O- Feruloil kininska kiselina	6.39	367.10291	367.10168	3.35	173 [M-H-kininska kiselina] ⁻	35
12	4- Metoksicimetna kiselina	9.15	177.05517	177.05505	0.68	150.117	35
13	3,4,5- Trimetoksi- cimetna kiselina	6.48	237.0763	237.07573	2.4	163. 119	35
14	Cinarin	7.61	515.11895	515.11975	-	353 [M-H-C ₉ H ₇ O ₃] ⁻	48
15	Acil-β-D- glukozid sinapinske kiseline	6.86	385.11347	385.11246	1.55 2.63	267	
Flavonoli							
16	Kaempferid	9.56	299.05556	299.05475	2.71	284 [M-H-CH ₃] ⁻ , 243 [M- H-2CO] ⁻	46
Flavoni							
17	Tangeritin	9.15	371.11308	371.11215	2.51		43
Glikozidi							
18	Rutin	6.47	609.14556	609.14374	2.99	301 [M-H-rutinozid] ⁻	47
19	Kempferol-3-O- Rutinozid	6.84	593.15064	593.14893	2.88	285[M-H-rutinozid] ⁻	44

4.9 Uticaj brasinosteroida na sadržaj reaktivnih kiseoničnih vrsta i reaktivnih azotnih vrsta

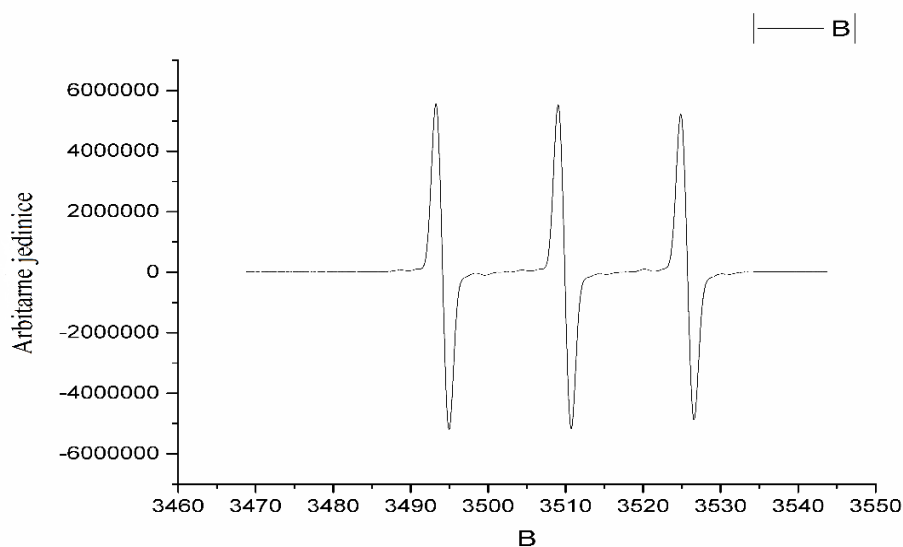
Slike 36 i 37 prikazuju uticaj različitih koncentracija 24-EBL-a na formiranje reaktivnih kiseoničnih i azotnih vrsta u klijancima hibrida ZP 434. Slobodni radikali su atomi, molekuli ili joni koji sadrže barem jedan nespareni elektron u spoljnom elektronskom omotaču, zbog čega su oni vrlo reaktivni, nestabilni i imaju visok energetski potencijal. Jedan ili više nesparenih elektrona znače slobodnu i vrlo nestabilnu valencu, zbog čega se slobodni radikali vežu za molekule sa kojima dolaze u kontakt, posebno za proteine, lipide i njima bogate biomolekulske strukture. Pritom dolazi do lančanih reakcija i brojnih oštećenja ćelija koje na taj način brže stare i ulaze u degenerativne procese (Mc Cord, 2000).

U živim organizmima, nivo slobodnih radikala i ostalih reaktivnih vrsta kontrolisan je od strane kompleksnog sistema antioksidativne odbrane koji smanjuje oštećenje biomolekula (Halliwell and Gutteridge, 2006).

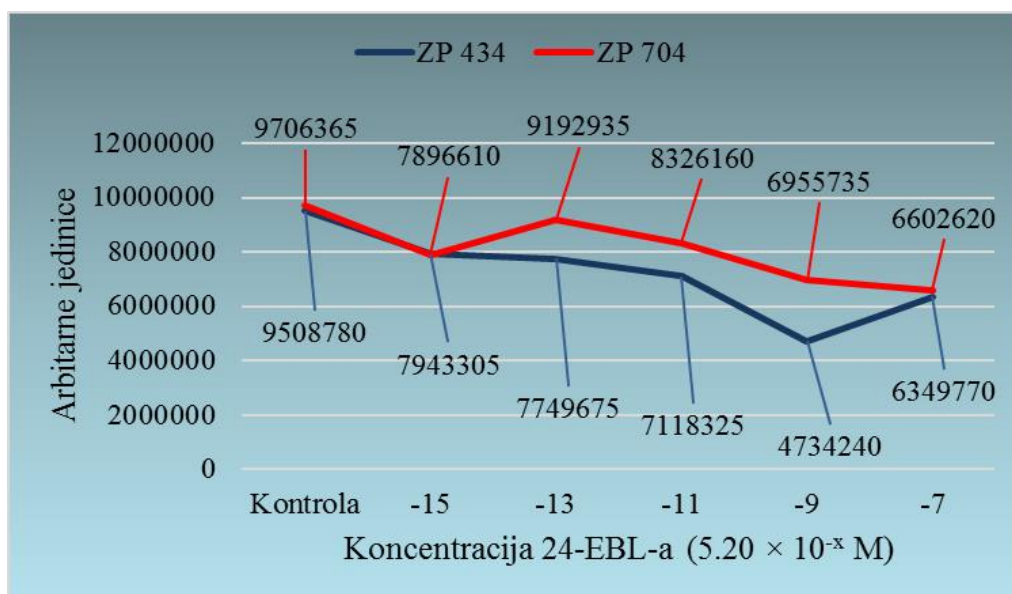
U Slici 36 ukupna površina ispod sva tri pika srazmerna je koncentraciji spinske probe u uzorku (a obrnuto srazmerna količini slobodnoradikalnih vrsta koje se generišu u uzorku). Nađeno je (Slika 37) da različite koncentracije 24-EBL-a imaju različit uticaj na sadržaj ROS-a i RNS-a. Viši EPR signal predstavlja manju ukupnu količinu ROS-a i RNS-a.

Posmatrajući hibrid ZP 434, može se primetiti da niže koncentracije 24-EBL-a utiču na povećanje ukupne količine ROS-a i RNS-a, dok je pri višim koncentracijama 24-EBL-a, količina ROS-a i RNS-a smanjena. Takođe se može primetiti da je najmanje ROS-a i RNS-a detektovano u uzorcima koji nisu tretirani 24-EBL-om.

Hibrid ZP 704 reaguje različito u odnosu na hibrid ZP 434, kada je u pitanju količina ROS-a i RNS-a. Najniže količine su takođe primećene pri kontrolnim uzorcima, dok su niske koncentracije primećene i kod koncentracije 24-EBL-a od 5.2×10^{-13} .



Slika 36. Uticaj različitih koncentracija 24-EBL-a na sadržaj ROS-a i RNS-a. Slika predstavlja očitavanje rezultata dobijenih u programu za obradu EPR signala “Eleana” (<http://larida.pl/eleana/>). X osa (B) predstavlja jačinu magnetnog polja (Gaus).



Slika 37. Uticaj različitih koncentracija 24-EBL-a na ukupan sadržaj ROS-a i RNS-a u klijancima kukuruza hibrida ZP 704 i ZP 434. Rezultati predstavljaju vrednosti u programu “Excel”, prethodno očitanih u program “Eleana”.

4.10 Uticaj 24-EBL na procese dehidracije u zavisnosti od sadržaja šećera i minerala u klijancima

Slike 17, 18, 19 i 20 prikazuju vrednosti sadržaja važnih šećera u procesu dehidracije ispitivanih klijanaca podvrgnutih različitim koncentracijama 24-EBL-a (5.2×10^{-9} , 5.2×10^{-12} i 5.2×10^{-15}) i kontrolne uzorke. Među ispitivanim saharidima (Slika 17 do 20), sadržaj sorbitola je najniži, nezavisno od koncentracije 24-EBL-a, čak i u slučaju kontrolnih uzoraka. Velike promene u sadržaju sorbitola nisu uočene, tako da variranje koncentracije 24-EBL-a nema značajnijeg uticaja. Posmatrajući ZP 434 hibrid, najveći sadržaj trehaloze je bio uočen u RoS u kontrolnom uzorku, u RoS pri najnižoj koncentraciji 24-EBL-a, i takođe u radikuli i plumuli pri najvišoj koncentraciji 24-EBL-a. Uzimajući u obzir gore navedene činjenice, pretpostavka je da 24-EBL može unaprediti vodeni status ukoliko je sistem pod stresom soli, i da utiče na prisustvo esencijalnih minerala.

Poređenjem prikazanih rezultata za hibrid ZP 434 sa rezultatima za hibrid ZP 704 (Slika 21), može se videti da je najveći sadržaj trehaloze identifikovan u kontrolnim uzorcima RoS, u svim delovima klijanca, za najnižu koncentraciju 24-EBL-a. Sve vrednosti sadržaja trehaloze su više u svim delovima klijanaca u hibridu ZP 704, od sadržaja u hibridu ZP 434 (Slika 21) Izdvojen efekat trehaloze se može pripisati formiranju veza sa membranama ili sposobnošću da modifikuje solvacioni sloj proteina. Trehaloza zauzima minimalno 2.5 puta veću zapreminu od fruktoze i glukoze. Stoga, zbog njene velike hidratacione zapremine, trehaloza može zameniti više molekula vode od fruktoze i glukoze (Sola-Penna and Meyer-Fernandes, 1998). Iz gore navedenih razloga, trehaloza može imati veliki uticaj na termalnu aktivaciju pri dehidratacionom procesu i takođe se može zaključiti da može imati uticaja na moguću promenu reakcionog mehanizma tokom dehidratacionog i termalnog stresa.

S druge strane, velike promene u sadržaju ostalih šećera kao što su glukoza, fruktoza i saharoza, se mogu uočiti za sve delove klijanaca tretirane svim koncentracijama 24-EBL-a, i kontrolne uzorke za oba hibrida (Slika 17 i 18) Kao što se može videti za plumulu, a i za radikulu, sadržaj glukoze i fruktoze je veliki za oba hibrida u odnosu na ostale šećere (Slika 17 do Slika 20), što ima direktan uticaj na

sadržaj saharoze. Veoma visok sadržaj saharoze je identifikovan u plumuli oba hibrida, posebno na koncentraciji 24-EBL-a od 5.2×10^{-12} (Slika 18). Viši sadržaj saharoze je neophodan u procesu imbibicije i u procesu tolerancije na sušu. Porast u sadržaju saharoze u radikuli i plumuli (Slika 18) je verovatno posledica uticaja saharoze na razvoj embriona, što se u rezultatima poklapa sa početnim stadijumima tolerancije semena na desikaciju.

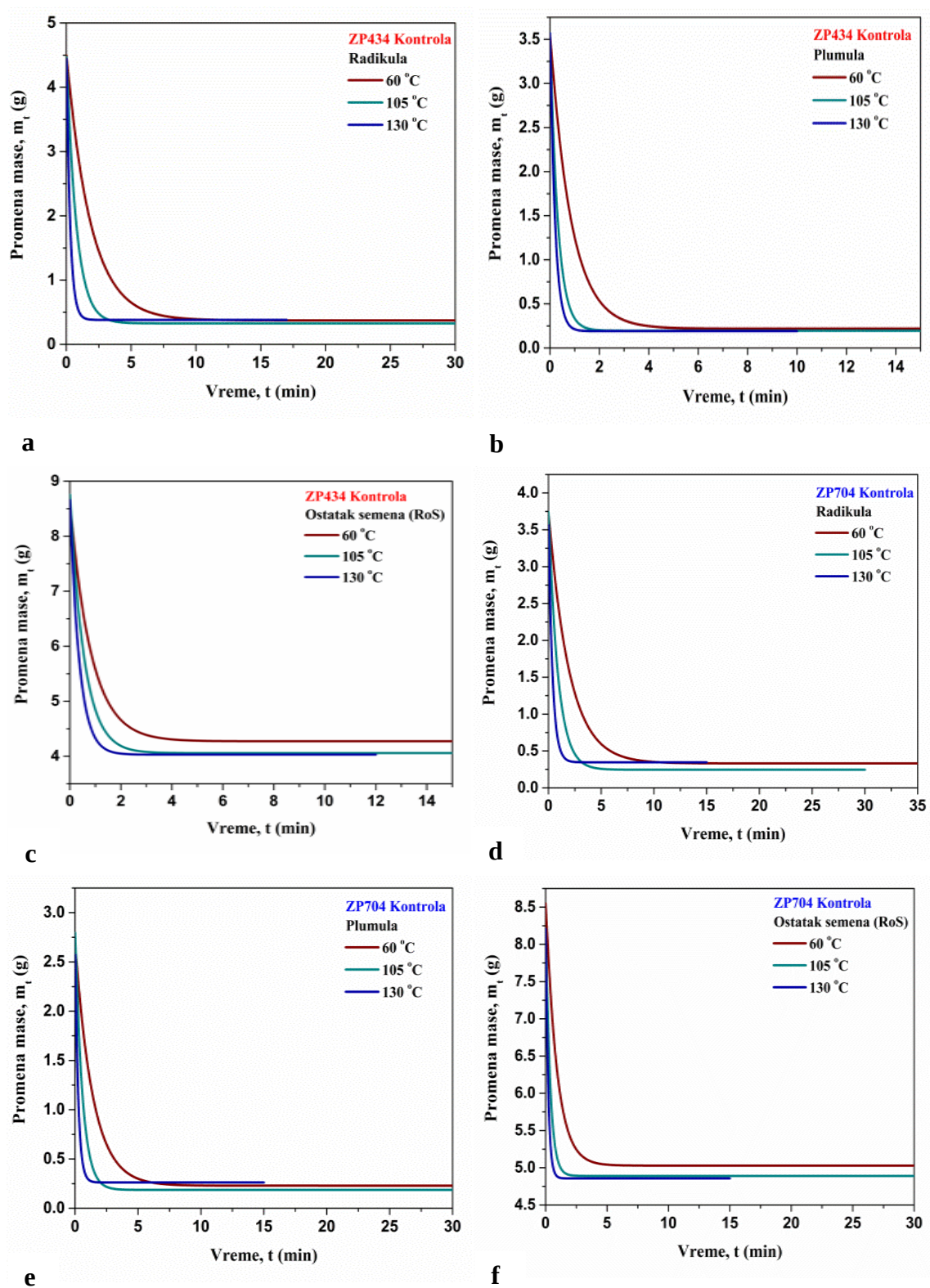
Tabele 9 i 10 pokazuju sadržaj najvažnijih minerala u procesu dehidratacije, uključujući sve delove klijanaca na ispitivanim koncentracijama 24-EBL-a (5.2×10^{-9} , 5.2×10^{-12} , 5.2×10^{-15}) i kontrolne uzorke klijanaca. Iz date analize elemenata možemo videti da sadržaj (nezavisno od uticaja 24-EBL-a) Fe, K i P viši za hibrid ZP 704 od sadržaja u hibridu ZP 434. Može se videti da je za sve kontrolne uzorke, nezavisno od koncentracije, sadržaj Fe viši za hibrid ZP 704 od hibrida ZP 434 za sve delove klijanaca. Ipak, najviši sadržaj Fe (Tabela 9) je identifikovan pri koncentraciji 24-EBL-a od 5.2×10^{-12} za ZP 704. Na najnižoj koncentraciji za plumulu u okviru hibrida ZP 704, nivo gvožđa je ispod detekcione granice identifikacije, a isti fenomen se zapaža i za RoS pri najvišoj ispitivanoj koncentraciji 24-EBL-a (5.2×10^{-9}) za hibrid ZP 434. Ove promene u nivou gvožđa, posebno za hibrid ZP 434, mogu se pripisati inhibiciji rastenja delova klijanaca, što se javlja pri ograničenom sadržaju fosfora (Tabela 10) i mogu biti pripisane regulatornom mehanizmu fosforilacije. Naime, inhibicija može biti pripisana toksičnim efektima gvožđa koje verovatno nije više u kompleksnom sistemu sa fosfatom, čime je povećan individualni uticaj i biodostupnost fosfora (Celik *et al.*, 2009). Na osnovu rezultata, može se zaključiti da 24-EBL više utiče na hibrid ZP 434 u smanjenju toksičnih efekata gore navedenih elemenata (Tabela 10). Ovo smanjenje je povezano sa manjim jonskim usvajanjem i porastom aktivnosti ATP-aze. Regulacija aktivnosti H^+ -ATP-aze, ne samo što omogućava usvajanje nutrijenata, već kontroliše i vodene flukseve, čime indirektno utiče na procese dehidratacije (Sze *et al.*, 1999). Najveći sadržaj kalijuma je zapažen u radikuli za hibrid ZP 704, pri najvišoj koncentraciji 24-EBL-a, ali sa značajnim opadanjem pri svim ostalim koncentracijama, posmatrajući oba hibrida (Tabela 9 i 10). Porast nivoa kalijuma može dovesti do porasta nivoa fenola, što može imati veliku ulogu pri odgovorima biljke na stres (Koch and Mengel, 1974). Opadanje nivoa kalijuma u radikuli i plumuli (Tabela 9. i 10.), pri kontrolnim uzorcima uzimajući rezultate hibrida ZP 434 u poređenju sa hibridom ZP

704, može sniziti otpornost klijanaca hibrida ZP 434 prema stresu suše. Održavanje nivoa kalijuma je neophodno u procesima vezanim sa tolerancijom na sušu. Iz Tabela 9 i 10, se može zaključiti da različite koncentracije 24-EBL-a utiču na promenu u sadržaju kalijuma u delovima klijanaca oba hibrida. Viši sadržaj kalijuma u hibridu ZP 704, u poređenju sa hibridom ZP 434 može uticati na vlažnost semena. Najviši sadržaj fosfora je primećen u RoS hibrida ZP 704, pri koncentraciji od 5.2×10^{-9} i 5.2×10^{-12} (Tabela 9). Treba napomenuti da takvo povećanje fosfora u hibridima ZP 704 prati povećanje kalijuma pri koncentraciji 24-EBL-a od 5.2×10^{-9} i 5.2×10^{-12} , dok takve promene nisu zabeležene za kontrolne uzorke. Poznato je da interakcija fosfora i vode može povećati akumulaciju suve materije i predstavlja pozitivan efekat interakcije vode i fosfora (Galmes *et al.*, 2007).

4.11 Analiza dehidratacionih krivi dobijenih iz izotermnih merenja

Iz Slike 38. se može videti da za kontrolne uzorke hibrida ZP 434 uzorke, vrednosti promena u masi, za radikulu, plumulu i RoS, pokazuju variranja i da te promene nisu jednake. Najmanji gubitak u masi pokazuje RoS, što nije slučaj za plumulu i radikulu (Slika 38). Sve dehidratacione krive pokazuju brzi gubitak u masi u prvih 60 sekundi od početka zagrevanja, praćeni periodom sporijim ali konstantnijim gubitkom mase. Krive na najnižim temperaturama pokazuju najniži gubitak u masi na kraju 15min eksperimenta. Ovi uzorci zadržavaju veću količinu vode od uzoraka merenih na višim temperaturama (Slika 38 od (a) do (c)). Od svih razmatranih slučajeva, plumula pokazuje najviši stepen gubitka vode u odnosu na ostale delove klijanca za hibrid ZP 434. Sa porastom temperature, sve dehidratacione krive za posmatrani hibrid se pomeraju u oblasti kraćih vremenskih intervala, što je karakteristično za dehidratacione krive prouzrokovane termalnim stresom.

Sa druge strane, dehidratacione krive kontrolnih uzoraka vezane za hibrid ZP 704 pokazuju drugačije ponašanje. Naime, dehidratacione krive za radikulu, plumulu i RoS (Slika 38 od (d) do (f)), pokazuju veće varijacije u vrednostima preostale mase sa promenom temperature.



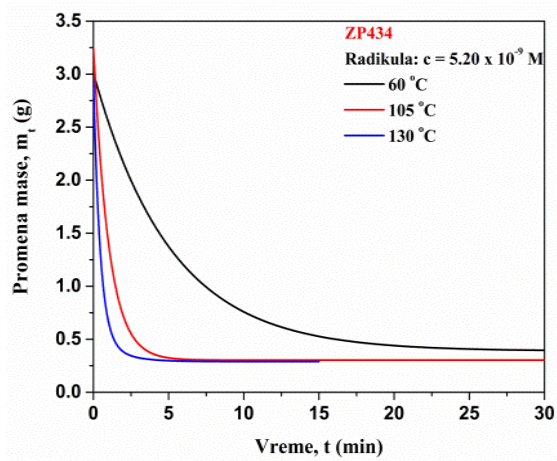
Slika 38. Gubitak mase ($\Delta T = 60 - 130^{\circ}\text{C}$) za procese dehidracije kontrolnih uzoraka hibrida ZP434 i ZP704 svih delova klijanaca: radikula ((a), (d)), plumula ((b), (e)), i RoS ((c), (f)), redom.

Ipak, za razliku od dehidratacionih krivi kontrolnih uzoraka za hibrid ZP 434, aktuelne krive su mnogo strmije i vidi se da hibrid ZP 704 brže gubi vodu i to u prvih 60 sekundi, tako da se može videti da se izuzetno brzi gubitak u masi dostiže već u prvih 45 sekundi od početka zagrevanja klijanaca. Na osnovu oblika dehidratacionih krivi za oba hibrida, može se videti da je dostignuta kompletna dehidratacija. Uravnotežavanje (saturacija) do konstantnosti mase se javlja na svakoj temperaturi, ukazujući na to da ne postoje zaostale količine vode posle termičkog tretmana klijanaca u datim vremenskim intervalima.

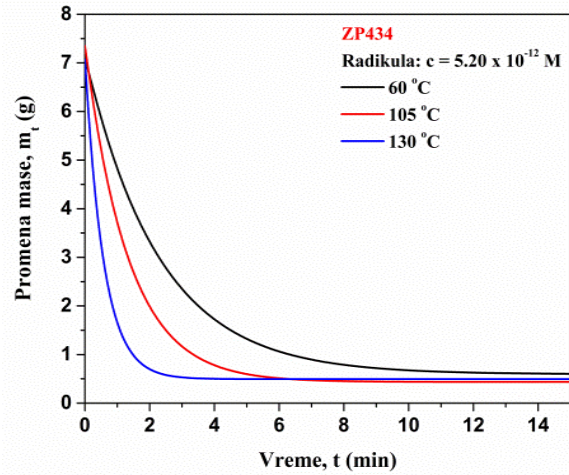
Poredeći ove dehidratacione krive sa Slikom 38., aktuelne dehidratacione krive za oba hibrida se razlikuju u nagibima i brzini dehidratacije u različitim vremenskim periodima. Za hibrid ZP434, u slučaju radikule tretirane koncentracijom 24-EBL-a od 5.2×10^{-9} M (Slika 39 (a)) pokazuje najveće rastojanje između dehidratacionih krivi, gde se pri nanižoj temperaturi događa najsporiji dehidratacioni proces u poređenju sa ostalim dehidratacionim krivama na preostale dve niže koncentracije (Slika 39 (b) do (c)). Ipak, posmatrajući koncentracione krive na niskim koncentracijama 24-EBL-a (5.2×10^{-12} M i 5.2×10^{-15} M), kada su radikula, plumula i RoS u pitanju (Slika 39 (b), (c), (e), (f), (h) i (i)), može se zaključiti da pokazuju različito ponašanje od krivi na Slici 38.

Takođe, primećuje se da su pri koncentraciji od 5.2×10^{-12} M, dehidratacione krive za radikulu i plumulu (Slika 39 (b) i (e)) (osim u slučaju RoS)) na istom odstojanju, što sugerise da se dehidratacioni procesi odigravaju istom brzinom. Može se primetiti da i za kontrolne uzorke dolazi do promena masa kao i u uzorcima tretiranim 24-EBL-om, s tim što je to manje izraženo za tretirane uzorke, osim u slučaju RoS (Slika 39 (g), (h) i (i)).

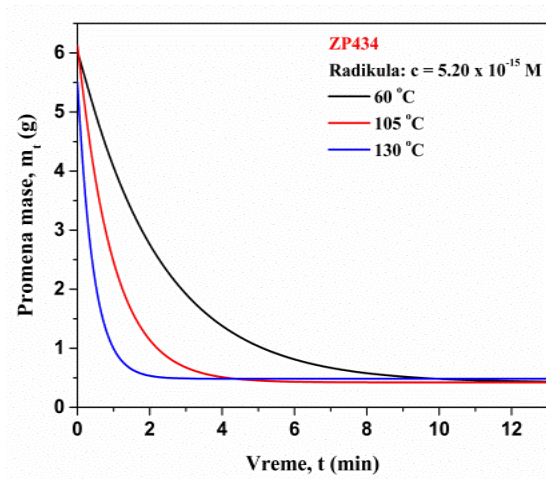
U svim posmatranim slučajevima, dehidratacioni proces se završava u mnogo kraćem vremenskom periodu za hibrid ZP 704, u odnosu na hibrid ZP 434. Ipak, za razliku od kontrolnih uzoraka hibrida ZP 434, klijanci tretirani bilo kojom koncentracijom 24-EBL-a, su otporniji na procese dehidratacije. U slučaju radikule za hibrid ZP 704, pri koncentraciji 5.2×10^{-12} , Slika 39 (j) pokazuje veće variranje preostalih masa na višim temperaturama, dok je dehidrataciona kriva plumule na 60°C, pri istoj koncentraciji 24-EBL-a (Slika 39 (m)), najudaljenija od drugih dehidratacionih krivi, ukazujući na značajno variranje u njihovim brzinama dehidratacije.



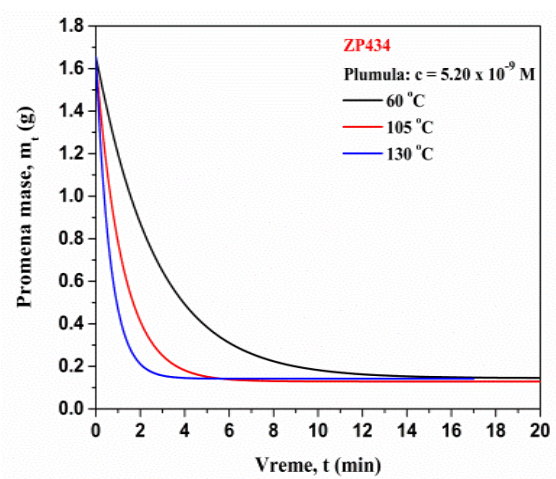
a



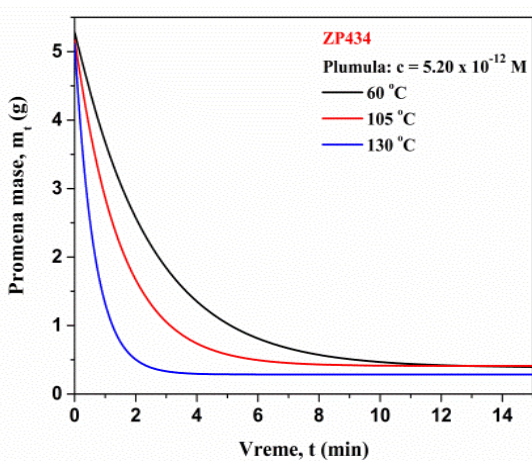
b



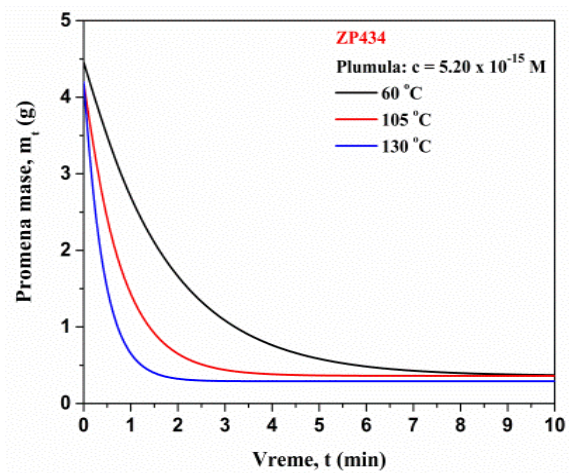
c



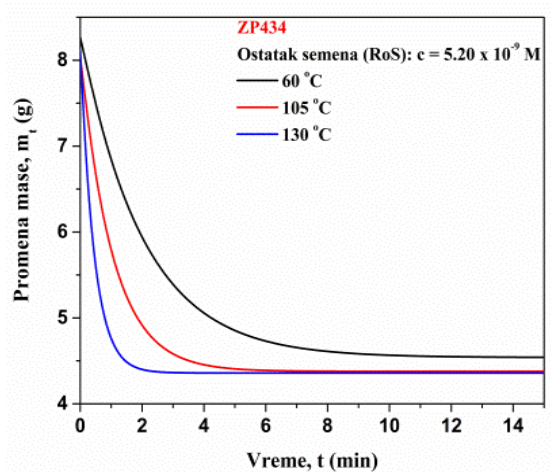
d



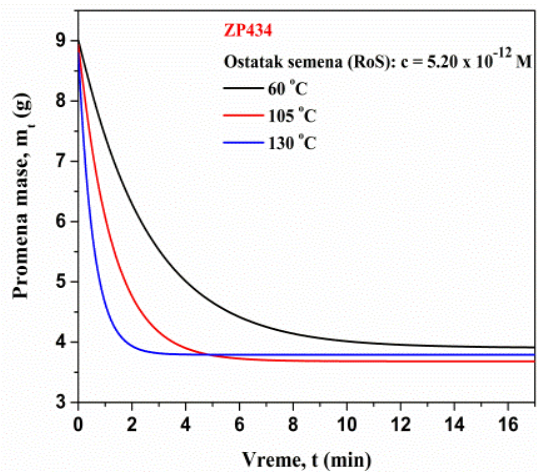
e



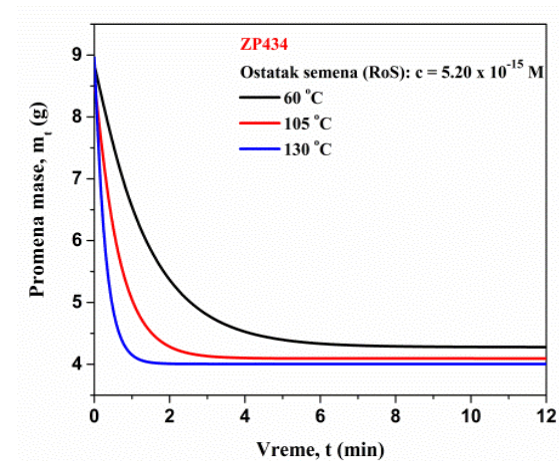
f



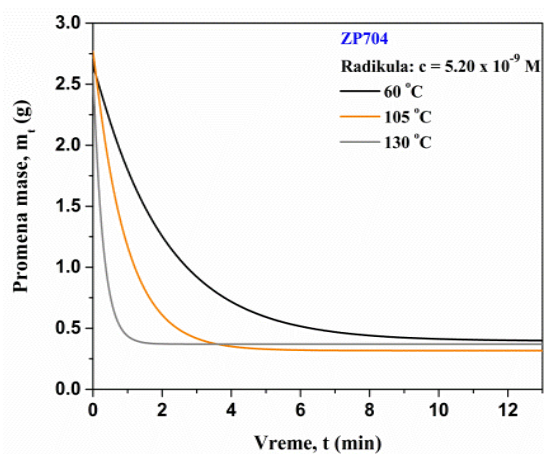
g



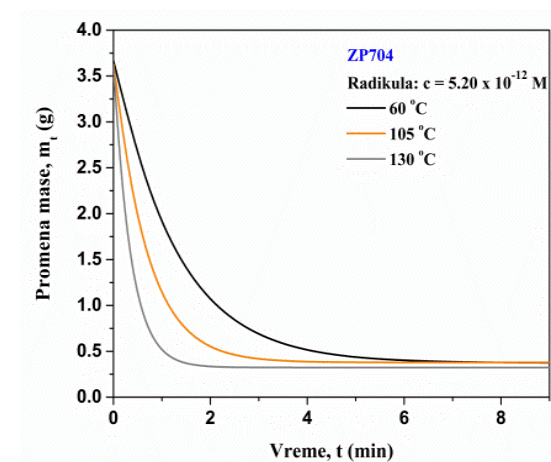
h



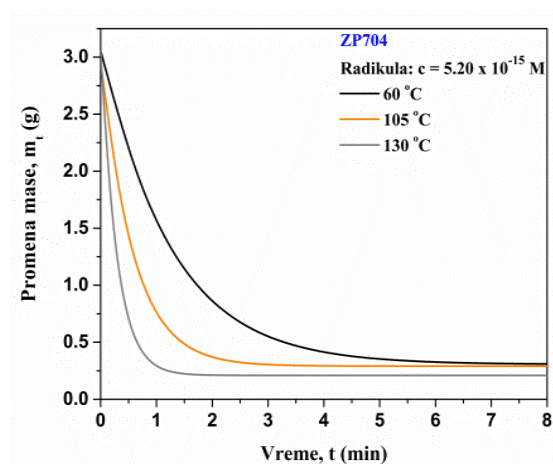
i



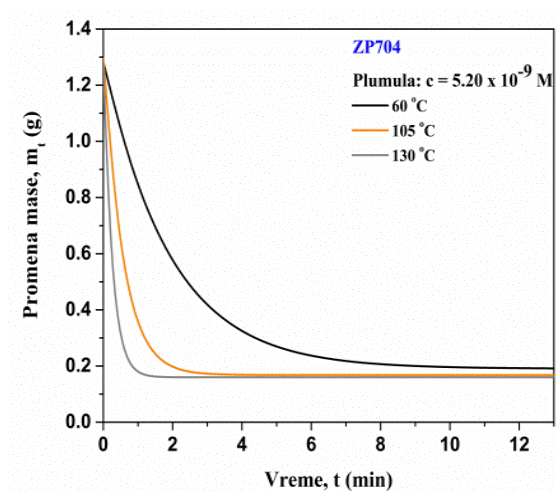
j



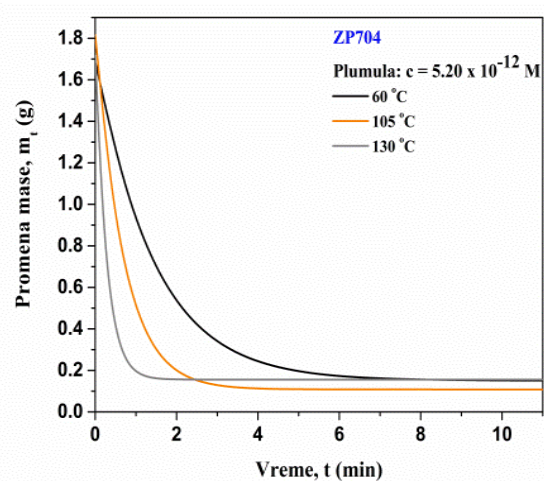
k



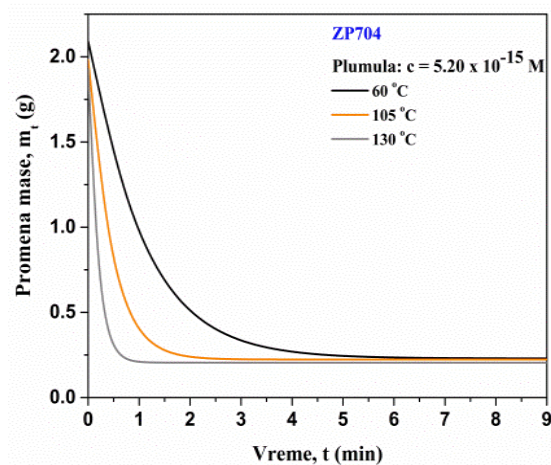
l



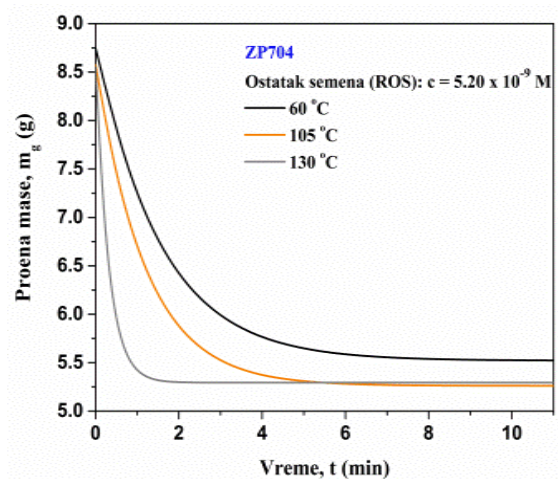
m



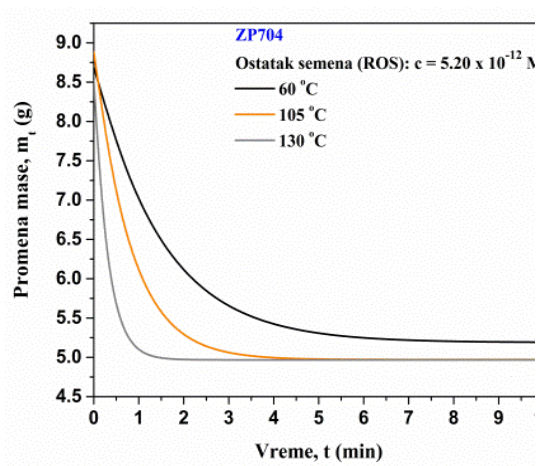
n



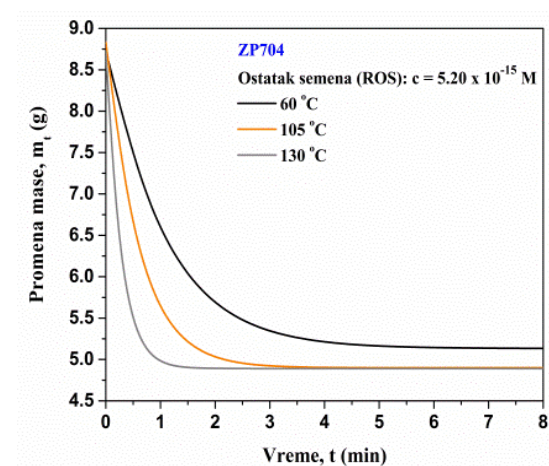
o



p



q



r

Slika 39. Gubitak mase ($\Delta T = 60 - 130^\circ\text{C}$) (a) do (r) za procese dehidratacije hibrida ZP434 i ZP704 tretiranih različitim koncentracijama 24-EBL-a (5.2×10^{-9} M, 5.2×10^{-12} M, i 5.2×10^{-15} M), u svim delovima klijanaca.

Pri nižim koncentracijama 24-EBL-a, stepen varijacije u ostacima mase raste posmatrajući delove klijanaca od radikule ka RoS (Slika 39 (k), (l), (n), (o), (q) i (r)). Najniži gubitak mase je primećen pri najnižoj temperaturi (60°C) pri nižim koncentracijama 24-EBL-a (5.2×10^{-12} M i 5.20×10^{-15} M), uključujući RoS (Slika 39 (q) i (r)).

Na osnovu ovih rezultata, očigledno je da koncentracija 24-EBL-a utiče na strmost dehidracionih krivi, a samim tim utiče i na funkcionalnu zavisnost brzine dehidracije od reakcionog vremena na različitim temperaturama (Brown and Galwey, 1989).

4.12 Analiza dehidracionih reakcionih profila koji oslikavaju zavisnosti prividne energije aktivacije (E_a) od stepena dehidracije (α)

Slika 40 (a) do (b) pokazuje variranje prividne energije aktivacije (E_a) od stepena dehidracije (α), za hibride klijanaca ispitivanih kukuruza, korišćenjem integralne i diferencijalne (FR) izokonverzije metode.

Na osnovu “grubog” posmatranja rezultata možemo primetiti da zavisnost $E_a - \alpha$, za sve klijance posmatranih hibrida nije ista i pokazuje različito ponašanje, gde oblasti konstantnosti vrednosti E_a ne zauzimaju iste regione. Na osnovu rezultata može se preliminarno zaključiti da mehanizmi dehidracionih procesa u posmatranim klijancima nisu isti.

Na početku procesa, u ranom stadijumu (do 25 % α) (Slika 40 (a) do (b)) (osim za slučaj RoS hibrida ZP704 (Slika 40 (b))), u oba sistema, svi delovi klijanaca pokazuju značajnu osetljivost na termalni stres, tako da vrednost E_a raste. Ukoliko posmatramo samo brojčane vrednosti za E_a (koje ne prelaze 20 kJ mol⁻¹ u središnjem delu procesa), onda se može zaključiti da njihovi dehidracioni putevi pokazuju slične (ali ne identične) karakteristike. U tom slučaju se mogu očekivati slični mehanizmi nakon uspostavljanja konstantnosti u vrednostima prividne E_a . Ipak, porast u vrednostima prividne E_a u početnom stadijumu procesa (izuzev za RoS hibrida ZP 704) (Slika 40 (a) do (b)), sugerise da dehidracija ne prati određen specifičan reakcioni

model, odnosno da se za proces na osnovu prikazanih rezultata još uvek ne može reći da li je usled dehidracije kod klijanaca došlo do morfoloških promena ili je u pitanju uticaj sporednih hemijskih reakcija.

U slučaju hibrida ZP 704 (Slika 40 (b)), za dehidratacione procese vezane za radikulu i plumulu, javlja se trend pada vrednostiednosti prividne E_a sa porastom α na početku procesa. Ovakav trend odgovara procesu koji uključuje dve reakcione oblasti. Prva, sa bržim opadanjem vrednosti E_a ($\alpha \leq 0.10$) i druga sa sporijim opadanjem vrednosti E_a ($0.10 \leq \alpha \leq 0.25$), (Slika 40 (b)). Ovo ponašanje pripada kompleksnoj procesnoj shemi koja uključuje povratnu reakciju (Vyazovkin and Wight, 1997).

S obzirom na postojanje kompleksne reakcione sheme, ona obuhvata reverzibilnu (povratnu) reakciju u jednom stupnju, a koja je zatim praćena ireverzibilnom (nepovratnom) reakcijom u sledećem stupnju. Za takvu reakcionu shemu, prividna energija aktivacije (koja predstavlja kompozitnu veličinu) je ograničena zbirom energije aktivacije (E) nepovratne reakcije i entalpije povratne reakcije, pri niskim vrednostima α .

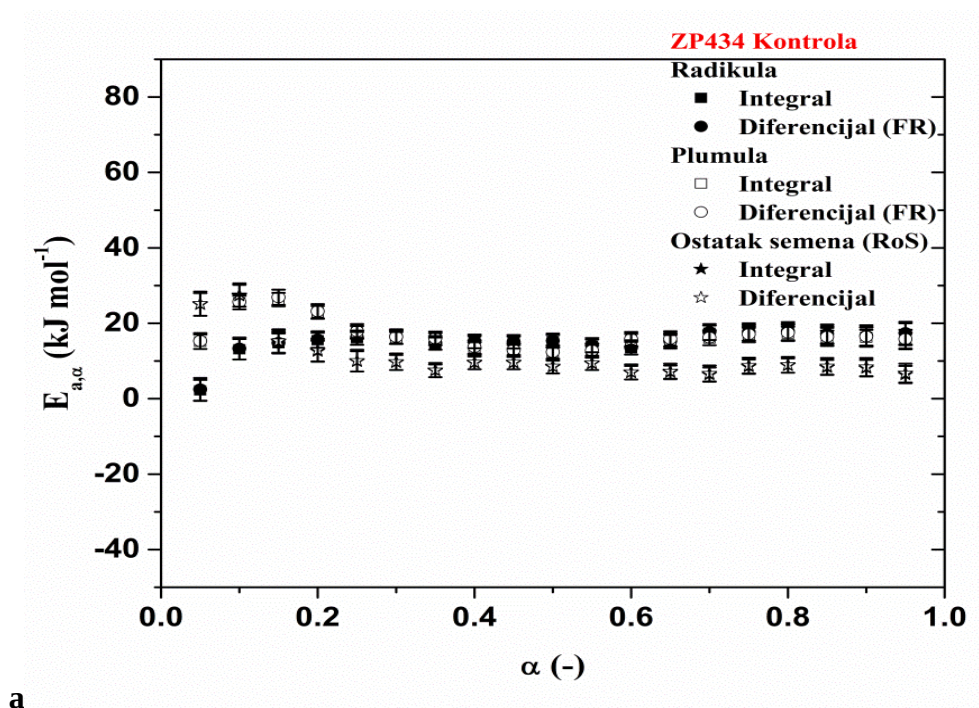
Pri niskim vrednostima α , mali deo molekula vode je nepovratno ispario iz klijanaca i to se odnosi na ireverzibilnu reakciju, a povratna reakcija se u klijanima odnosi na mogućnost povratka vode na početne adsorpcione centre. Poslednje navedeno ima endoternmi efekat koji je povezan sa entalpijom procesa kao termodinamičkom veličinom. Međutim, sa porastom vrednosti α , energija aktivacije postaje ograničena samo energijom aktivacije ireverzibilne reakcije (visoko α), odnosno, dominiraju reakcije isparavanja vode iz klijanaca, dok se udeo molekula vode ponovo adsorbovane na početnim adsorpcionim centrima drastično smanjuje.

Sa druge strane, za hibrid ZP 434, posmatrajući sve delove klijanaca (Slika 40 (a)), oblik zavisnosti E_a - α pokazuje nešto drugačiji oblik na početku istog procesa. Oblik E_a - α zavisnosti u ranom stadijumu dehidratacionog procesa za sve delove klijanca (Slika 40 (a)), pokazuje prisustvo istovremenog pojavljivanja višestrukih složenih reakcionih stupnjeva praćenih difuzijom (Vyazovkin and Wight, 1997). U tom slučaju E_a vrednosti formiraju takav oblik krive da eksperimentalne tačke pokazuju odstupanje, formirajući krivu konkavnu prema gore (Slika 40 (a)). Samo ukoliko je jedan od dva reakciona stupnja mnogo brži od drugog, ukupnu brzinu dehidracije

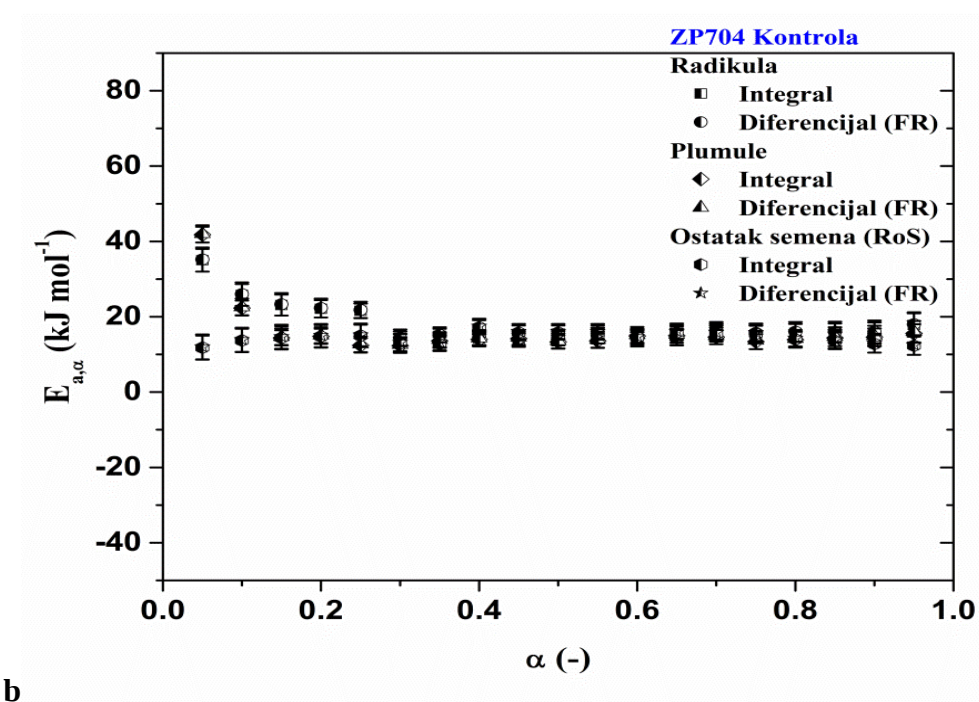
određuje najsporiji supanj i tada eksperimentalna vrednost prividne energije postaje energija aktivacije aktuelnog stupnja (tj. $E_a = E_R$ je kinetički kontrolisan proces ili $E_a = E_D$ je difuziono kontrolisan proces, što zavisi od odnosa konstanti brzina dva kinetička režima).

Reakcija sa višom E_a vrednošću za hibrid ZP 704 (Slika 40 (b)), teži da ima slabiju inerakciju sa reakcionom površinom i iz tog razloga će imati uvećanu pokretljivost koja se odražava u većoj entropiji. Ipak, visoka frekvencija vibracije između reakcione površine i molekula vode, ukazuje na jaku vezu, što ukazuje na višu E_a vrednost, što se može uočiti u slučaju svih delova klijanaca hibrida ZP 704, u kasnijim stadijumima dehidratacionog procesa ($\alpha > 0.7$) (Slika 40 (a)).

Početni stadijumi dehidratacionih procesa su kompleksni i uključuju nekoliko reakcija sa različitim zavisnostima od vremena. Ipak, za oba hibrida (Slika 40 (a) i (b)), u oblastima u kojima je vrednost E_a približno konstantna (ZP 434 (kontrola), Slika 40 (a): a) Radikula: $\langle E_a \rangle_{\text{Int}} = 15.7 \pm 1.9 \text{ kJ mol}^{-1}$, $\langle E_a \rangle_{\text{FR}} = 15.9 \pm 2.1 \text{ kJ mol}^{-1}$ (za $0.20 \leq \alpha \leq 0.90$), b) Plumula: $\langle E_a \rangle_{\text{Int}} = 15.1 \pm 1.8 \text{ kJ mol}^{-1}$, $\langle E_a \rangle_{\text{FR}} = 15.3 \pm 2.0 \text{ kJ mol}^{-1}$ (za $0.30 \leq \alpha \leq 0.90$), c) RoS: $\langle E_a \rangle_{\text{Int}} = 8.4 \pm 1.9 \text{ kJ mol}^{-1}$, $\langle E_a \rangle_{\text{FR}} = 8.6 \pm 2.1 \text{ kJ mol}^{-1}$ (za $0.25 \leq \alpha \leq 0.90$); ZP 704 (kontrola), Slika 40 (b): a) Radikula: $\langle E_a \rangle_{\text{Int}} = 14.9 \pm 2.1 \text{ kJ mol}^{-1}$, $\langle E_a \rangle_{\text{FR}} = 15.1 \pm 2.3 \text{ kJ mol}^{-1}$ (za $0.30 \leq \alpha \leq 0.90$), b) Plumula: $\langle E_a \rangle_{\text{Int}} = 13.9 \pm 2.0 \text{ kJ mol}^{-1}$, $\langle E_a \rangle_{\text{FR}} = 14.2 \pm 2.2 \text{ kJ mol}^{-1}$ (za $0.25 \leq \alpha \leq 0.90$), c) RoS: $\langle E_a \rangle_{\text{Int}} = 14.9 \pm 2.2 \text{ kJ mol}^{-1}$, $\langle E_a \rangle_{\text{FR}} = 15.2 \pm 2.3 \text{ kJ mol}^{-1}$ (za $0.15 \leq \alpha \leq 0.85$)), za proces dehidratacije se može pretpostaviti da prati mehanizam koji se odvija u jednom stupnju i u tom slučaju se eksperimentalni podaci mogu modelirati u cilju potpunog fizičko-hemijskog objašnjenja mehanizma dehidratacije.



a



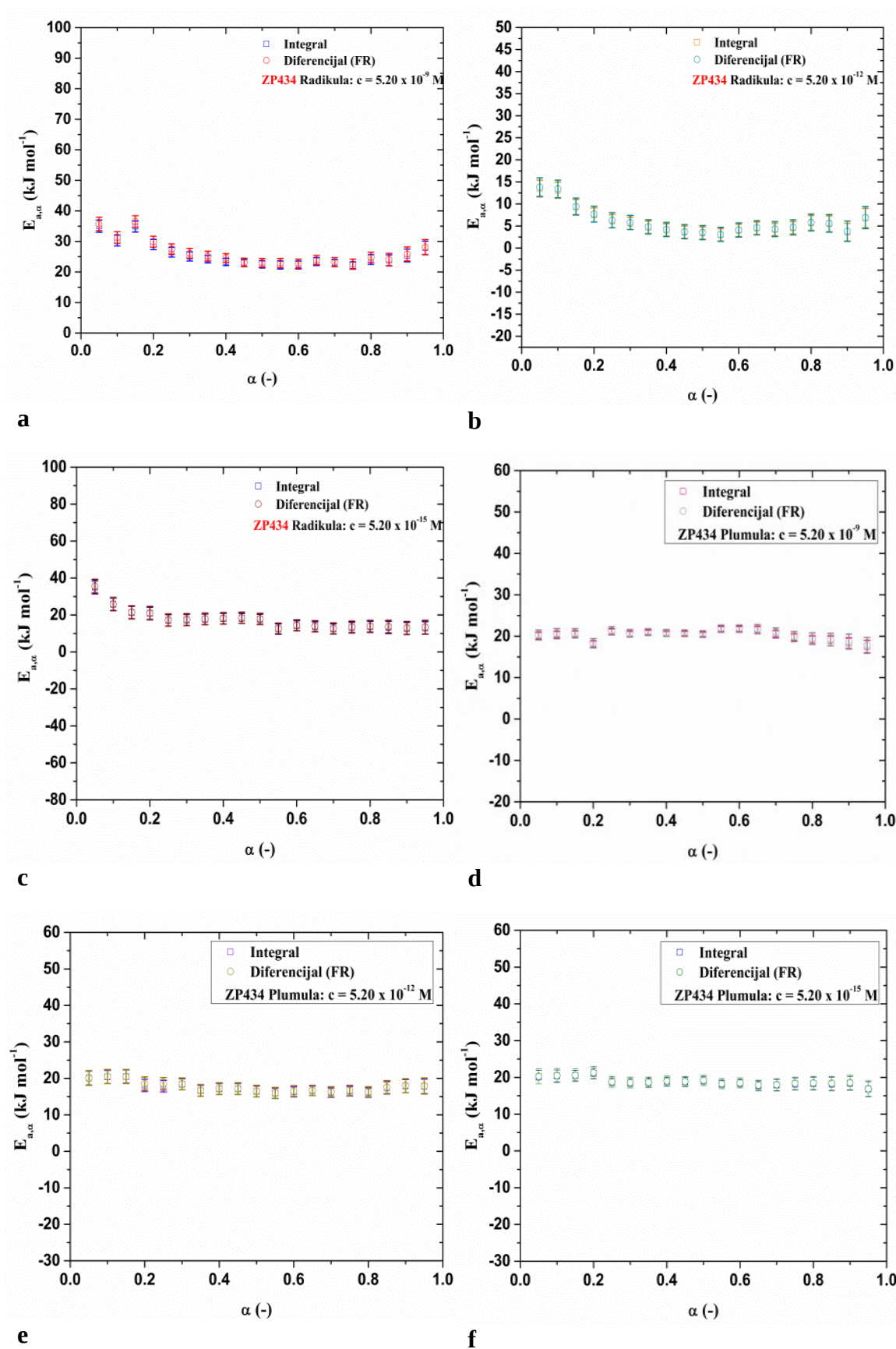
b

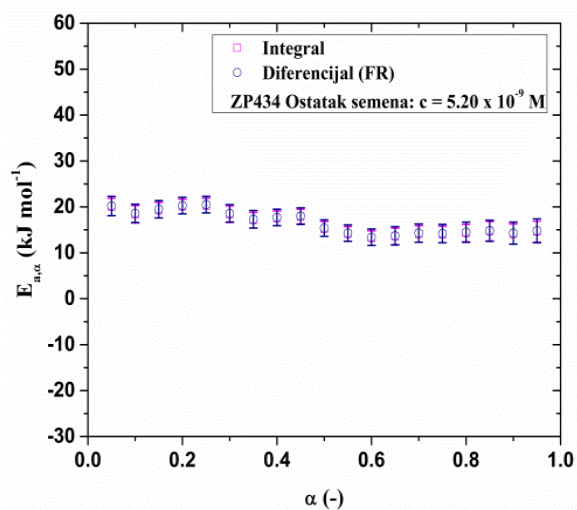
Slika 40. (a) do (b) variranje prividne energije aktivacije (E_a) od stepena dehidracije (α), za hibride klijanaca ispitivanih kukuruza, korišćenjem integralne i diferencijalne (FR) izokonverzione metode.

Slika 41 (a) do (i) i (j) do (r), pokazuje variranje prividne energije aktivacije u zavisnosti od stepena dehidracije ($E_a - \alpha$) za procese dehidracije za sve delove klijanaca tretirane različitim koncentracijama 24-EBL-a, korišćenjem integralne i diferencijalne (FR) izokonverzije metode. U posmatranim slučajevima, za klijance tretirane različitim koncentracijama 24-EBL-a, njihove $E_a - \alpha$ zavisnosti pokazuju variranje koje se razlikuje u odnosu na kontrolne uzorke (Slika 41 (a) i (b)) i pokazuju specifične osobine u slučaju svih delova klijanaca.

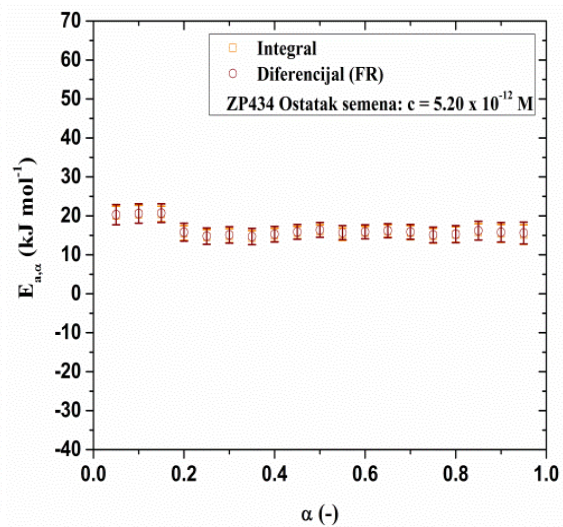
Za hibride ZP 434, opadanje koncentracije 24-EBL-a dovodi do promena u $E_a - \alpha$ zavisnostima za dehidracioni proces radikule, dok srednje koncentracije od 5.2×10^{-12} M održava vrednost E_a na najnižem nivou, za razliku od ostale dve koncentracije (Slika 41 (a) do (c)). Variranje $E_a - \alpha$ je najmanje na najnižoj koncentraciji 24-EBL-a pri dehidraciji radikule. Sa druge strane, u slučaju hibrida ZP 704, variranje $E_a - \alpha$ je nešto drugačije. Naime, radikula pokazuje gotovo identičan oblik $E_a - \alpha$ zavisnosti na svim koncentracijama 24-EBL-a (Slika 41 (j) do (l)), slično zavisnosti E_a sa α , u slučaju radikule za kontrolni test (Slika 30 (b)). U tom smislu, prisustvo različitih nivoa 24-EBL-a ne utiče na dehidracioni reakcioni profil radikule za hibrid ZP 704.

U slučaju plumule, prisustvo različitih koncentracija 24-EBL-a (Slika 41 (m) i (n)), stabilizuje vrednosti E_a u poređenju sa vrednostima u kontrolnim uzorcima (40 (b)). Prisustvo koncentracije 24-EBL-a od 5.20×10^{-15} M (Slika 41 (o)), dovodi do porasta u vrednostima E_a na početku dehidracionog procesa kao što je to bio slučaj kod kontrolnih uzoraka (Slika 40 (b)). Može se zapaziti da koncentracija 24-EBL-a ima najveći uticaj na promenu $E_a - \alpha$ profila za radikulu i plumulu kod hibrida ZP 434, a isto tako i na $E_a - \alpha$ profil za plumulu u okviru hibrida ZP 704 pri koncentraciji od 5.2×10^{-9} M i 5.2×10^{-12} M (Slika 41).

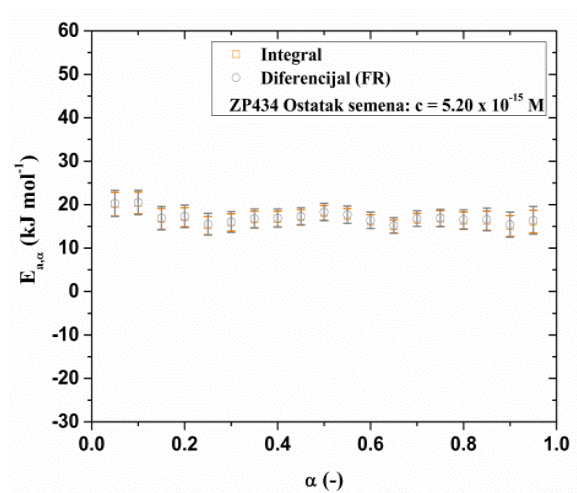




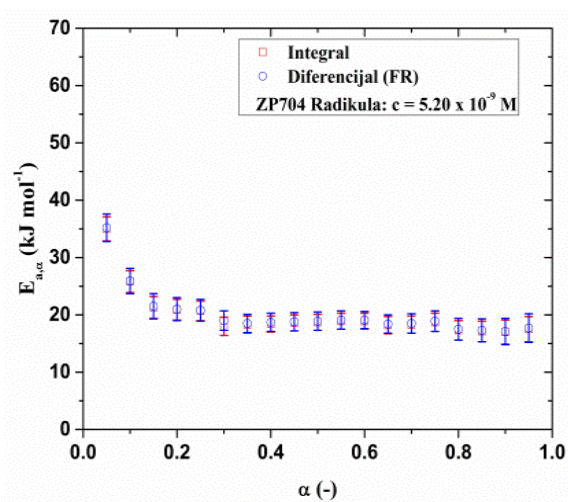
g



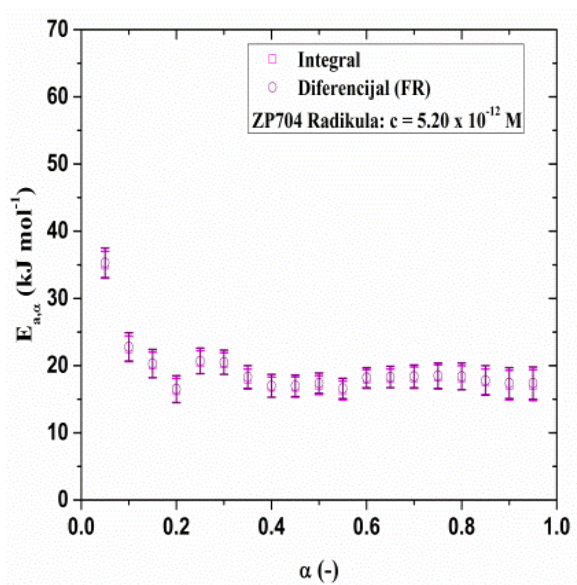
h



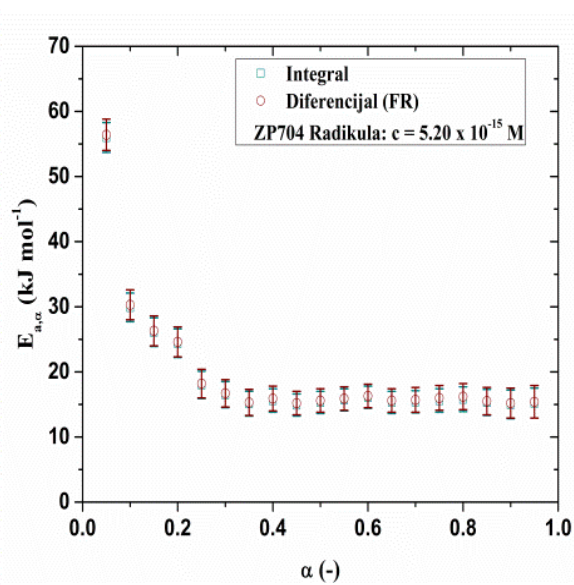
i



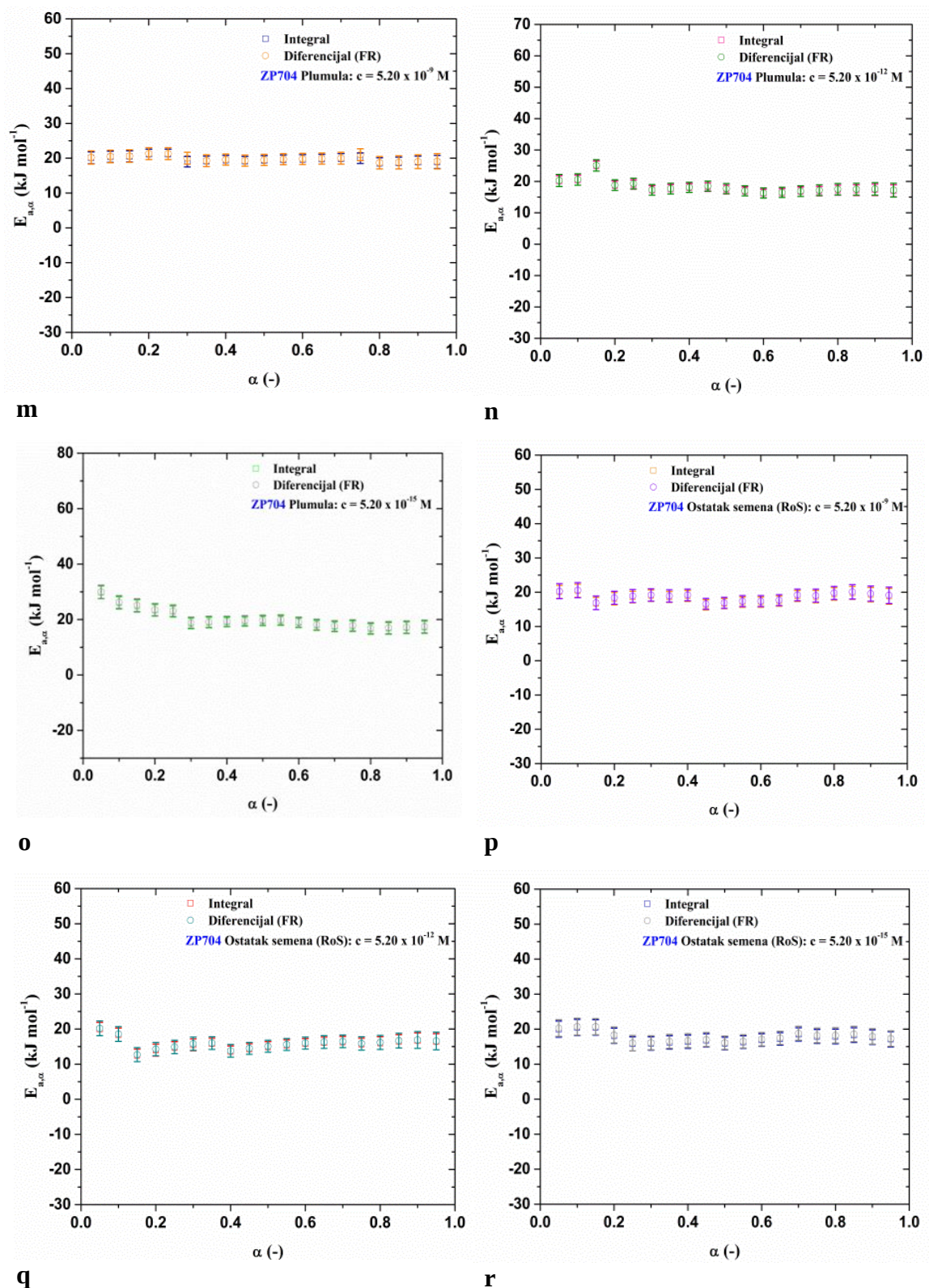
j



k



l



Slika 41. (a) do (i) i (j) do (r), variranje prividne energije aktivacije od stepena dehidracije ($E_{a\alpha}$ - α) za procese dehidracije za sve delove klijanaca tretirane različitim koncentracijama 24-EBL-a, korišćenjem integralne i diferencijalne (FR) izokonverzije metode.

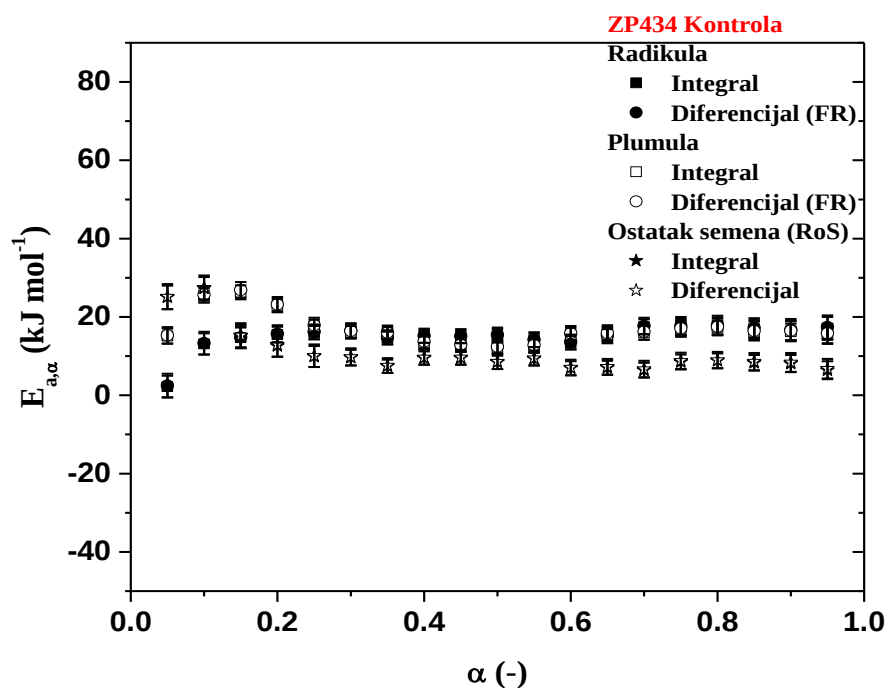
Slika 42 pokazuje prosečne vrednosti prividne energije aktivacije, izračunate integralnom i diferencijalnom izokonverzionom metodom i uključuje sve delove klijanaca, u α region kada vrednosti E_a pokazuju skoro identične vrednosti.

Poredeći dobijene rezultate za vrednosti E_a svih delova klijanaca oba hibrida sa kontrolnim uzorcima (Slika 40 i 41), može se zapaziti da su vrednosti veoma slične, izuzev za radikulu u okviru hibrida ZP 434 na koncentraciji 24-EBL-a od 5.2×10^{-12} M i za RoS hibrida ZP 434 na svim koncentracijama 24-EBL-a, u poređenju sa vrednostima kontrolnih uzoraka (Slika 42).

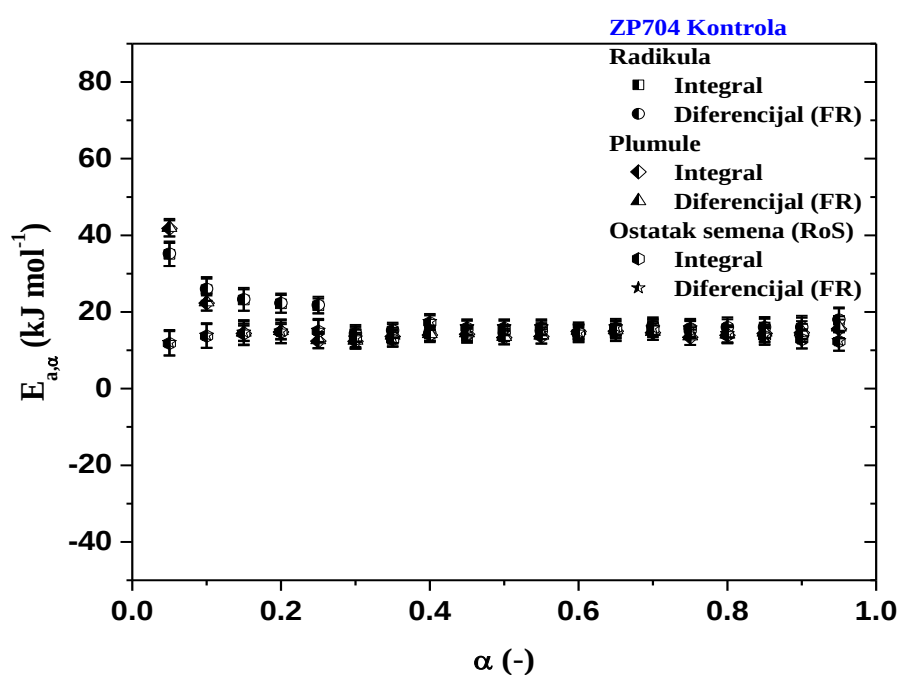
Koncentracija od 5.2×10^{-12} M utiče na snižavanje energetske barijere za oslobađanje vode iz sistema u slučaju radikule hibrida ZP 434, što je suprotno od kontrolnih uzoraka. Imajući u vidu da je trehaloza najaktivniji ugljeni hidrat u očuvanju strukture i funkcije bioloških sistema tokom dehidracije (Sun and Davidson, 1998), može se zaključiti da je u slučaju radikule hibrida ZP 434, E_a vrednost direktno proporcionalna koncentraciji navedenog šećera (Slika 21). Vrednosti prividne E_a za dehidraciju rastu sa porastom koncentracije trehaloze u radikuli.

Kontrolni uzorak hibrida ZP 434 ima najniži sadržaj trehaloze (Slika 21) i najnižu vrednost E_a , (Slika 40). Isto tako, u slučaju kontrolnih uzoraka OS za hibrid ZP 434, identifikovana vrednost E_a odgovara najnižem sadržaju trehaloze. Trehaloza je efektivni donor i akceptor vodoničnih veza i ima najveći potencijal među disaharidima u formiranju vodoničnih veza sa biomolekulima (Gaffney *et al.*, 1988), pa se stoga može pretpostaviti da u slučaju ispitivanih hibrida trehaloza ima veliki uticaj na procese dehidracije. Takođe, iz dobijenih rezultata se može zaključiti da niske koncentracije 24-EBL-a utiču na povećanje sadržaja trehaloze.

Uopšteno, prividna E_a predstavlja meru odgovora biljke na gubitak vode. Model prividne energije aktivacije može ispitati odgovor biljke na stres izazvan povišenom temperaturom i može identifikovati relativnu osetljivost fizioloških i biohemijskih parametara u biološkom sistemu. Prividna energija aktivacije se može dovesti u vezu sa različitim faktorima koji utiču na procese dehidracije i može se koristiti za procenu stresa (kao vremenska funkcija) u uslovima već narušenog vodenog balansa biljke.



a



b

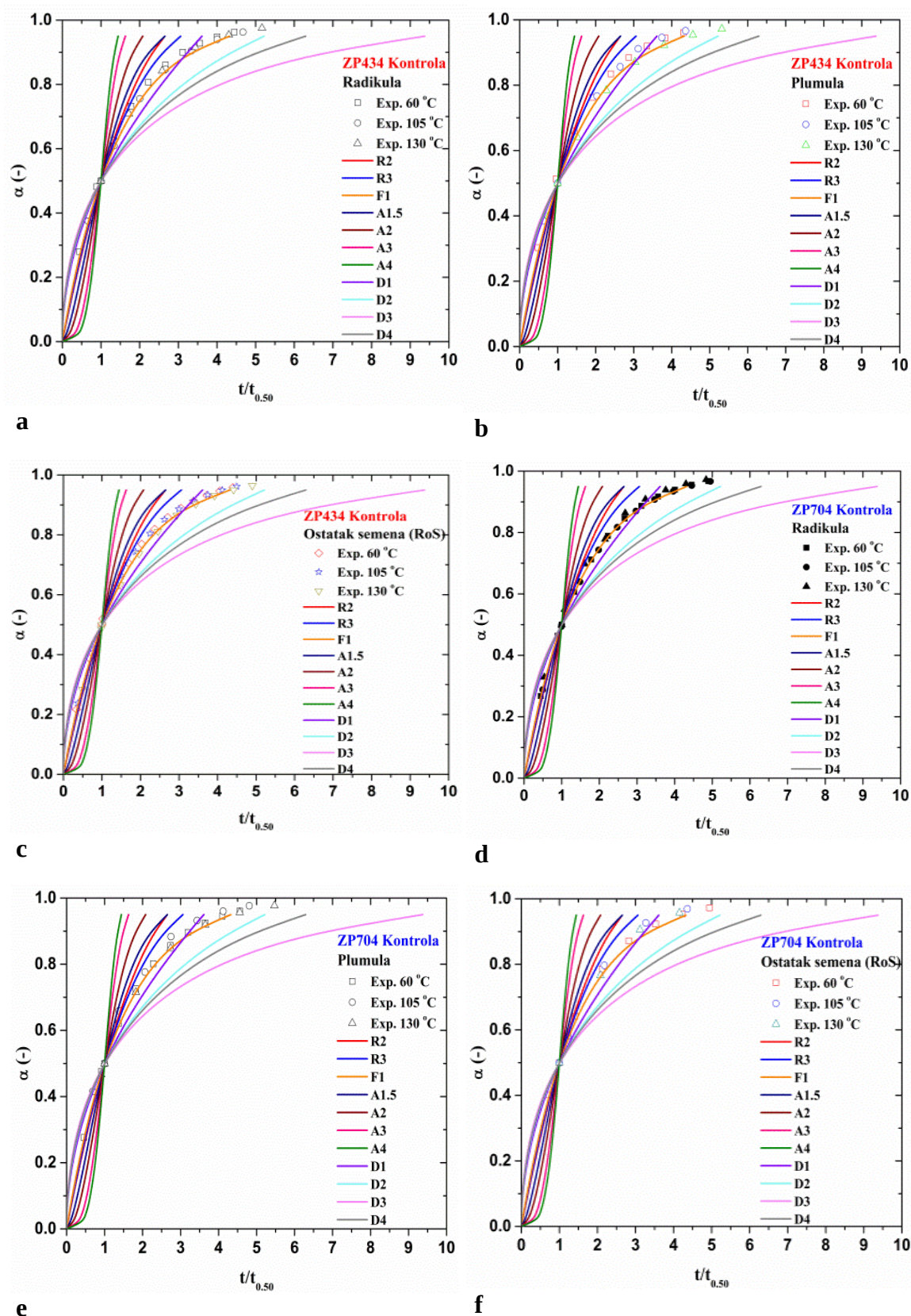
Slika 42. Prosečne vrednosti prividne energije aktivacije kontrolnih uzoraka (a) i (b), izračunate integralnom i diferencijalnom izokonverzionom metodom i uključuje sve delove klijanaca, u α regiju kada vrednosti E_a pokazuju skoro identične vrednosti.

4.13 Analiza krivih dobijenih metodom redukovanog vremena

Na Slici 43 su prikazane krive redukovanog vremena u cilju vizuelnog prepoznavanja reakcionog mehanizma dehidracije za kontrolne uzorke oba hibrida. Za sve delove klijanaca kod oba hibrida kukuruza (Slika 43 (a) do (c) i (d) do (f)), eksperimentalni podaci na svim temperaturama ($T = 60, 105$ i 130°C) su *izokinetički*, što zapravo znači da svi eksperimentalni podaci prate reakcioni mehanizam koji se odigrava u jednom stupnju (mehanizam je označen sa simbolom F1 (Avrami-Erofeev model, (Tabela 5)).

Iz ovih rezultata, za slučaj oba hibrida se može zaključiti da se dehidracija može opisati procesom koji se odvija preko jednog reakcionog stupnja ($A \rightarrow B$), što uključuje prvostepeni mehanizam. Kriterijum za prihvatanje datog reakcionog modela jeste “najbolja linearizacija” eksperimentalnih podataka, a to znači postojanje najmanjeg odstupanja eksperimentalne krive ($t/t_{0.50}$) u poređenju sa teorijski izvedenim krivama redukovanog vremena, a koje se mogu dobiti na bazi analitičkih oblika korišćenih reakcionih modela (Tabela 5).

U posmatranom slučaju imamo trenutno formiranje velikog broja aktivnih centara za desorpciju vode. Ovo vodi do jednodimenzionalnog desorpcionog procesa. Početni gubitak vode se dešava na liniji difuzionog sloja sa prekusorskim molekulom, što može dovesti do neznatnog povećanja u vrednostima E_a (Slika 40). U tom slučaju, proces kontrolisan reakcijom prvog reda se može pripisati gubitku prvog vodenog sloja koji pripada strukturi međuslojeva od kojih je sistem sačinjen.



Slika 43. Krive redukovano vremena kontrolnih uzoraka od (a) do (f) za hibrid ZP 434 i hibrid ZP 704

Na Slici 44 se mogu videti krive redukovano vremena za sve koncentracije 24-EBL-a, za hibride ZP 434 i ZP 704. U slučaju hibrida ZP 434, za dehidraciju radikule pri svim tretmanima različitim koncentracijama 24-EBL-a (Slika 44 (a) do (c)), proces nije izokinetički jer postoje odstupanja od prethodno opisanih kontrolnih krivi, pri koncentraciji 24-EBL-a od 5.2×10^{-12} M. Za koncentraciju od 5.2×10^{-9} M i 5.2×10^{-15} M (Slika 44 (a) i (c)), proces dehidracije je izokinetički na svim operativnim temperaturama, kao i kontrolni uzorci. Kao što se vidi na Slici 44. (b), na 60 i 105°C, proces je kontrolisan reakcijama prvog reda, dok je na 130°C proces kontrolisan difuzijom (Sun, 2002). Za dehidraciju plumule (Slika 44 (d) do (f)), na koncentracijama 24-EBL-a od 5.2×10^{-9} M i 5.2×10^{-12} M (Slika 44 (d) i (e)), proces se odvija po modelu reakcije prvog reda (F1) na svim temperaturama, dok na najnižim vrednostima koncentracije 24-EBL-a (Slika 44 (f)), vidi se prisustvo “mešovitog” reakcionog modela tj., u posmatranom opsegu temperatura eksperimentalne tačke leže između modela reakcije prvog reda i modela reakcije na granicama faze sa sfernom simetrijom (R3). Ipak, na osnovu ponašanja eksperimentalnih tačaka sa promenom temperature, može se zaključiti da dominira mehanizam reakcije na granicama faza.

Naime, za hibrid ZP 434, najosetljivija na dehidracioni stres je radikula tretirana koncentracijom 24-EBL-a od 5.2×10^{-12} M na 130°C je, dok je plumula najosetljivija pri koncentraciji 24-EBL-a od 5.2×10^{-15} M.

U slučaju hibrida ZP 704 koncentracija hormona ne menja reakcioni mehanizam kod klijanca tako da je ponašanje gotovo identično sa kontrolnim uzorcima. Ipak, posmatrajući procese u plumuli (Slika 44 (m) do (o)), može se zapaziti da postoje izvesne sekvencionalne promene u mehanizmu dehidracije zavisno od nivoa koncentracije 24-EBL-a.

Pri tretmanu 24-EBL-om u koncentraciji od 5.2×10^{-9} M sa promenom temperature u opsegu od 60/105 do 130°C, može se primetiti promena u reakcionom stupnju iz reakcije prvog reda (hemijski kontrolisan proces), u difuzionu reakciju (difuziono kontrolisan proces, Slika 44 (m)). Na koncentraciji 24-EBL-a od 5.2×10^{-12} M, promenom temperature u opsegu od 60/105 do 130°C, može se primetiti promena u mehanizmu dehidracije iz dvodimenzionalno difuziono kontrolisanog procesa (D2) u proces kontrolisan na granici faza sa sfernom simetrijom (Slika 44 (n)). Na osnovu

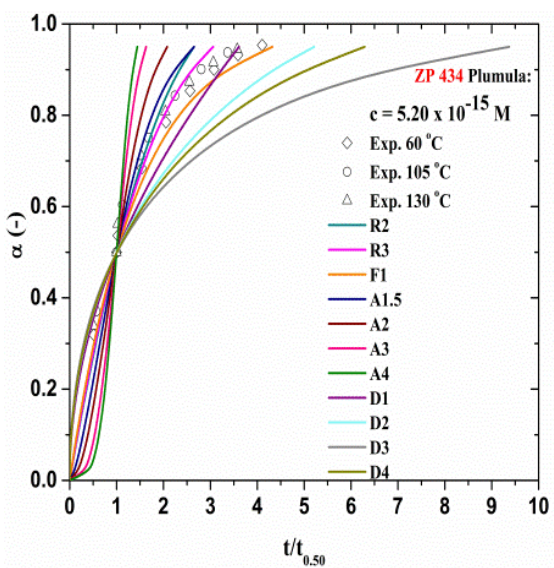
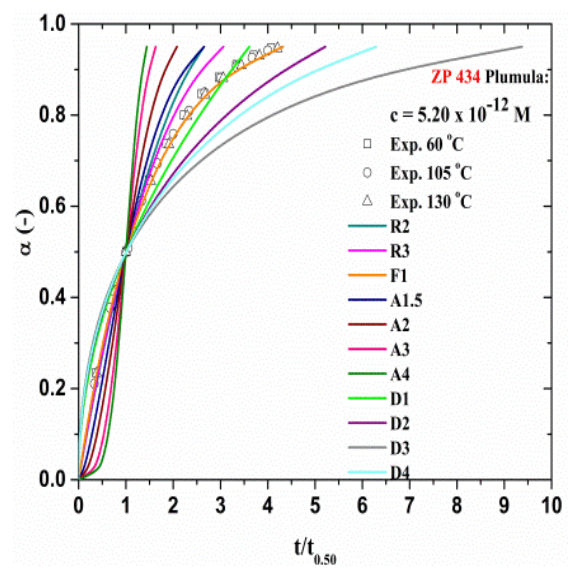
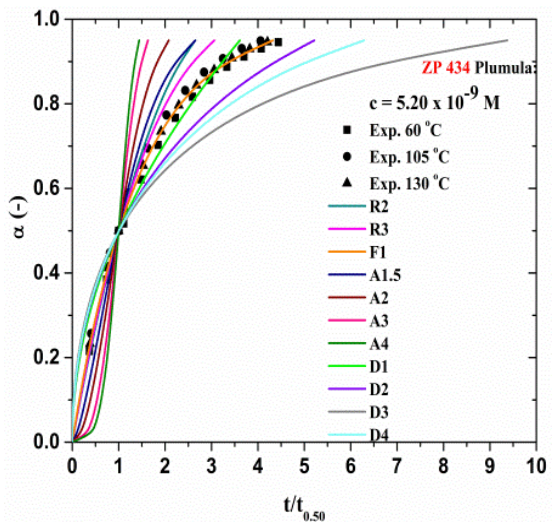
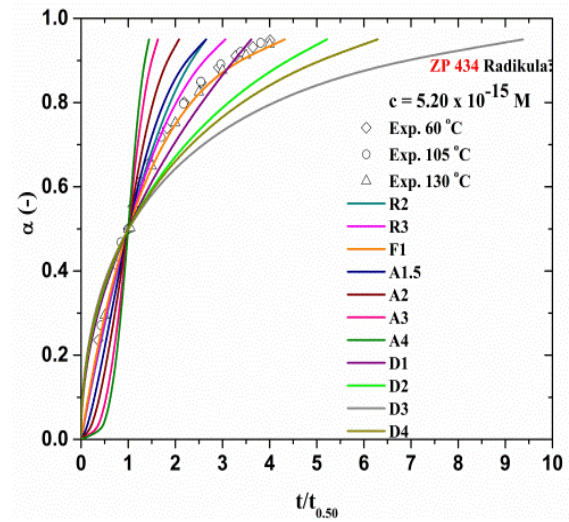
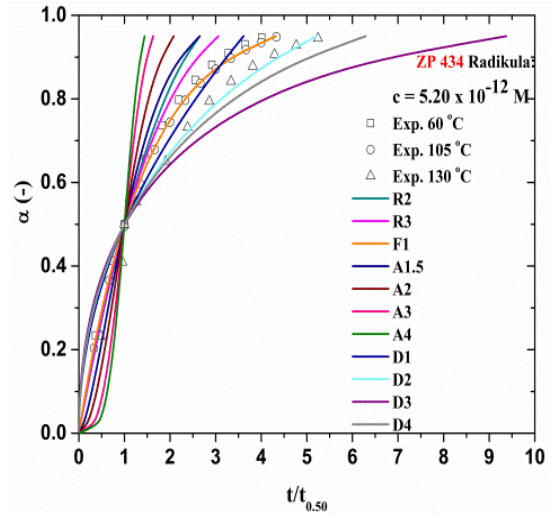
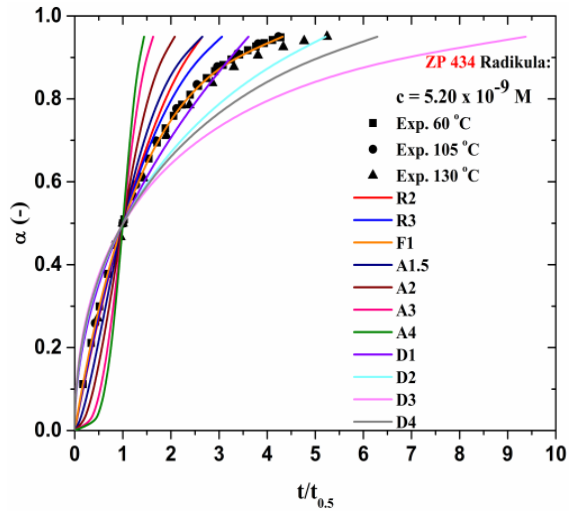
dosadašnjih rezultata mogu se identifikovati tri reakciona mehanizma koja dominiraju u procesu dehidratacije za klijance tretirane 24-EBL-om: 1) R3 model i F1 model 2) D2 model F1 model 3) F1 model (Slika 44 (p) do (r)).

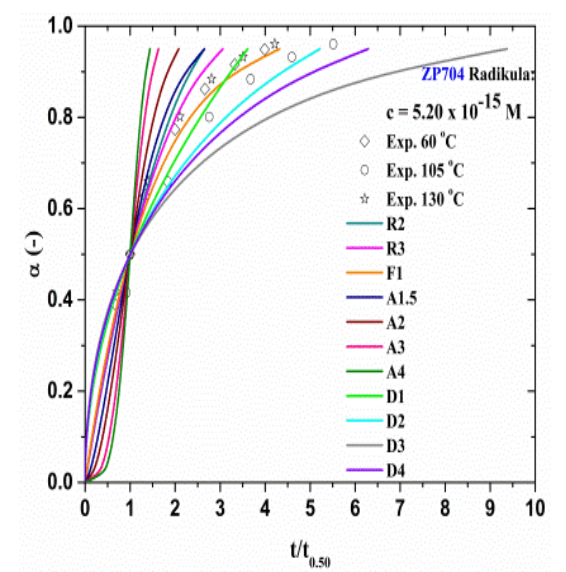
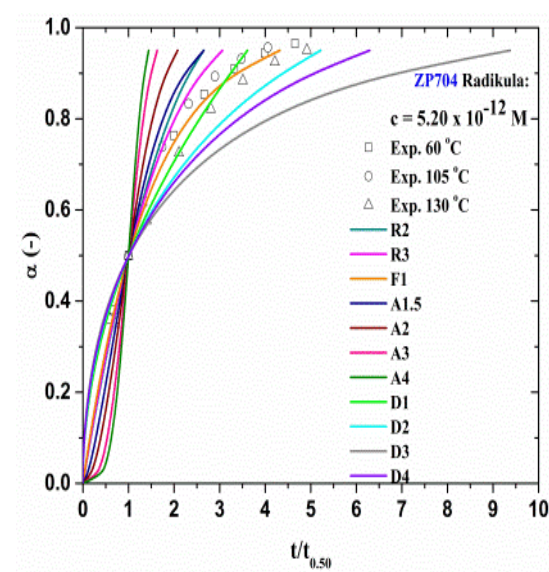
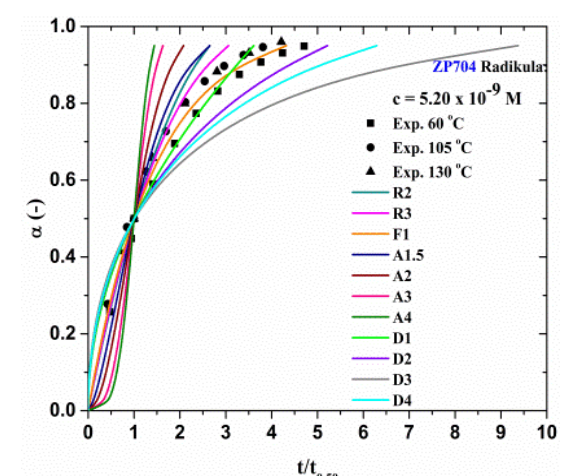
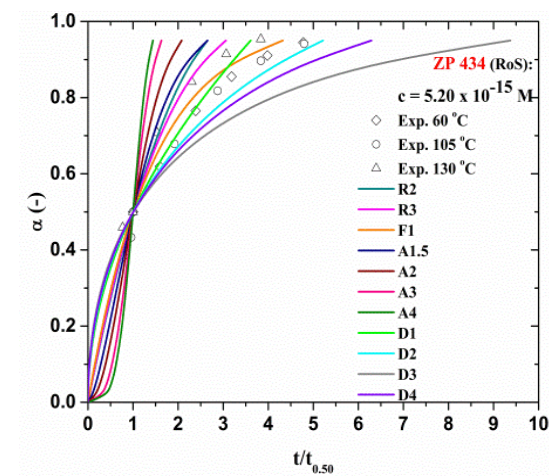
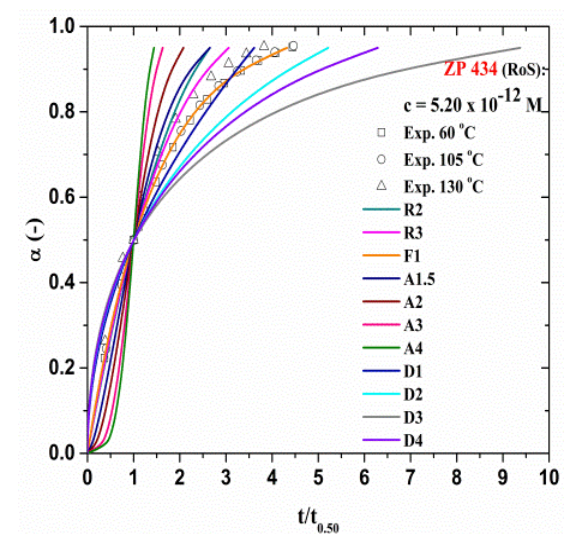
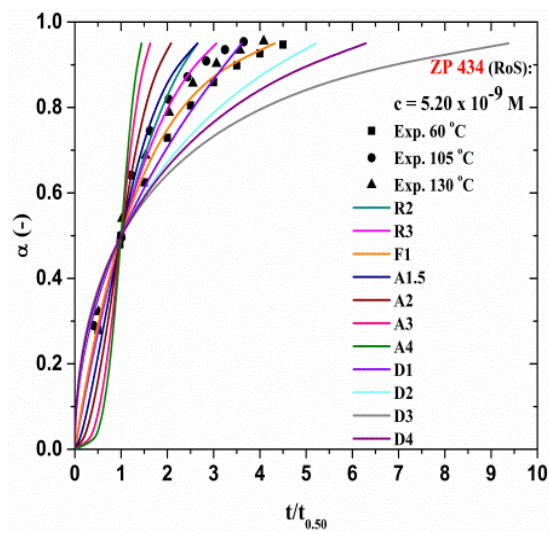
Osetljivost radikule tretirane koncentracijama 24-EBL-a od 5.2×10^{-12} M je verovatno povezana sa niskim sadržajem trehaloze i fosfora (Slika 21, Tabela 9 i 10). Plumula klijanaca tretiranih niskim koncentracijama 24-EBL-a 5.2×10^{-15} M pokazuje veću osetljivost koja može biti povezana sa nižim koncentracijama kalijuma i fosfora (Wang *et al.*, 2013) (Tabela 9 i 10).

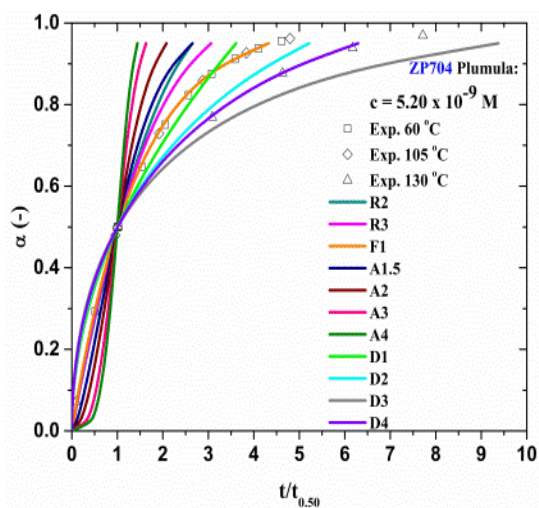
S obzirom da se smatra da su zaštitne uloge trehaloze i saharoze vezane za interakciju sa vodom, može se pretpostaviti da jačina vodoničnih veza igra značajnu ulogu u mehanizmu dehidratacije u slučaju radikule, posmatrajući količine trehaloze i saharoze. Na visokim temperaturama dolazi do raskidanja vodoničnih veza i pada energije aktivacije na niske vrednosti (4.0 kJ mol^{-1}) (Tabela 5). Kada se temperatura promeni sa 105 na 130°C, izgleda da trehaloza ne uspeva da zameni vodu u sistemu dovoljno brzo, voda ostaje slobodna i difuzionim mehanizmom dolazi do isparavanja kroz dvodimenzionalni sloj. Više koncentracije disaharida rezultuju u sporijoj difuziji, dok više temperature izazivaju brže procese difuzije (Ekdawi-Sever *et al.*, 2003). S druge strane, istraživanja su pokazala da se mnogi elementi, a posebno fosfor mogu vezati za povećanje otpornosti na sušu (Singh *et al.*, 2000).

U okviru hibrida ZP 704, u slučaju radikule na svim koncentracijama i svim temperaturama (Slika 44 (j) do (l)), može se pretpostaviti da reakcioni mehanizam uključuje podjednaku verovatnoću za aktiviranjem aktivnih hemijskih grupa biomolekula tokom kompletnog procesa dehidratacije, koji može uključivati „mešoviti“ (dva ili više mehanizama) reakcioni mehanizam.

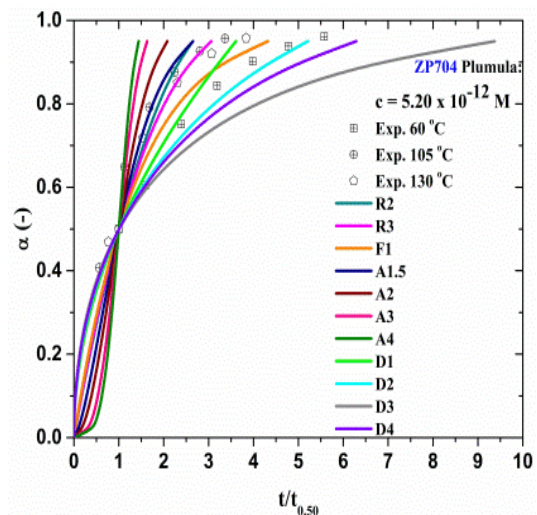
U slučaju plumule postoji uticaj difuzionih efekata pri koncentraciji 24-EBL-a od 5.2×10^{-12} M. Za hibrid ZP 704, 24-EBL najverovatnije utiče na proces dehidratacije jer utiče na promenu u sadržaju fosfora, u poređenju sa kontrolnim uzorcima, dok se potpuno obrnut efekat može zapaziti za slučaj hibrida ZP 434 kada je sadržaj fosfora u pitanju (Tabela 10). Stoga, gledajući sadržaj fosfora i sadržaj šećera (Slika 17 do 20 i Tabela 10), može se pretpostaviti da slobodna voda veoma lako izlazi iz sistema na temperaturama od 60-105°C.



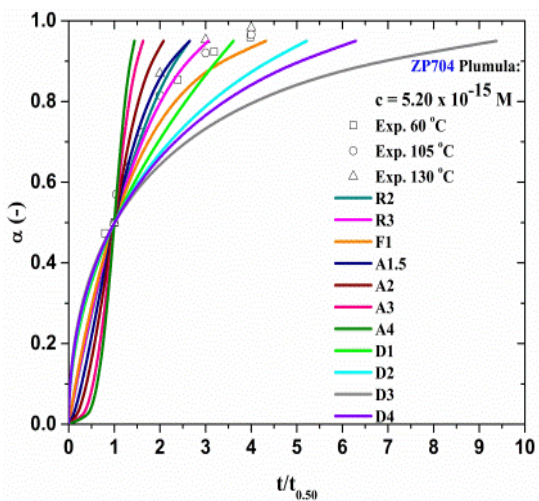




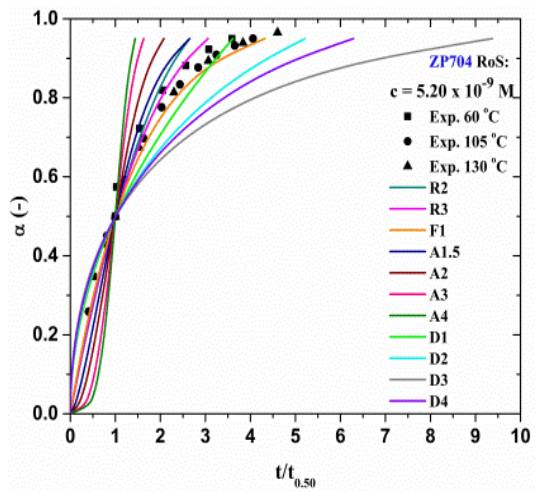
m



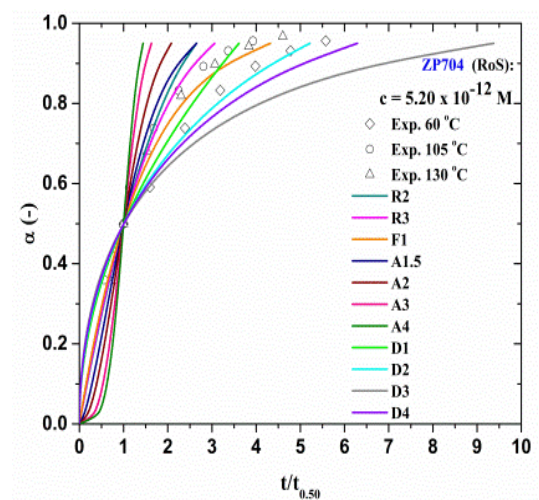
n



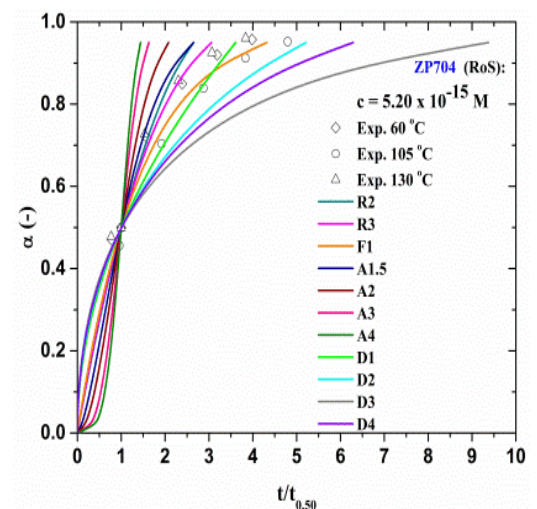
o



p



q



r

Slika 44. Krive redukovano vremena od (a) do (r) za sve koncentracije 24-EBL-a korišćene kod hibrida ZP 434 i ZP 704.

4.14 Analiza rezultata dobijenih Ozawa-inom metodom (metoda „master“ krivih)

Ozawa-ina metoda je primenjena u cilju potvrđivanja dobijenih kinetičkih modela iz prethodnog potpoglavlja za oba hibrida kukuruza. Kinetičke „master“ krive su bile konstruisane na bazi kinetičkih parametara prikazanih u Tabeli 16.

Tabela 16. Kinetički parametri za konstruisanje „master“ krivih, zajedno sa određenim kinetičkim modelima za oba hibrida kukuruza

ZP434									
Deo klijanca	Radikula								
C (M)	5.20×10^{-9}			5.20×10^{-12}			5.20×10^{-15}		
T (°C)	60	105	130	60	105	130	60	105	130
A (min ⁻¹) ^a	6.947×10^2	1.182×10^2	7.906×10^2	1.987×10^0	3.008×10^0	1.865×10^0	2.678×10^0	1.565×10^0	5.205×10^1
Model	F1	F1	F1	F1	F1	D2	F1	F1	F1
R ²	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000	0.99875	0.98969	1.00000	0.99956	1.00000
<E _a > (kJ mol ⁻¹) ^b	23.0 ± 1.4 [0.40 – 0.85]			4.0 ± 0.7 [0.35 – 0.75]			13.2 ± 1.0 [0.55 – 0.95]		
Deo klijanca	Plumula								
C (M)	5.20×10^{-9}			5.20×10^{-12}			5.20×10^{-15}		
T (°C)	60	105	130	60	105	130	60	105	130
A (min ⁻¹) ^a	6.991×10^2	6.478×10^2	7.891×10^2	1.579×10^2	1.274×10^2	2.130×10^2	4.490×10^2	8.036×10^2	1.094×10^2
Model	F1	F1	F1	F1	F1	F1	R3	R3	R3
R ²	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000	0.99989	0.99945
<E _a > (kJ mol ⁻¹) ^b	20.9 ± 1.9 [0.25 – 0.70]			16.5 ± 1.2 [0.35 – 0.80]			18.4 ± 1.3 [0.25 – 0.90]		
Deo klijanca	RoS								
C (M)	5.20×10^{-9}			5.20×10^{-12}			5.20×10^{-15}		
T (°C)	60	105	130	60	105	130	60	105	130
A (min ⁻¹) ^a	8.085×10^1	1.599×10^1	2.783×10^1	9.997×10^2	1.067×10^2	3.180×10^2	2.645×10^2	2.866×10^2	8.767×10^2
Model	F1	R3	R3	F1	F1	R3	F1	F1	R3
R ²	1.00000	0.99987	0.99863	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000	0.99995
Tabela 16. Kinetički parametri za konstruisanje „master“ krivih, zajedno sa određenim kinetičkim modelima za oba hibrida kukuruza									

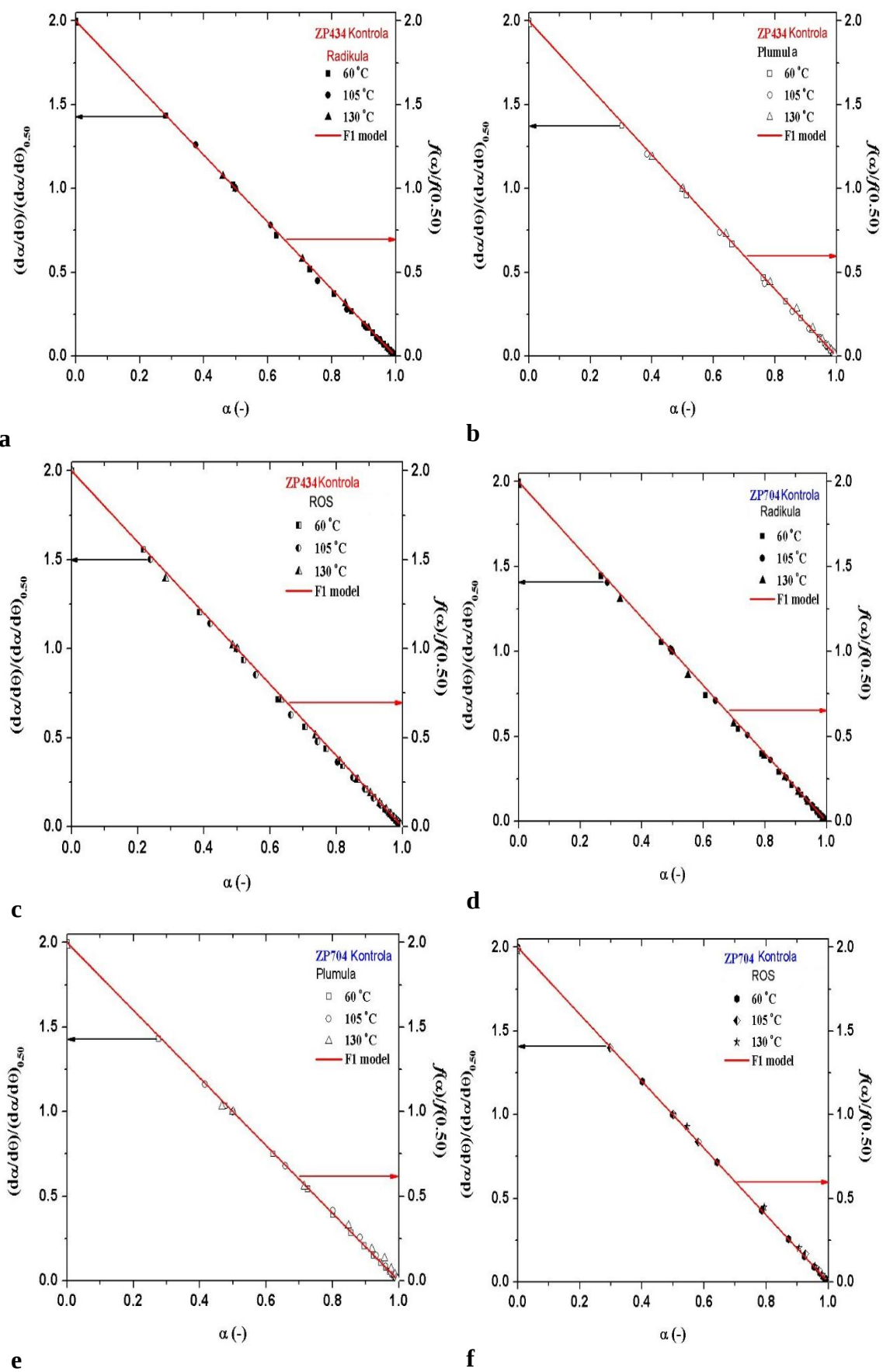
Tabela 16. (Nastavak)

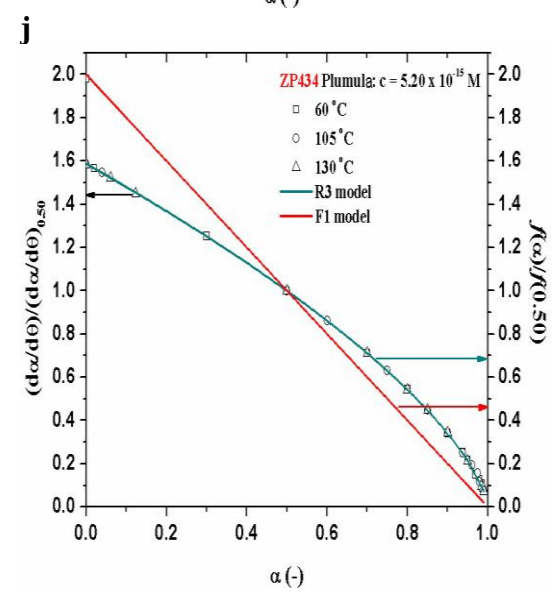
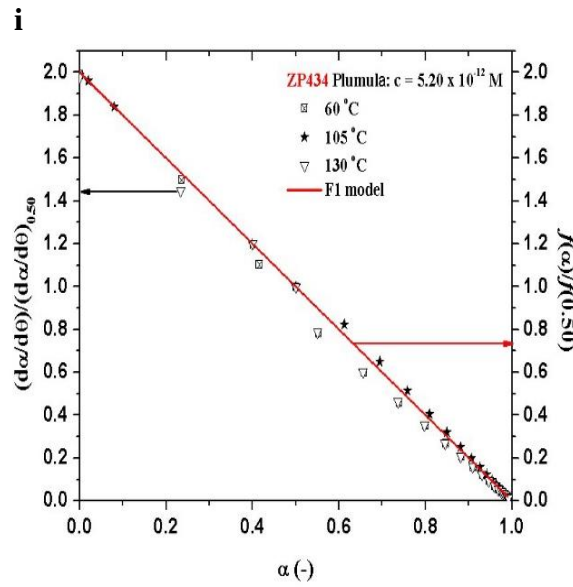
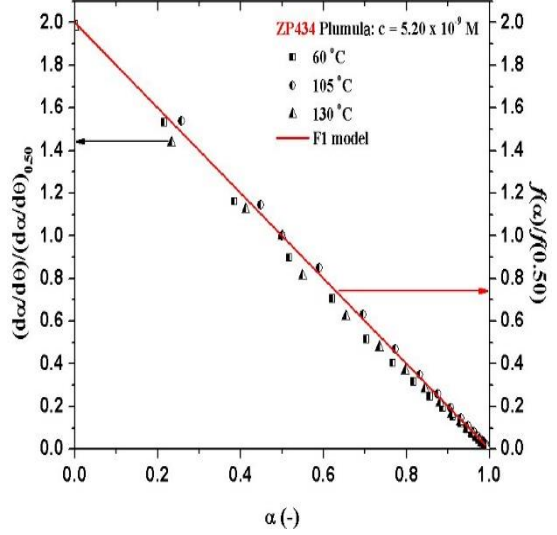
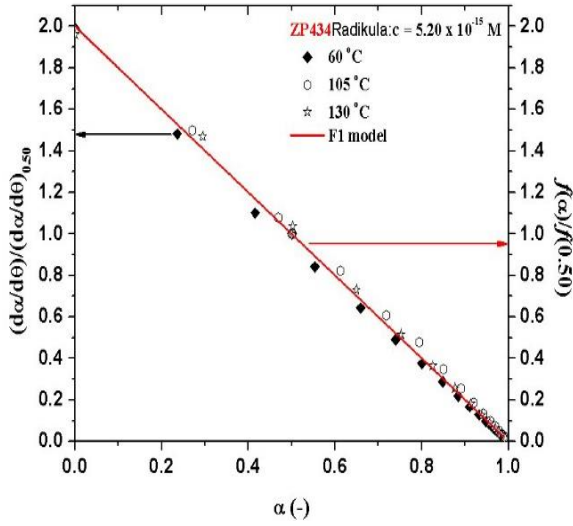
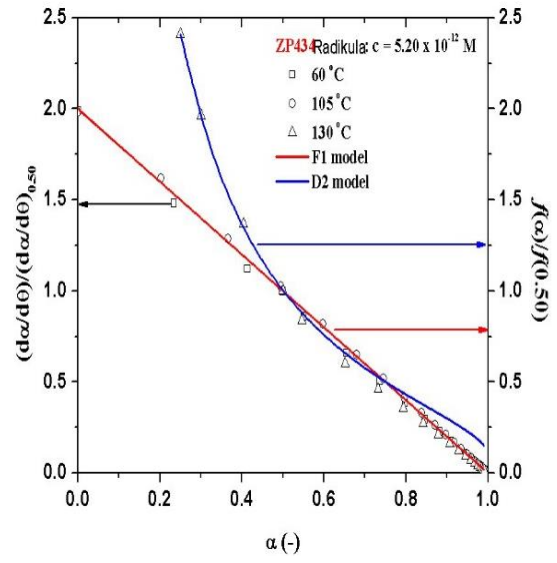
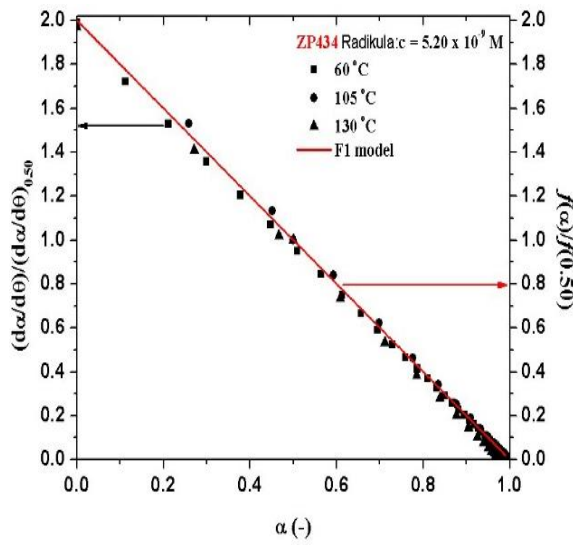
$\langle E_a \rangle$ (kJ mol ⁻¹) ^b	14.1 ± 1.4 [0.55 – 0.95]			15.4 ± 1.6 [0.20 – 0.95]			16.3 ± 1.5 [0.25 – 0.95]		
ZP704									
Deo klijanca	Radikula								
C (M)	5.20 × 10 ⁻⁹			5.20 × 10 ⁻¹²			5.20 × 10 ⁻¹⁵		
T (°C)	60	105	130	60	105	130	60	105	130
A (min ⁻¹) ^a	3.902 × 10 ²	3.850 × 10 ²	8.826 × 10 ²	5.461 × 10 ²	4.671 × 10 ²	6.293 × 10 ²	2.123 × 10 ²	2.380 × 10 ²	3.520 × 10 ²
Model	F1	F1	F1	F1	F1	F1	F1	F1	F1
R ²	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000
$\langle E_a \rangle$ (kJ mol ⁻¹) ^b	18.5 ± 1.8 [0.30 – 0.75]			18.1 ± 1.6 [0.60 – 0.85]			15.4 ± 1.2 [0.35 – 0.95]		
Deo klijanca	Plumula								
C (M)	5.20 × 10 ⁻⁹			5.20 × 10 ⁻¹²			5.20 × 10 ⁻¹⁵		
T (°C)	60	105	130	60	105	130	60	105	130
A (min ⁻¹) ^a	1.291 × 10 ²	1.374 × 10 ²	2.440 × 10 ²	5.416 × 10 ²	8.295 × 10 ²	8.946 × 10 ²	9.342 × 10 ²	6.389 × 10 ²	1.198 × 10 ²
Model	F1	F1	D4	D2	R3	R3	R3	R3	R3
R ²	1.00000	1.00000	0.99999	1.00000	1.00000	0.99997	0.99989	0.99945	0.99939
$\langle E_a \rangle$ (kJ mol ⁻¹) ^b	19.2 ± 1.8 [0.30 – 0.95]			17.3 ± 1.5 [0.20 – 0.95]			18.2 ± 1.4 [0.30 – 0.95]		
Deo klijanca	RoS								
C (M)	5.20 × 10 ⁻⁹			5.20 × 10 ⁻¹²			5.20 × 10 ⁻¹⁵		
T (°C)	60	105	130	60	105	130	60	105	130
A (min ⁻¹) ^a	4.150 × 10 ²	1.638 × 10 ²	3.188 × 10 ²	4.452 × 10 ²	3.837 × 10 ²	6.025 × 10 ²	8.886 × 10 ²	2.854 × 10 ²	7.667 × 10 ²
Model	R3	F1	F1	D2	F1	F1	F1	F1	F1
R ²	0.99992	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000	0.99998	1.00000	1.00000
$\langle E_a \rangle$ (kJ mol ⁻¹) ^b	18.3 ± 1.4 [0.20 – 0.95]			15.3 ± 1.3 [0.40 – 0.80]			17.0 ± 1.4 [0.25 – 0.95]		

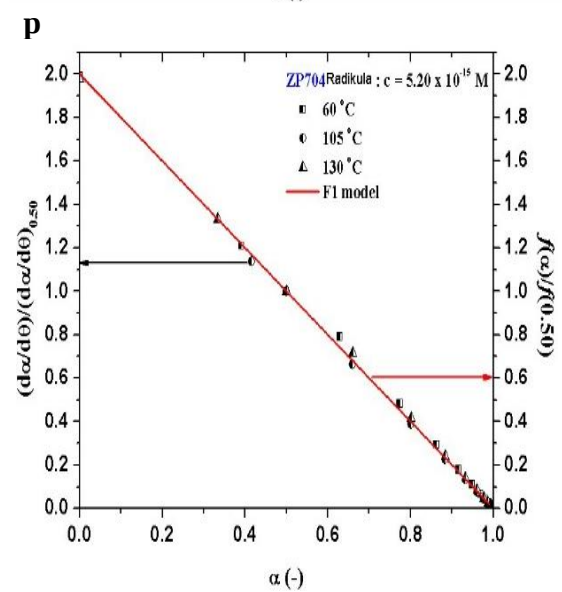
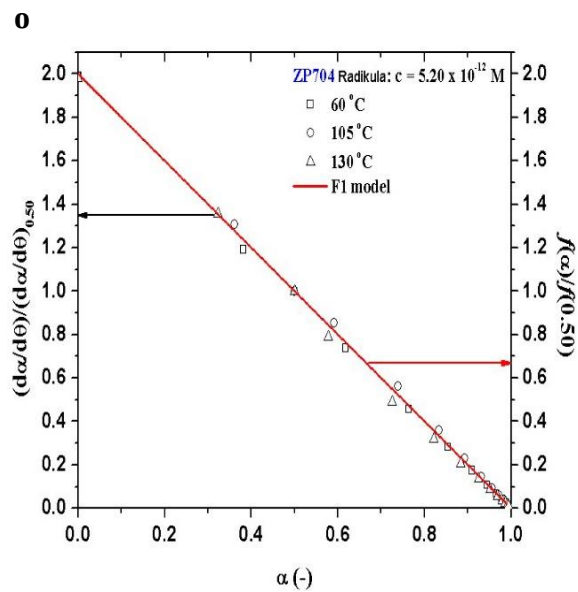
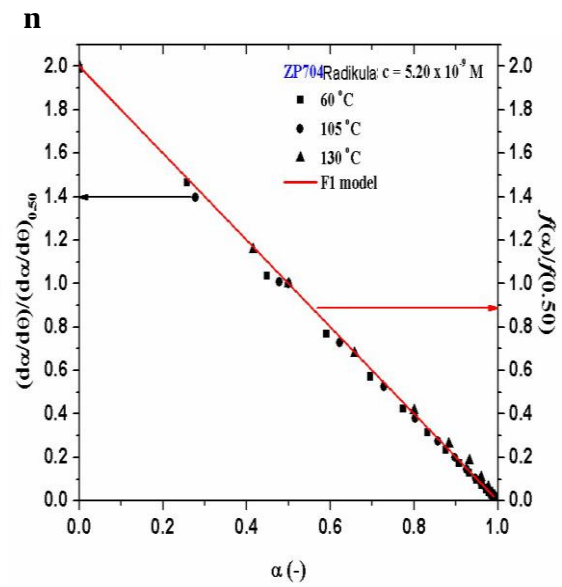
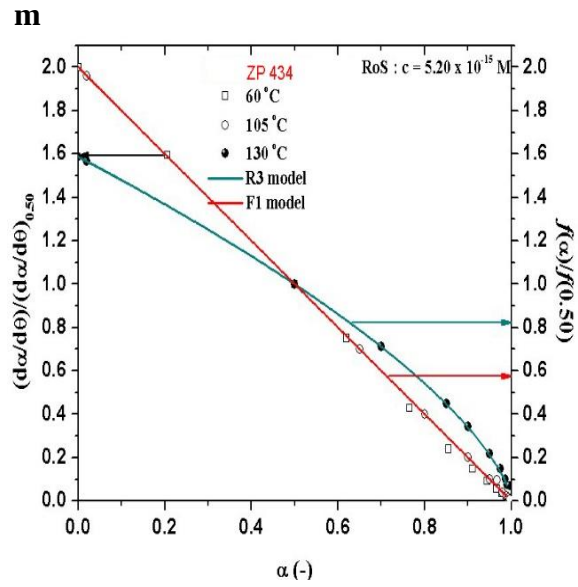
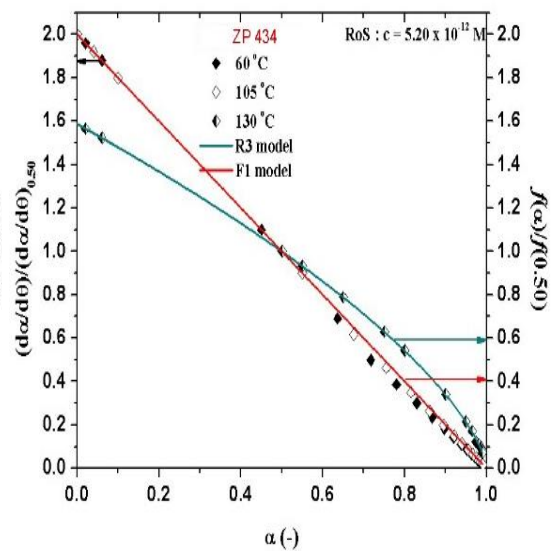
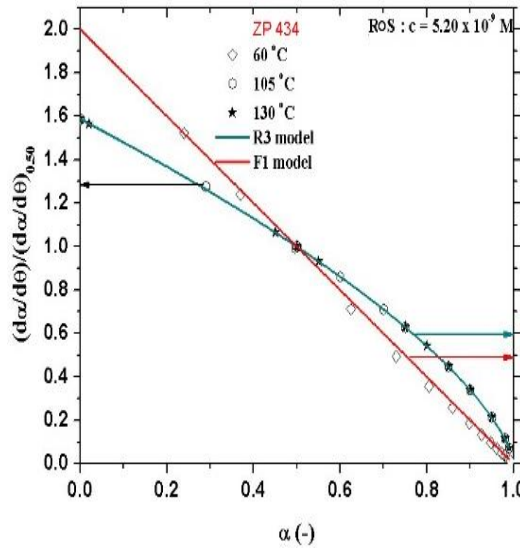
Vrednosti predeksponencijalnih faktora (Slika 45) u slučaju oba sistema, a analizirajući sve delove klijanaca su bile izračunate na osnovu najbolje linearizacije iz regresione analize, korišćenjem jednačine broj 5. za izabrane kinetičke modele

(podsekcija 3.10.3.1 i Tabela 5). Dobijene “master” krive za procese dehidracije svih klijanaca oba hibrida, prikazani su na slici (Slika 45 (a) do (x)). Slika 45, od (a) do (x) jasno pokazuje da je reakcioni mehanizam dehidracije termički i hemijski zavistan, čiji su reakcioni putevi detaljno diskutovani u potpoglavlju 4.4. Eksperimentalne tačke za date klijance oba hibrida jasno prate prethodno izvedene kinetičke modele iz 4.4. Eksperimentalne krive jasno prate trend koji je pridružen datim reakcionim modelima, gde se odlučujući reakcioni stupanj može jasno identifikovati. Prikazani rezultati nedvosmisleno potvrđuju prethodnu diskusiju. Na višim koncentracijama 24-EBL-a (Tabela 16), za radikulu i plumulu, za oba hibrida, više vrednosti prividne energije aktivacije koje se mogu pridružiti visokim vrednostima E_a verovatno ukazuju na prisustvo tri procesa koji direktno mogu uticati na ukupnu brzinu dehidracije. To su sledeći procesi: 1) prenos toplote ka reakcionoj površini; 2) hemijski kontrolisana reakcija; 3) difuzija vode kroz slojeve.

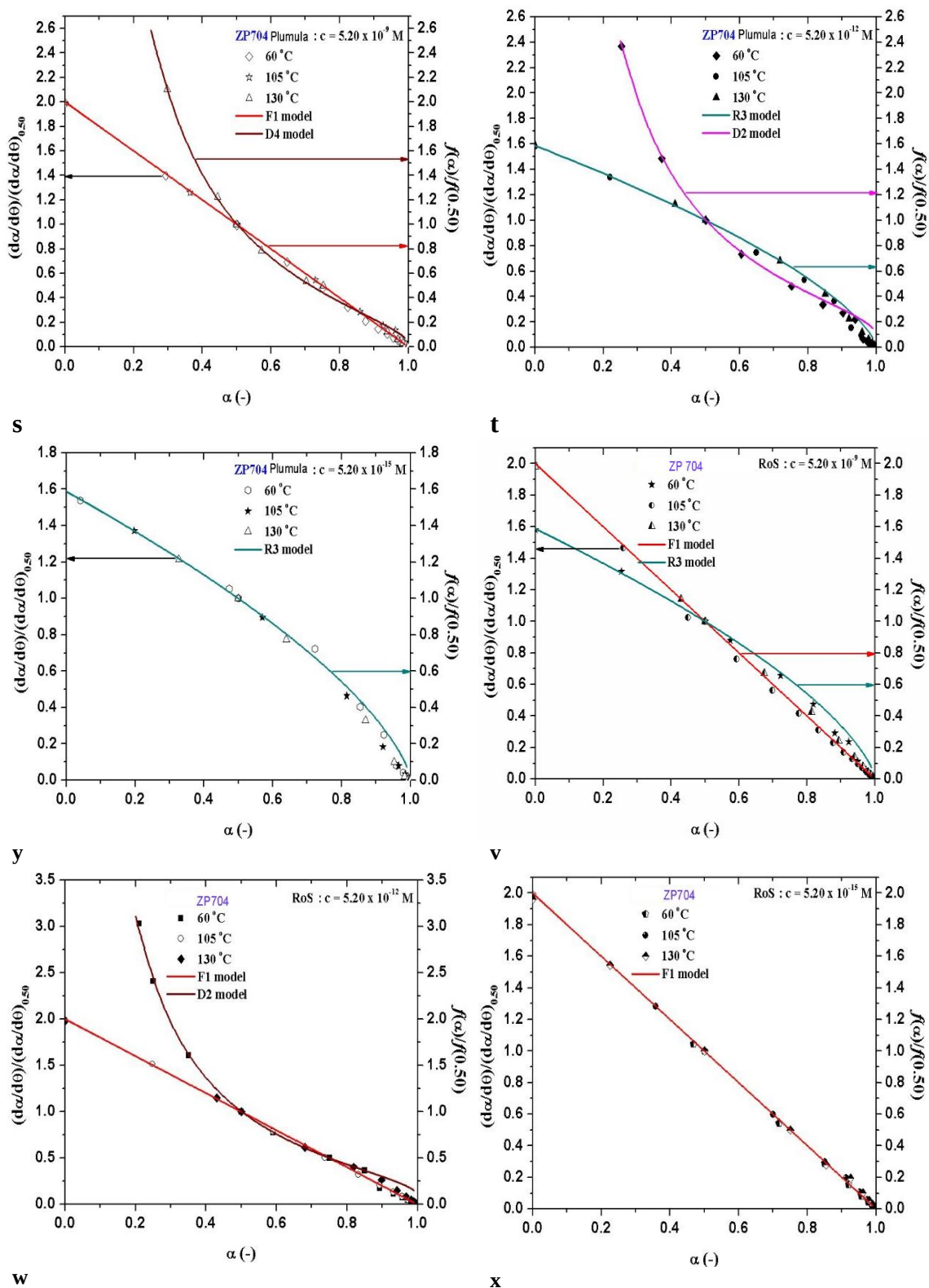
Difuziono kontrolisana reakcija je sasvim sigurna za oba sistema i stoga, kako veličina sloja raste, otpor sistema nasuprot difuziji vode raste. Saglasno tome, kako debljina sloja raste, otpor prema difuziji raste, što dovodi do porasta vrednosti prividne energije aktivacije. Niže vrednosti predeksponencijalnog faktora (red veličine $\times 10^2 \text{ min}^{-1}$) ukazuju na površinsku reakciju, ali ukoliko reakcije nisu zavisne od veličine površine, niska vrednost predeksponencijalnog faktora ukazuje na kompleks u kom voda nije čvrsto vezana za površinu biomolekula. U okviru predstavljanja mehanističke sheme možemo očekivati postojanje “praznih međucelijskih prostora”, kao što su “pukotine” i ove pukotine duž ose izduživanja su vezane za pravac isparavanja vode. Stoga je moguće da su ove “pukotine” rezultat skupljanja reakcione površine biomolekula posle pražnjenja sistema koji je prethodno imao vodu u sebi. Prethodno opisana pojava je moguća i u slučaju kada molekuli vode putuju ka spoljašnjoj površini biomolekula. Takođe je moguće i da se proces dehidracije odigrava preko mehanizama koji je “vođen” spoljašnjim transportom mase, gde difuziju molekula u unutrašnjosti sistema, koja bi predstavljala odlučujući reakcioni stupanj, ne bi trebalo isključiti.







r



Slika 45. “Master” krive od (a) do (x) svih delova klijanaca hibrida ZP 434 i hibrida ZP 704 na svim ispitivanim koncentracijama.

4.15 Analiza vremena života klijanaca

Da bi se dobile vrednosti vremena života (t_f) klijanaca hibrida kukuruza, potrebno je iskoristiti pogodne kinetičke triplete (skup koji obuhvata prividnu energiju aktivacije, predeksponencijalni faktor i funkciju reakcionog mehanizma), koji uključuju aproksimaciju kinetike prvog reda. To znači da je u ovom slučaju iskorišćen model reakcije prvog reda (Jednačina 7). Vrednosti t_f su bile izračunate u funkciji ekstrapolisane temperature u opsegu od 25°C do ekstremne vrednosti od 1000°C, za sve delove klijanaca (za oba hibrida) (sve kontrolne uzorke i za oba hibrida na 5.2×10^{-12} M). Rezultati su prikazani u Tabeli 17.

Tabela 17. Vrednosti vremena života (t_f)

Deo klijanca ^a		ZP434 Kontrola					
		t_f (min)					
Radikula	25 °C	100 °C	200 °C	300 °C	500 °C	1000 °C	
	1.17×10^{-1}	3.28×10^{-2}	1.12×10^{-2}	5.60×10^{-3}	2.39×10^{-3}	9.15×10^{-4}	
		t_f (min)					
Plumula	25 °C	100 °C	200 °C	300 °C	500 °C	1000 °C	
	6.05×10^{-2}	1.78×10^{-2}	6.35×10^{-3}	3.25×10^{-3}	1.43×10^{-3}	5.70×10^{-4}	
		t_f (min)					
RoS	25 °C	100 °C	200 °C	300 °C	500 °C	1000 °C	
	5.38×10^{-2}	2.72×10^{-2}	1.54×10^{-2}	1.06×10^{-2}	6.71×10^{-3}	4.02×10^{-3}	
Deo klijanca ^a		ZP704 Kontrola					
		t_f (min)					
Radikula	25 °C	100 °C	200 °C	300 °C	500 °C	1000 °C	
	1.35×10^{-1}	4.04×10^{-2}	1.46×10^{-2}	7.56×10^{-3}	3.37×10^{-3}	1.36×10^{-3}	
		t_f (min)					
Plumula	25 °C	100 °C	200 °C	300 °C	500 °C	1000 °C	
	8.11×10^{-2}	2.63×10^{-2}	1.02×10^{-2}	5.50×10^{-3}	2.59×10^{-3}	1.11×10^{-3}	
		t_f (min)					
RoS	25 °C	100 °C	200 °C	300 °C	500 °C	1000 °C	
	6.17×10^{-2}	1.84×10^{-2}	6.68×10^{-3}	3.45×10^{-3}	1.54×10^{-3}	6.19×10^{-4}	

Tabela 17. (Nastavak)

Deo klijanca^a c = 5.20×10^{-12} M						
ZP434						
Radikula	t_f (min)					
	25 °C	100 °C	200 °C	300 °C	500 °C	1000 °C
	8.56×10^{-2}	6.19×10^{-2}	4.71×10^{-2}	3.95×10^{-2}	3.18×10^{-2}	2.49×10^{-2}
Plumula	t_f (min)					
	25 °C	100 °C	200 °C	300 °C	500 °C	1000 °C
	3.13×10^{-1}	8.22×10^{-2}	2.67×10^{-2}	1.28×10^{-2}	5.24×10^{-3}	1.91×10^{-3}
RoS	t_f (min)					
	25 °C	100 °C	200 °C	300 °C	500 °C	1000 °C
	2.40×10^{-1}	6.88×10^{-2}	2.41×10^{-2}	1.22×10^{-2}	5.28×10^{-3}	2.06×10^{-3}
Deo klijanca^a c = 5.20×10^{-12} M						
ZP704						
Radikula	t_f (min)					
	25 °C	100 °C	200 °C	300 °C	500 °C	1000 °C
	1.63×10^{-1}	3.75×10^{-2}	1.09×10^{-2}	4.90×10^{-3}	1.83×10^{-3}	6.07×10^{-4}
Plumula	t_f (min)					
	25 °C	100 °C	200 °C	300 °C	500 °C	1000 °C
	6.64×10^{-2}	1.63×10^{-2}	5.03×10^{-3}	2.33×10^{-3}	9.12×10^{-4}	3.17×10^{-4}
RoS	t_f (min)					
	25 °C	100 °C	200 °C	300 °C	500 °C	1000 °C
	6.41×10^{-2}	1.85×10^{-2}	6.54×10^{-3}	3.32×10^{-3}	1.44×10^{-3}	5.67×10^{-4}

Na bazi predviđanja izvršenog korišćenjem gore navedene jednačine, iz prikazanih rezultata, može se zapaziti:

1. Vreme života zavisno je od temperature i opada sa porastom temperature, naročito za slučaj kontrolnih uzoraka radikule i plumule hibrida ZP 434 kao i za RoS kontrolnih uzoraka u okviru hibrida ZP 704.

2. U slučaju hibrida tretiranih 24-EBL-om, hibrid ZP 434 pokazuje veću otpornost na termalni i dehidracijski stres u poređenju sa hibridom ZP 704 (pogotovo ako se uporede t_f između 500 i 1000°C).

Može se pretpostaviti da temperatura u slučaju hibrida ZP 704, snabdeva sistem dovoljnom količinom energije povećavajući mobilnost vode, čime se povećava i brzina dehidracije klijanaca, a time i skraćuje vreme života.

Dehidracijski proces povezan sa pokretljivošću vode može se dovesti u vezu sa energijom disocijacije vode i polarnih funkcionalnih grupa prisutnih u datim sistemima. U tom smislu treba napomenuti da energija disocijacije veze predstavlja energiju za raskidanje vodonične veze koja je u opsegu od 15-23 kJ mol⁻¹ (Berg *et al.*, 2002), što je u skladu sa rezultatima predstavljenim u Tabeli 16. Nađeno je (Waisi *et al.*, 2015) da hibrid ZP 434 sadrži veoma polarna jedinjenja koja su prisutna u hibridu ZP 434 u većoj količini, za razliku od hibrida ZP 704, gde niže koncentracije 24-EBL-a dovode do polifenolnog profila sličnog kontrolnim uzorcima, tako da visoke koncentracije 24-EBL-a imaju inhibirajući efekat na sadržaj polifenola. Ove činjenice potvrđuju gornju diskusiju. Uopšteno, razlike u vrednostima t_f između dva hibrida i u okviru istog hibrida tretiranog 24-EBL-om ukazuju na dva potpuno različita mehanizma dehidracije, što znači da posmatrani hibridi imaju potpuno različitu toleranciju na povišenu temperaturu, u zavisnosti od nivoa koncentracije egzogeno dodatog 24-EBL-a.

4.16 Analiza promena termodinamičkih parametara tokom procesa dehidracije klijanaca

Desorpcioni proces određenih molekulskih vrsta proizilazi iz hemisorpcije, koja može biti endoterman proces, sa tačke gledišta preraspodele energije. Slika 46 (a), (b), (c), (d) - (e), (f), (g), (h) pokazuje promene u vrednostima diferencijalne entalpije, diferencijalne entropije i diferencijalne *Gibbs*-ove slobodne energije, zajedno sa ukupnim promenama slobodne energije u funkciji svih razmatranih koncentracija 24-EBL-a (od 5.2×10^{-7} M do 5.2×10^{-15} M i kontrolni uzorak), za procese dehidracije svih delova klijanaca oba hibrida. Termodinamičke veličine su bile izračunate za

različite temperaturne razlike, što je označeno na Slici 46. Uzimajući u obzir sve delove klijanaca, za hibrid ZP 434, vrednosti dH^* , sa promenom koncentracije 24-EBL-a (Slika 46 (a)) pokazuju negativno (egzotermno ponašanje).

Vrednosti glavnih maksimuma (pikova) za dH^* se mogu uočiti na koncentracijama 24-EBL-a od 5.2×10^{-11} M za RoS (u okviru $(130-60^\circ\text{C})H^*$ i $(130-105^\circ\text{C})H^*$) i 5.2×10^{-11} M i 5.2×10^{-9} M za plumulu (u okviru $(130-105^\circ\text{C})H^*$). Pri posmatranim vrednostima koncentracija 24-EBL-a, vrednosti RoS i plumule za hibrid ZP 434 pokazuju najveću izloženost dehidratacionom stresu sa energetskog stanovišta. Identifikovane vrednosti 24-EBL-a predstavljaju najefektivnije vrednosti koncentracije za određivanje osetljivosti na kombinovani termalni i hemijski stres, a koji uključuje značajne energetske promene.

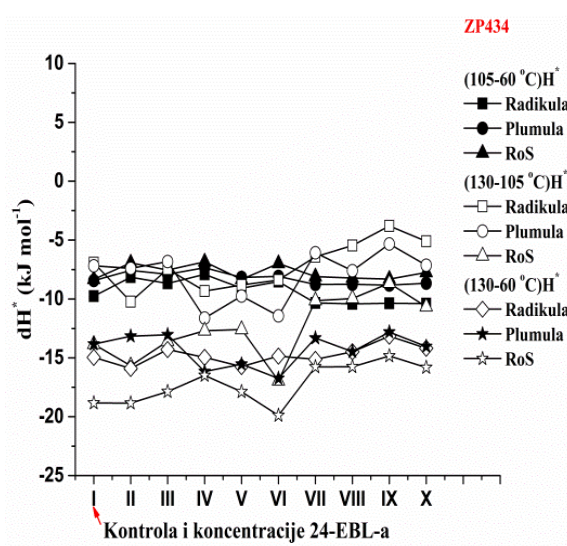
Za hibrid ZP 704, najveća vrednost dH^* (Slika 46 (e)), se može zapaziti u slučaju RoS pri koncentraciji 24-EBL-a od $(5.2 \times 10^{-8} \text{ M})$ za $(130-60^\circ\text{C})H^*$, dok je suprotni efekat uočen u slučaju plumule pri istoj koncentraciji 24-EBL-a za $(130-105^\circ\text{C})H^*$ i za RoS pri 5.2×10^{-14} M koncentraciji 24-EBL-a (takođe za $(130-105^\circ\text{C})H^*$). Za razliku od hibrida ZP 434, klijanci hibrida ZP 704 su tolerantniji (u energetskom pogledu) pri uticaju različitih koncentracija 24-EBL-a na procese dehidracije. Visoka negativna vrednost entalpije pri niskom sadržaju vode može ukazivati na visok afinitet molekula vode ka jonskim centrima ili drugim polarnim centrima biomolekula. Kako sadržaj vode raste, dH^* postaje manje negativno.

Promena dS^* odražava relativni stepen uređenosti sistema, tako da se pojava maksimalne vrednosti dS^* može pridružiti saturaciji (popunjavanju) svih hidratacionih centara. Za oba razmatrana hibrida, pozitivne vrednosti dS^* su identifikovane (Slika 46 (b) i (f)), ukazujući da entropija raste, što može ukazivati na disocijativni mehanizam (preraspodelu hemijskih veza, kao i na moguće konformacione promene unutar biomolekula u posmatranom biološkom sistemu).

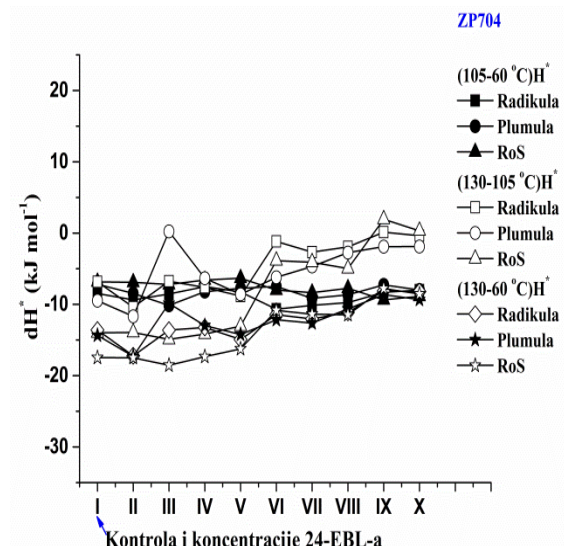
Trend promene dS^* sa promenom koncentracije 24-EBL-a za oba hibrida je sličan onom kada se dH^* menja sa promenom koncentracije 24-EBL-a. Za hibrid ZP 434, najuočljiviji maksimumi dS^* (Slika 46 (b)) se javljaju na koncentraciji 24-EBL-a od 5.2×10^{-11} M za RoS na $((130-60^\circ\text{C})H^*)$ i $((130-105^\circ\text{C})H^*)$. S druge strane, za hibrid ZP 704, najveće vrednosti se javljaju pri koncentraciji 24-EBL-a od $(5.2 \times 10^{-8} \text{ M})$ i za

RoS na $(130-60^{\circ}\text{C})H^*$. Na istim koncentracijama 24-EBL-a, dok u slučaju plumule na $(130-105^{\circ}\text{C})H^*$, imamo suprotan efekat od hibrida ZP 434 (Slika 46 (f)).

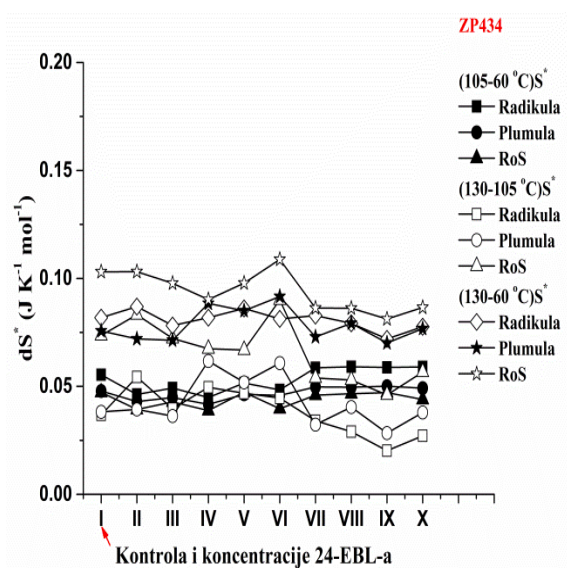
Ukoliko se posmatraju rezultati povezani sa promenama dG^* , uključujući oba hibrida (Slika 46 (c) i (g)), može se primetiti da je trend promena gotovo identičan sa promenama dS^* . Pozitivne vrednosti dG^* ukazuju na ne spontanu (kontrolisanu) prirodu dehidratacionog procesa. To znači da je potrebno dovesti energiju iz spoljašnje sredine da bi došlo do pojave desorpcije vode. Ovo može sugerisati da su prisutni manje dostupni sorpcioni centri za visoke vrednosti ravnotežnog sadržaja vlažnosti dela klijanca.



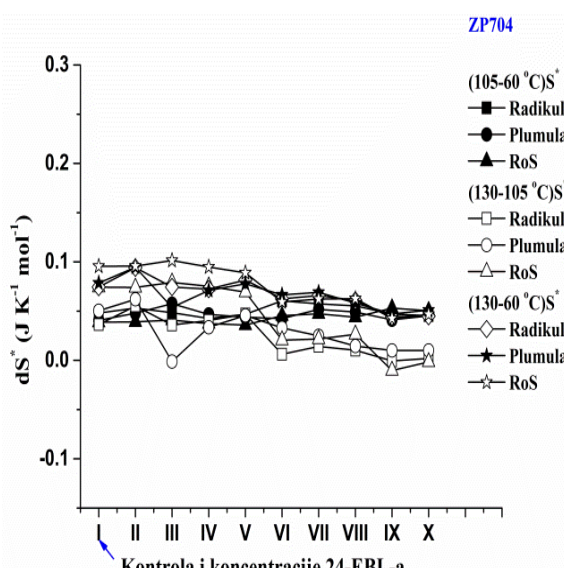
a



b

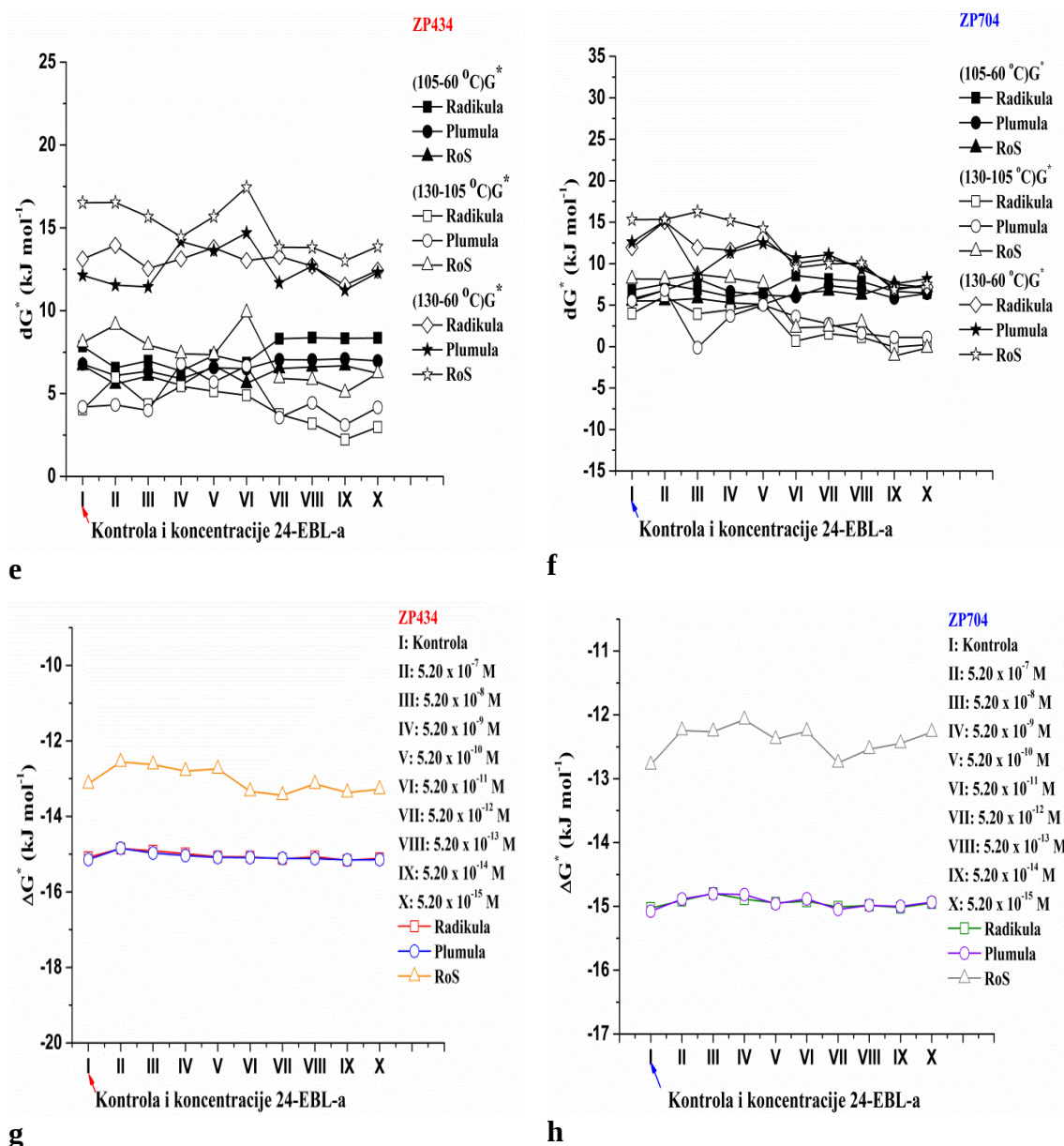


c



d

*Nastavak Slike 46.

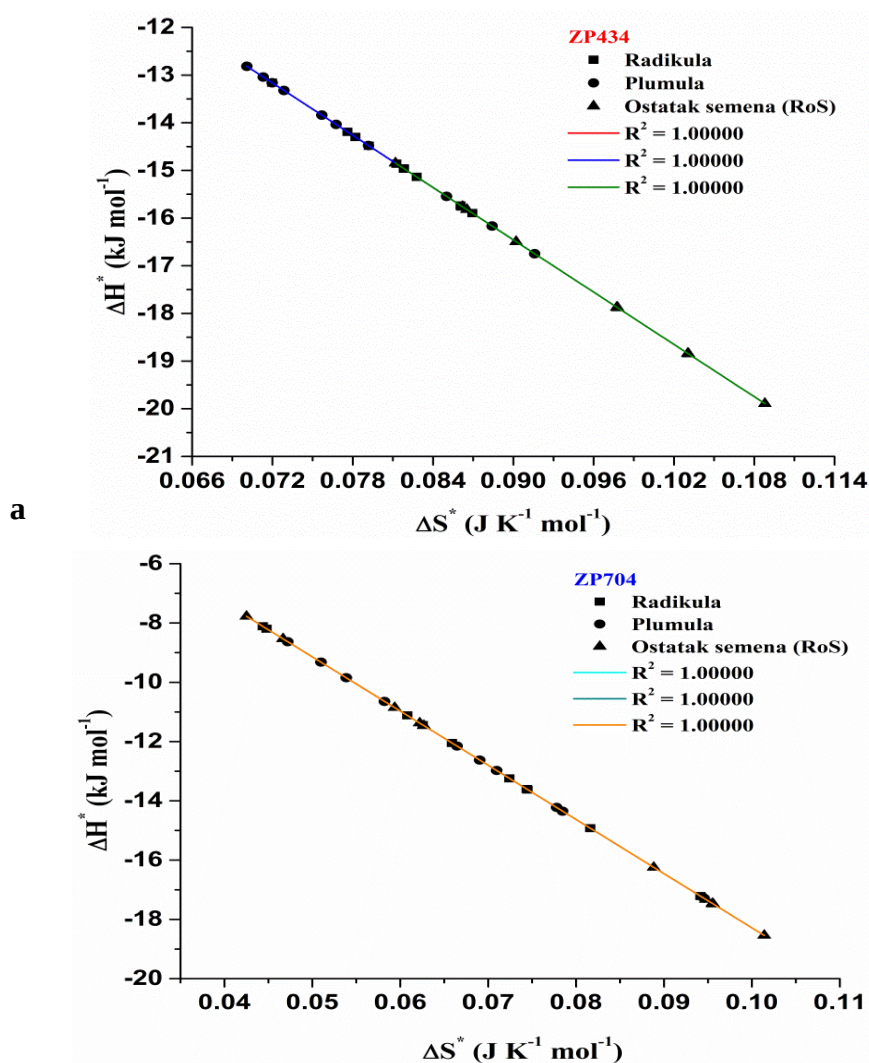


Slika 46. (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g), (h) Promene u vrednostima diferencijalne entalpije, diferencijalne entropije i diferencijalne *Gibbs*-ove slobodne energije, zajedno sa ukupnim promenama slobodne energije u funkciji svih razmatranih koncentracija 24-EBL-a. Rimski brojevi u slici od (a) do (e) predstavljaju kontrolu i koncentracije egzogeno dodatog 24-EBL-a od 5.2×10^{-7} , 5.2×10^{-8} , 5.2×10^{-9} , 5.2×10^{-10} , 5.2×10^{-11} , 5.2×10^{-12} , 5.2×10^{-13} , 5.2×10^{-14} , 5.2×10^{-15} , redom.

Ipak, u oba slučaja, više vrednosti slobodne energije od onih koje se javljaju u sistemu (Slika 46), nisu bile dobijene, tako da verovatnoća raspodele dostupnih sorpcionih centara može varirati zavisno od promena intervala temperatura. Ovo se može videti u trendu vrednosti dG^* , kada dolazi do variranja u koncentraciji 24-EBL-a u hibridu ZP 434 (Slika 46 (c)). U slučaju oba sistema, nezavisno od koncentracije 24-

EBL-a, radikula i plumula pokazuju gotovo konstantne vrednosti dG^* bez značajnih varijacija. Može se zaključiti da je u slučaju plumule i radikule kapacitet za vezivanje i odavanje vode približno jednak i da nije isti sa onim povezanim sa RoS-om, što u velikoj meri može zavisiti od temperature, koja može uticati na morfološku strukturu delova klijanaca.

Može se uočiti sa Slike 47. (a) i (b) da je za sve hibride i delove klijanaca postignuta jedinstvena super korelacija (super korelacioni entalpijsko-entropijski kompenzacioni efekat) ($R^2 = 1.00000$; Slika 47)



Slika 47. od (a) do (b) Promene vrednosti ΔH^* u funkciji promene vrednosti ΔS^* (Jednačina 12), za procese dehidracije oba hibrida).

Ukoliko postoji visok stepen linearnosti između ΔH^* i ΔS^* , za dati proces, u tom slučaju se entalpijsko-entropijska kompenzaciona teorija može smatrati ispravnom za fenomen desorpcije vode u posmatranom sistemu.

Da bi se ispitala validnost entalpijsko-entropijske kompezacione teorije, izokinetička temperatura (T_{iso}) je bila upoređena sa harmonijskom prosečnom temperaturom (T_{hm}), u datom temperaturnom opsegu. Tabela 18 pokazuje karakteristične entalpijsko-entropijske parametre u procesu, uzimajući u obzir sve delove klijanaca oba hibrida.

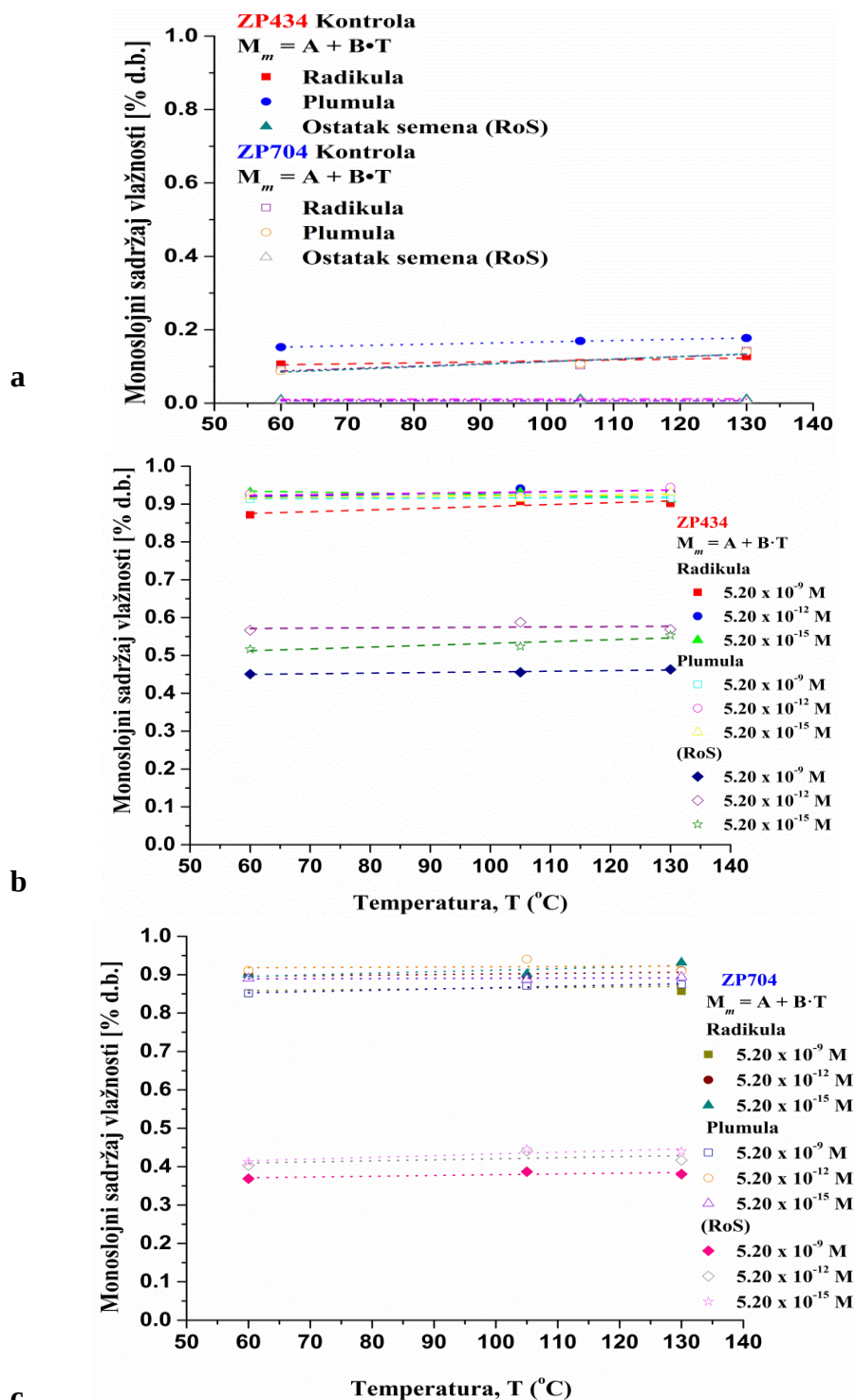
Tabela 18. Poređenje izokinetičke temperature (T_{iso}) sa harmonijskom prosečnom temperaturom (T_{hm})

Deo klijanca	ZP434				Deo klijanca	ZP704			
	Ψ (kJ mol ⁻¹)	T_{iso} (°C) ^a	T_{iso} T_{hm}	$\neq$		Ψ (kJ mol ⁻¹)	T_{iso} (°C) ^a	T_{iso} T_{hm}	$\neq$
Radikula	0.00769	± 90.21	± T_{iso}	<	Radikula	0.00037	± 90.31	± T_{iso}	<
	0.00099	0.03	T_{hm}			0.00001	0.02	T_{hm}	
Plumula	0.00101	± 90.29	± T_{iso}	<	Plumula	0.00070	± 90.25	± T_{iso}	<
	0.00098	0.02	T_{hm}			0.00002	0.03	T_{hm}	
RoS	0.00115	± 90.30	± T_{iso}	<	RoS	0.00029	± 91.31	± T_{iso}	<
	0.00096	0.02	T_{hm}			0.00002	0.03	T_{hm}	

^a $T_{hm} = 96.01^\circ\text{C}$

Iz Tabele 18 se može videti za oba hibrida, da je izokinetička temperatura niža od izračunate prosečne harmonijske temperature, potvrđujući fenomen entalpijsko-entropijskog kompezacionog efekta za desorpciju molekula vode u delovima klijanaca. Izokinetička temperatura predstavlja onu temperaturu u kojoj se sve reakcije odigravaju u isto vreme, odnosno kada je krajnji produkt reakcije u ravnoteži. U slučaju kada je $T_{iso} < T_{hm}$, tada je proces entropijski kontrolisan. Dobijene T_{iso} vrednosti ne odgovaraju početnim uslovima termalnog eksperimenta (25°C), što znači da je mehanizam desorpcije vode entropijski vođen. Drugim rečima, sa svakim odavanjem molekula vode iz pojedinih slojeva strukture klijanaca, dolazi do preraspoređivanja molekula, kao odgovora sistema na dehidratacioni stres. Ovo ukazuje da mikrostruktura klijanaca nije stabilna i da poleže promenama tokom dehidratacije, što znači da su molekularna preuređivanja na visokom nivou tokom dehidrataciog stresa.

Slika 48 od (a) do (c) pokazuje zavisnost jednoslojnog sadržaja vlažnosti u funkciji temperature, za uzorke tretirane različitim koncentracijama 24-EBL-a i kontrolne uzorke, za sve delove klijanaca 5.2×10^{-9} do 5.2×10^{-15} M).



Slika 48. od (a) do (c) Zavisnost jednoslojnog sadržaja vlažnosti u funkciji temperature, za uzorke tretirane različitim koncentracijama 24-EBL-a i kontrolne uzorke, za sve delove klijanaca.

Iz prethodno navedenog proizilazi da konformacione promene u biomolekulima (koje mogu biti uzrokovane i difuzionim efektima, kao i pojavama na graničnim površinama između molekula vode i biomolekula), utiču na proces dehidratacije, a ne oslobođena toplota koja potiče iz toplote hemijskih reakcija (npr. reakcije prvog reda, koje su bile identifikovane u kinetičkom delu razmatranja dobijenih rezultata u ovoj doktorskoj disertaciji).

Konstanta B predstavlja temperaturni koeficijent koji reguliše nagib pravih prikazanih na Slici 48. od (a) do (c). Jedina jasna razlika između svih B vrednosti se može uočiti za radikulu kod hibrida ZP 434, pri najnižoj koncentraciji 24-EBL-a. U ovom slučaju, negativna vrednost koeficijenta temperature je bila identifikovana ($-2.40523 \times 10^{-40} \text{C}^{-1}$) (Tabela 19).

Negativni koeficijent temperature ukazuje na smanjenje vode u monosloju sa porastom temperature. Poredeći sa ostalim delovima klijanaca, radikula hibrida ZP 434 je najosetljivija, čak i na niskim koncentracijama 24-EBL-a, unutar ispitivanog temperaturnog opsega. U slučaju radikule hibrida ZP 434, značajno smanjenje aktivnih centara (organskih molekula koji imaju aktivne funkcionalne grupe i gde postoje sile interakcije vode i okruženja) se može pripisati fizičkim i hemijskim promenama uzrokovanim porastom temperature (u poređenju sa ostalim delovima klijanaca).

Pretpostavlja se da prisutnost veoma niske koncentracije 24-EBL-a u radikuli ZP 434 utiče na promenu broja aktivnih centara. Na osnovu standardne BET analize, izračunate su odgovarajuće vrednosti konstante C i a_{wm} (Tabela 19). U slučaju kontrolnih uzoraka za oba hibrida, vrednosti konstante C variraju u opsegu od 16.43 do 25.31 (Tabela 19). Ovaj opseg variranja je znatno uži, poredeći sa opsegom variranja konstante C, za hibride tretirane 24-EBL-om (73.12 do 107.86). U skladu sa ovim rezultatima, postoje i različita variranja u vrednostima a_{wm} (Tabela 19).

Sa stanovišta stanja vode u biljci i fizičko-hemijskog aspekta, vrednosti a_{wm} identifikovane u kontrolnim uzorcima (što predstavlja sadržaj vode u jednosloju), se mogu povezati sa činjenicom da je voda čvrsto vezana za matriks i ne može biti upotrebljna kao reagens ili koreagens.

Tabela 19. Dobijene konstante (A i B), povezane sa modifikovanom BET jednačinom

ZP434												
Kontrola	Radikula				Plumula				RoS			
	A	B (°C ⁻¹)	C	a_{wm}	A	B (°C ⁻¹)	C	a_{wm}	A	B (°C ⁻¹)	C	a_{wm}
	0.0885 9	2.67450 $\times 10^{-4}$	25.31	0.16581	0.13148	3.55722 $\times 10^{-4}$	22.10	0.17541	0.00901	2.10596 $\times 10^{-5}$	20.54	0.180 76
ZP704												
Kontrola	Radikula				Plumula				RoS			
	A	B (°C ⁻¹)	C	a_{wm}	A	B (°C ⁻¹)	C	a_{wm}	A	B (°C ⁻¹)	C	a_{wm}
	0.0485 9	6.52305 $\times 10^{-4}$	18.78	0.18749	0.04232	7.07954 $\times 10^{-4}$	17.98	0.19083	0.00641	4.60927 $\times 10^{-6}$	16.43	0.197 89
ZP434												
c (M)	Radikula				Plumula				RoS			
5.20 $\times$	A	B (°C ⁻¹)	C	a_{wm}	A	B (°C ⁻¹)	C	a_{wm}	A	B (°C ⁻¹)	C	a_{wm}
10 ⁻⁹	0.8466 9	4.72612 $\times 10^{-4}$			0.91175	4.23433 $\times 10^{-5}$			0.44015	1.64803 $\times 10^{-4}$		
10 ⁻¹²	0.9057 6	2.38635 $\times 10^{-4}$	100.50	0.09070	0.91151	1.96590 $\times 10^{-4}$	107.86	0.08783	0.56630	8.23329 $\times 10^{-5}$	94.89	0.093 10
10 ⁻¹⁵	0.9486 8	— 2.40523 $\times 10^{-4}$			0.90900	1.27861 $\times 10^{-4}$			0.48342	4.84125 $\times 10^{-4}$		
ZP704												
c (M)	Radikula				Plumula				RoS			
5.20 $\times$	A	B (°C ⁻¹)	C	a_{wm}	A	B (°C ⁻¹)	C	a_{wm}	A	B (°C ⁻¹)	C	a_{wm}
10 ⁻⁹	0.8487 3	1.59589 $\times 10^{-4}$			0.83281	3.32558 $\times 10^{-4}$			0.35922	1.97643 $\times 10^{-4}$		
10 ⁻¹²	0.8874 6	1.44187 $\times 10^{-4}$	85.63	0.09753	0.91476	5.76696 $\times 10^{-5}$	80.45	0.10031	0.39332	2.72345 $\times 10^{-4}$	73.12	0.104 70
10 ⁻¹⁵	0.8715 9	4.01061 $\times 10^{-4}$			0.88677	3.76447 $\times 10^{-5}$			0.38921	4.38564 $\times 10^{-4}$		

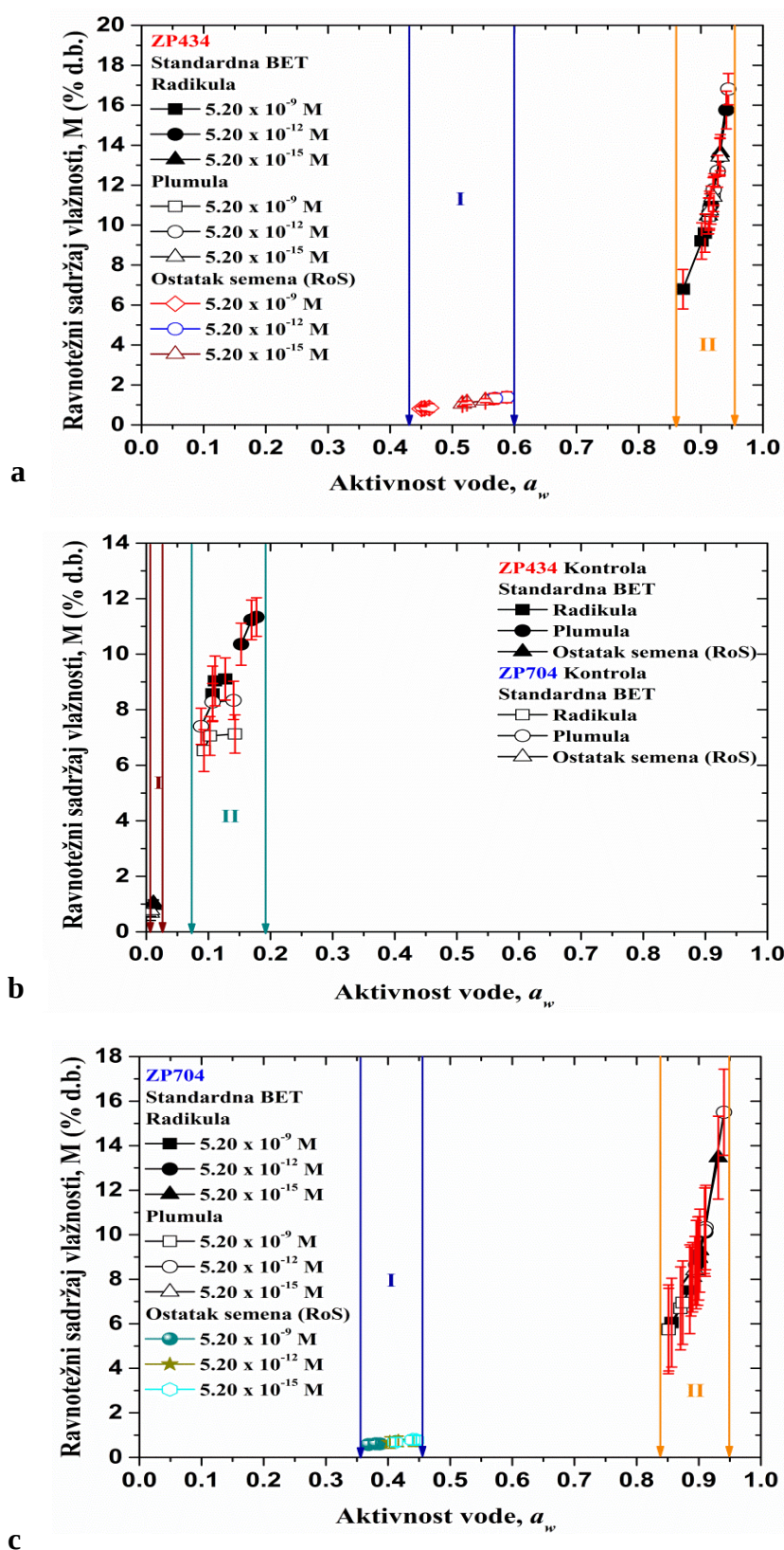
S druge strane, vrednosti a_{wm} (gornje granice), prisutne u uzorcima tretiranim različitim koncentracijama 24-EBL-a su identifikovane na “graničnim” vrednostima aktivnosti vode (Tabela 19), što odgovara molekulima vode koji progresivno postaju dostupni za hemijske reakcije pa i enzimске aktivnosti.

Slika 49 (a), (b) i (c) pokazuje rezultate zavisnosti ravnotežnog sadržaja vlažnosti (M) u zavisnosti od aktivnosti vode (a_w), dobijenih iz standardnog BET-a, za kontrolne uzorke. Sa porastom temperature, plumula i radikula u slučaju oba hibrida, pokazuju više a_w i M vrednosti, dok je ovakav porast još naglašeniji u slučaju hibrida ZP 434 (zona II) (Slika 49 (a)). Ipak, ove vrednosti su i dalje unutar zone koja uključuje trend hemijskih reakcija ispod BET- jednosloja, ali položaj tačaka u M - a_w sistemu ne isključuje ni efekat na mehaničke osobine sistema (Rahman, 2009) (Slika 49 (a)).

Za razliku od RoS, kod hibrida ZP 434 tretiranog različitim koncentracijama 24-EBL-a, radikula i plumula na svim koncentracijama pokazuju visoke vrednosti a_w ($a_w > 0.85$), pri višim vrednostima M (zona II), što znači da se osobine vode mogu promeniti. Efekat temperature u posmatranim slučajevima odražava ponašanje koje se manifestuje u smanjenju vezivne moći molekula vode i biomolekula za hibrid ZP 434.

Porast temperature prouzrokuje smanjenje broja aktivnih centara za vezivanje vode, što se može pripisati opadanju privlačnih sila između molekula vode i vezivnih centara na višim temperaturama, dovodeći do smanjenja M vrednosti. Sa Slike 49., može se videti da niske koncentracije 24-EBL-a na radikuli i plumuli u slučaju oba hibrida utiču na porast M vrednosti i pomeranja vrednosti parametra a_w u oblast visokih vrednosti pri višim temperaturama.

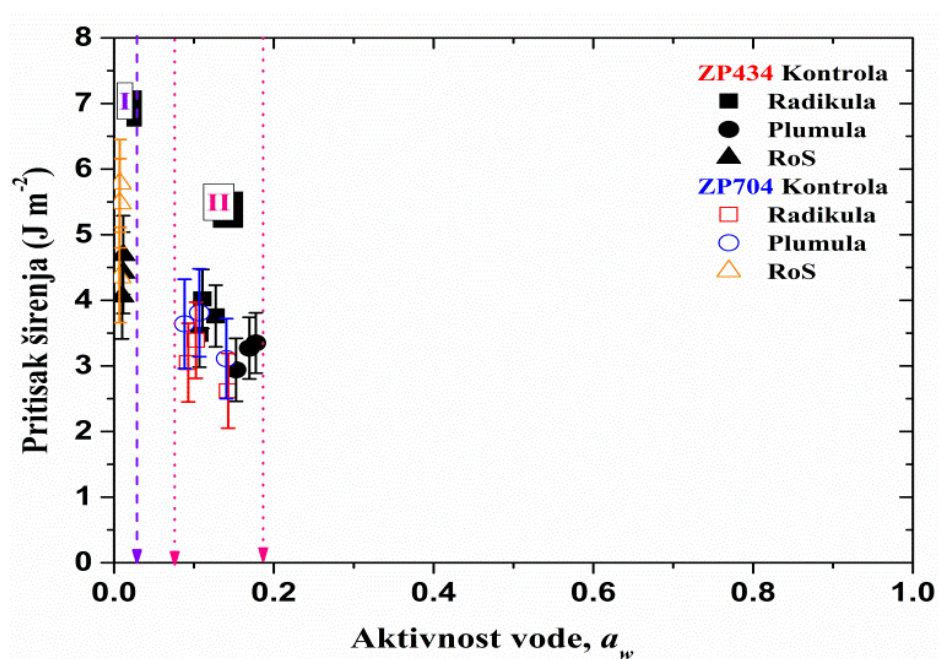
Moguće je da niske koncentracije 24-EBL-a imaju negativan efekat na reakcioni put koji se odnosi na izlazak vode iz sistema, što znači da molekuli vode nemaju dovoljno energije da se odvoje od svojih sorpcionih centara, prouzrokujući time porast M vrednosti.



Slika. 49. (a), (b) i (c) pokazuje rezultate zavisnosti ravnotežnog sadržaja vlažnosti (M) u zavisnosti od aktivnosti vode (a_w), dobijenih iz standardnog BET-a, za kontrolne uzorke.

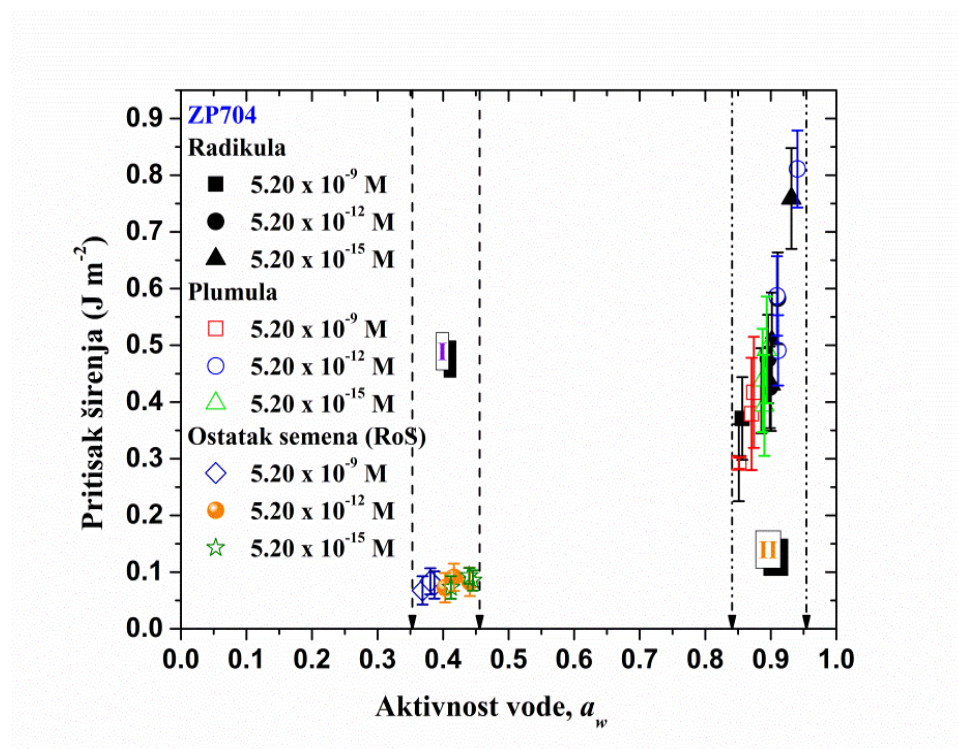
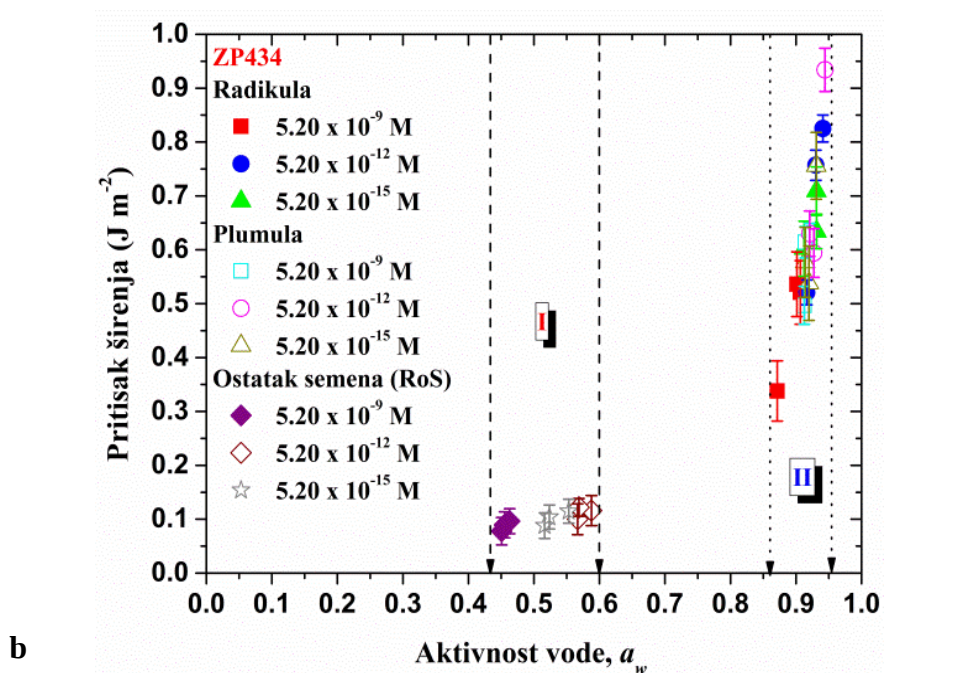
Slika 50 (a), (b), (c) pokazuje zavisnost pritiska širenja (π) u odnosu na a_w , za kontrolne uzorke i uzorke tretirane različitim koncentracijama 24-EBL (5.2×10^{-9} M, 5.2×10^{-12} M i 5.2×10^{-15} M), svih delova klijanaca hibrida ZP 434 i ZP 704. U slučaju hibrida ZP 434, u poređenju sa hibridom ZP 704 (posmatrajući RoS), porast temperature dovodi do smanjenja pritiska širenja.

Sa druge strane, porast temperature, poredeći ostale delove klijanaca, a posebno radikulu hibrida ZP 704, utiče na snižavanje pritiska širenja (zona II sa a_w vrednostima) (Slika 50 (a)). Poredeći ove rezultate sa rezultatima prikazanim na Slici 50. (b) i (c) gde se primećuje uticaj različitih koncentracija 24-EBL-a, može se doneti zaključak da 24-EBL ima efekat u onemogućavanju brzog porasta u pritisku širenja.



a

Slika 50. (Nastavak)



Slika 50 (a), (b), (c) Zavisnost pritiska širenja (π) u odnosu na a_w , za kontrolne uzorke i uzorke tretirane različitim koncentracijama 24-EBL-a ($5.2 \times 10^{-9} \text{ M}$, $5.2 \times 10^{-12} \text{ M}$ i $5.2 \times 10^{-15} \text{ M}$), svih delova klijanaca hibrida ZP 434 i ZP 704, redom.

Podaci za aktuelni ravnotežni sadržaj vlažnosti za oba hibrida su usklađivani (“fitovani”) ogovarajućim modelima koji najbolje opisuju zavisnost između M i a_w , uzimajući u obzir kontrolne uzorke i sve delove klijanaca tretirane 24-EBL-om. Rezultati numeričkog usklađivanja su prikazani u Tabeli 20.

Tabela 20. Zavisnost između M i a_w

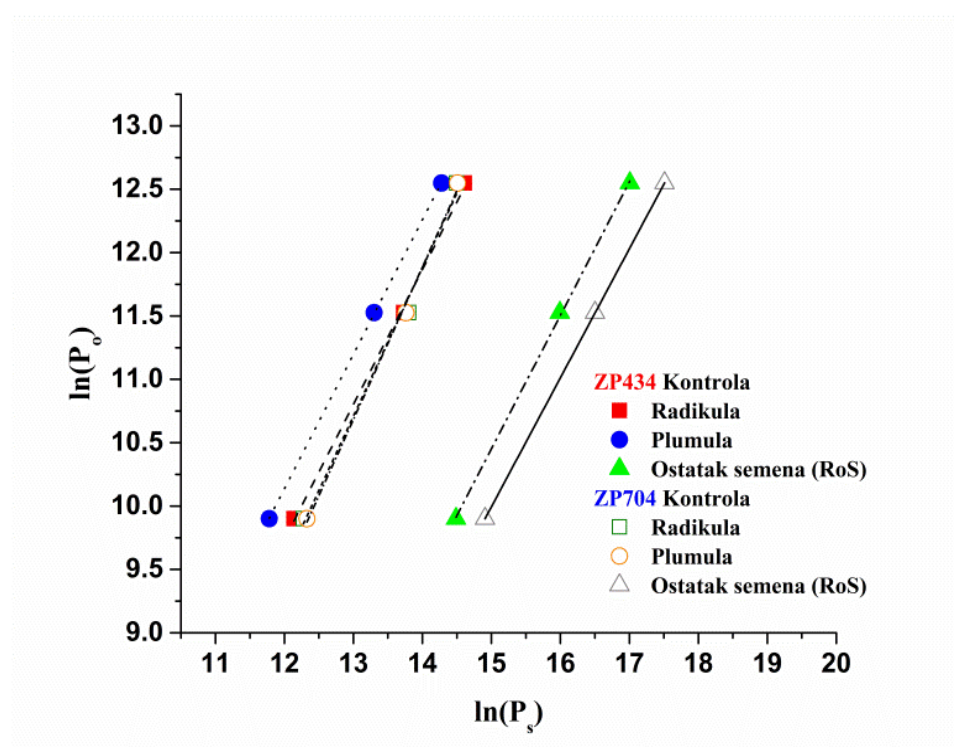
ZP434 - Kontrola					
Belehradek-ova jednačina: $M = s \cdot (a_w - b)^{\phi}$; Troparametarski model					
Deo klijanca	s	b	ϕ	R^2	F-test
Radikula	9.26749 ± 0.01210	0.10784 ± 0.00155	0.00454 ± 0.00011	0.99910	38584.010
Plumula	12.32520 ± 0.01591	0.15414 ± 0.00216	0.02262 ± 0.00162	0.99105	31010.981
RoS	1.49090 ± 0.10910	0.01028 ± 0.00551	0.05555 ± 0.00991	0.95440	21010.021
ZP704 - Kontrola					
Belehradek-ova jednačina: $M = s \cdot (a_w - b)^{\phi}$; Troparametarski model					
Deo klijanca	s	b	ϕ	R^2	F-test
Radikula	7.24992 ± 0.01320	0.09386 ± 0.01011	0.00571 ± 0.00033	0.99562	33110.091
Plumula	8.50674 ± 0.01671	0.08829 ± 0.02210	0.00697 ± 0.00051	0.99710	36710.764
RoS	0.80905 ± 0.07651	0.00674 ± 0.03141	0.00611 ± 0.00081	0.99651	34251.178
ZP434					
Modifikovana Halsey-eva jednačina: $M = a \cdot \ln[-r \cdot \ln(a_w)]$; Dvoparametarski model					
c (M)					
5.20 ×	10^{-9}	10^{-12}	10^{-15}		
Radikula					
r	3.20819 ± 0.09684	4.98531 ± 0.07633	4.57725 ± 0.21768		
a	-8.32430 ± 0.24263	-13.19231 ± 0.19686	-12.04753 ± 0.54854		
R^2	0.99983	0.99955	0.99587		
F- test	28438.147	25985.380	18348.373		
c (M)					
5.20 ×	10^{-9}	10^{-12}	10^{-15}		
Plumula					
r	4.10776 ± 0.08407	5.32975 ± 0.32782	4.53972 ± 0.27508		
a	-10.68583 ± 0.21414	-14.13922 ± 0.88265	-11.88761 ± 0.71960		
R^2	0.99920	0.99224	0.99270		

Tabela 20. (Nastavak)

F- test	26291.610	16231.629	16535.145
c (M)			
5.20 ×	10⁻⁹	10⁻¹²	10⁻¹⁵
RoS			
r	0.62067 ± 0.07104	0.51786 ± 0.10516	0.70096 ± 0.11482
a	-1.15211 ± 0.18319	-1.07354 ± 0.17462	-1.38253 ± 0.27805
R²	0.95068	0.94855	0.92225
F- test	5267.607	3144.475	2588.778
ZP704			
Modifikovana Halsey-eva jednačina: $M = a \cdot \ln[-r \cdot \ln(a_w)]$; Dvoparametarski model			
c (M)			
5.20 ×	10⁻⁹	10⁻¹²	10⁻¹⁵
Radikula			
r	2.48466 ± 0.05645	3.62059 ± 0.20827	4.27335 ± 0.10720
a	-6.30906 ± 0.13913	-9.35342 ± 0.54385	-11.29278 ± 0.29734
R²	0.99903	0.99321	0.99861
F- test	27338.931	18028.780	17365.151
c (M)			
5.20 ×	10⁻⁹	10⁻¹²	10⁻¹⁵
Plumula			
r	2.66035 ± 0.11035	4.60652 ± 0.06976	3.06644 ± 0.17018
a	-6.73719 ± 0.29011	-12.23973 ± 0.18519	-7.85615 ± 0.42150
R²	0.99629	0.99955	0.99426
F- test	17260.119	29616.273	18889.002
c (M)			
5.20 ×	10⁻⁹	10⁻¹²	10⁻¹⁵
RoS			
r	0.44380 ± 0.14835	0.36811 ± 0.17331	0.54290 ± 0.12114
a	-0.70834 ± 0.28121	-0.62326 ± 0.25671	-0.95188 ± 0.26953
R²	0.75777	0.70978	0.86157
F- test	1002.189	761.001	1599.992

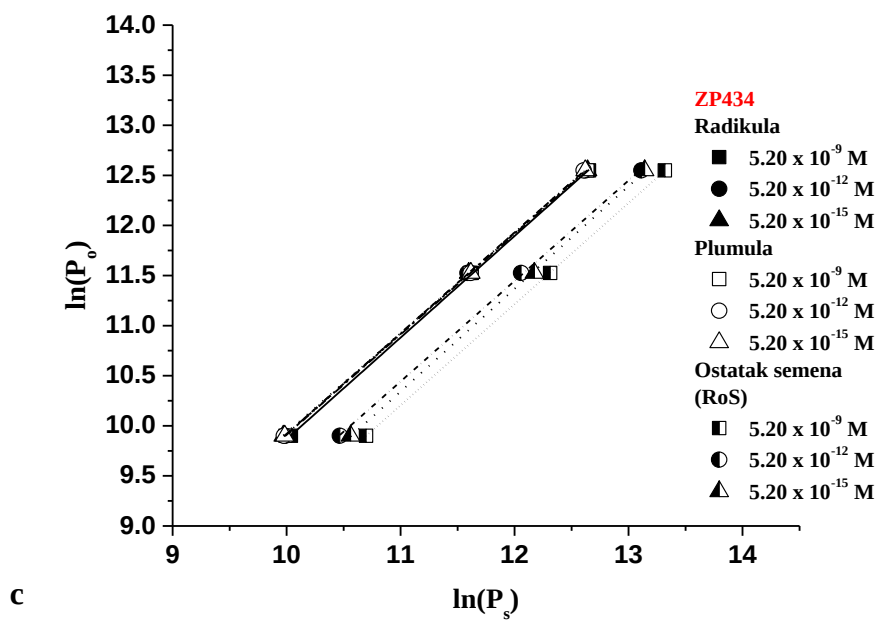
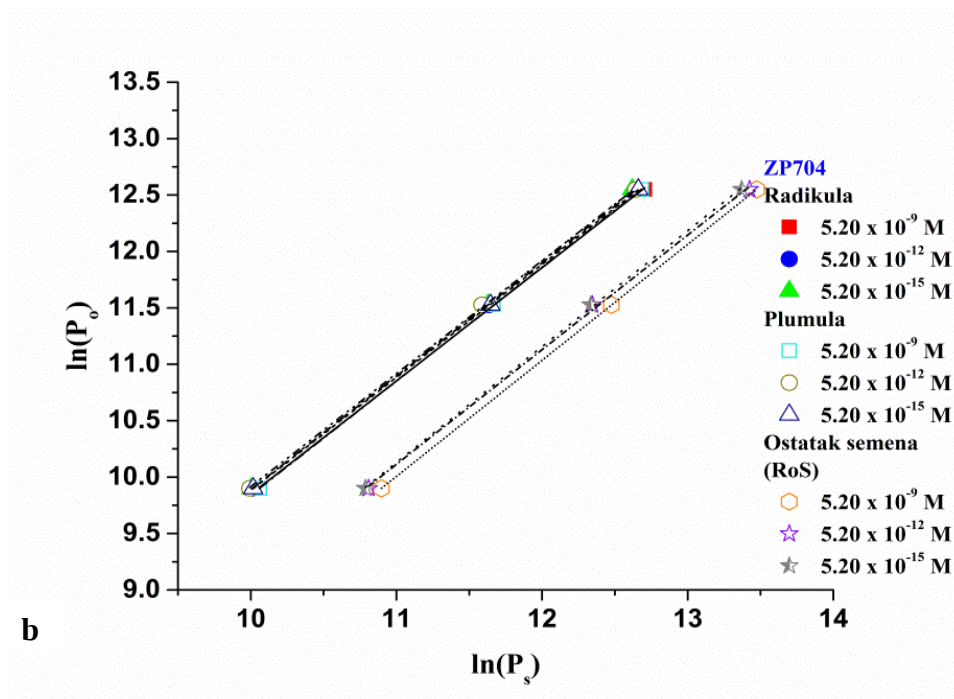
Iz Tabele 20 se može videti da se zavisnost M od a_w (računajući kontrolne uzorke i one tretirane 24-EBL-om), za sve delove klijanaca, može opisati modelnim jednačinama sa različitim brojem parametara. Za oba hibrida upotrebljena je 3-parametarska *Belehradek*-ova jednačina koja najbolje opisuje aktuelnu zavisnost. S druge strane, za oba hibrida tretirana 24-EBL-om, upotrebljena je dvo-parametarska modifikovana *Halsey*-eva jednačina. Vrednosti parametara prikazanih u Tabeli 20 predstavljaju prosečne vrednosti za razmatrani temperaturni opseg. Ove vrednosti su uzete kao prosečne od dva očitavanja za svaku temperaturu. Ovi modeli (Tabela 20) predstavljaju najbolje metode za opisivanje realne zavisnosti između M i a_w i ovo je predstavljeno jednačinama u Tabeli 20.

Logaritamske zavisnosti pritiska pare (aktuelnog $\ln(P_o)$, i saturisanog, $\ln(P_s)$) za sve uzorke oba hibrida, prikazane su na Slici 51. ((a), (b), (c)). U svim posmatranim slučajevima dobijene su visoko linearne zavisnosti. Nagibi linearnih prava, za sve kontrolne uzorke se razlikuju od nagiba prava za tretirane klijanace (Slika 51 ((a), (b) i (c)). Ovo nedvosmisleno ukazuje na različite vrednosti L/h_{fg} .



a

Slika 51. (Nastavak)



Slika 51. Logaritamske zavisnosti pritiska pare (aktuelnog $\ln(P_o)$, i saturisanog, $\ln(P_s)$) za sve uzorke oba hibrida.

Na osnovu ovih rezultata izvršeno je usklađivanje vrednosti L/h_{fg} , prikazanih u Tabeli 21. S obzirom da postoji logaritamska linearna zavisnost $\ln(P_o)$ i $\ln(P_s)$, može se zaključiti da postoji veza između L/h_{fg} i M , koja se može opisati različitim matematičkim relacijama.

Tabela 21. Usklađivanje izračunatih vrednosti L/h_{fg}

ZP434 - Kontrola			
L/h_{fg}	Radikula	Plumula	RoS
	1.01819	1.06505	1.06085
ZP704 - Kontrola			
L/h_{fg}	Radikula	Plumula	RoS
	1.05333	1.17210	1.20256
ZP434 – Kontrola; Logička funkcija: $L/h_{fg} = (a_1^* - a_2^*)/[1 + (M/p)^\theta] + a_2^*$			
a_1^*	1.02837		
a_2^*	1.06505		
p	5.34433		
θ	3.00000		
ZP704 – Kontrola; Logička funkcija: $L/h_{fg} = (a_1^* - a_2^*)/[1 + (M/p)^\theta] + a_2^*$			
a_1^*	1.05333		
a_2^*	1.21459		
p	4.61068		
θ	3.00000		
ZP434			
Radikula			
c (M)	L/h_{fg}		
5.20 ×			
10^{-9}	1.01402		
10^{-12}	1.00660		
10^{-15}	0.99291		
Plumula			
c (M)	L/h_{fg}		
5.20 ×			
10^{-9}	1.00111		
10^{-12}	1.00545		
10^{-15}	1.00384		

Tabela 21. (Nastavak)

RoS			
c (M)	L/h_{fg}		
5.20 ×			
10^{-9}	1.00976		
10^{-12}	1.00313		
10^{-15}	1.02494		
ZP704			
Radikula			
c (M)	L/h_{fg}		
5.20 ×			
10^{-9}	1.00420		
10^{-12}	1.00438		
10^{-15}	1.01198		
Plumula			
c (M)	L/h_{fg}		
5.20 ×			
10^{-9}	1.01026		
10^{-12}	1.00098		
10^{-15}	1.00119		
RoS			
c (M)	L/h_{fg}		
5.20 ×			
10^{-9}	1.02858		
10^{-12}	1.01585		
10^{-15}	1.02725		
ZP434 –Eksponecijalna funkcija (prvog reda): $L/h_{fg} = 1 + a^* \exp(-b^* \cdot M)$			
Parametar	Radikula	Plumula	RoS
a^*	0.00441	0.00045	0.00320
b^*	8.48903	10.90291	11.78133
ZP704 - Eksponecijalna funkcija (prvog reda): $L/h_{fg} = 1 + a^* \exp(-b^* \cdot M)$			
Parametar	Radikula	Plumula	RoS
a^*	0.00065	0.00030	0.00893
b^*	6.45209	7.46124	9.21501

Iz Tabele 21 se može videti da se zavisnost L/h_{fg} od M može opisati sa dve različite matematičke funkcije u razmatranom sistemu. Za kontrolne uzorke oba hibrida, $L/h_{fg} = L/h_{fg}(M)$ zavisnost se može opisati logističkom funkcijom sa četiri parametra i istom vrednošću parametra oblika θ ($\theta = 3$). Parametar skale (p) se razlikuje za kontrolne uzorke oba hibrida (Tabela 21). Imajući u vidu iste vrednosti parametara oblika, funkcionalna zavisnost $L/h_{fg} = L/h_{fg}(M)$ je gotovo ista za sve kontrolne uzorke oba hibrida, dok različite vrednosti parametra skale (Tabela 21) menjaju stepen širenja posmatrane funkcije.

Naime, veći parametar skale podrazumeva veće rasprostiranje funkcije, čime se skraćuje saturacioni period. Posmatrajući rezultate iz Tabele 21 (vrednosti parametra skale i L/h_{fg} vrednosti), za slučaj kontrolnih uzoraka hibrida ZP 434, ukazuju na povećanu verovatnoću (u slučaju kada je vrednost parametra skale veća, a kada je odnos L/h_{fg} niži) za zadržavanje vode u biosistemu u poređenju sa ZP 704, kada su kontrolni uzorci u pitanju. Ovo potvrđuje i daje neke od razloga otpornosti na dehidraciju hibrida ZP 434 u odnosu na hibrid ZP 704 za koju važi uvreženo mišljenje.

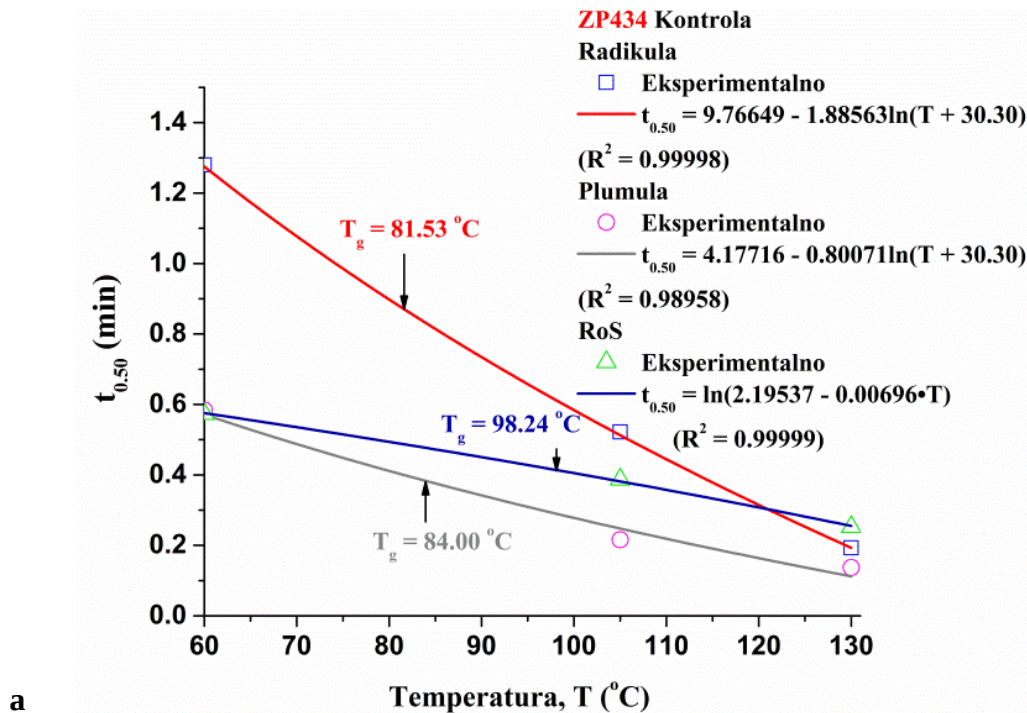
U prisustvu 24-EBL-a, za oba hibrida zapaža se drugačija situaciju. Zavisnost $L/h_{fg} = L/h_{fg}(M)$ se u poslednjem slučaju može opisati eksponencijalnom funkcijom prvog reda (Tabela 21). Povećana vrednost parametra b^* za hibrid ZP 434 (Tabela 21), ukazuje na negativan efekat prisustva 24-EBL-a, na procese dehidracije u odnosu na hibrid ZP 704. Ovo znači da egzogeno dodati 24-EBL u hibridu ZP 704 utiče na povećano zadržavanje vode, a samim tim i na otpornost na dehidraciju.

Slika 52 od (a) do (b) pokazuje krive polu-vremena ($t_{0.50}$) u funkciji temperature (T), sa jasno naznačenim vrednostima temperature staklastog prelaza (T_g), koje su određene u saglasnosti sa opisanim postupkom. Ista slika pokazuje odgovarajuće funkcionalne zavisnosti (koje su izražene datim matematičkim oblikom) između $t_{0.50}$ i T . Slika 52 (c) i (d) pokazuje zavisnosti vrednosti konstanti brzine koje su izračunate na osnovu pretpostavke da se proces dehidracije odvija kroz reakciju prvog reda (izraz za konstantu brzine k za reakciju prvog reda ima oblik $k = 0.69315 / t_{0.50}$) u funkciji od razlike ($T - T_g$) (koja predstavlja stabilnost sistema na temperaturama ispod i iznad temperature staklastog prelaza (T_g)). U slučaju kontrolnih uzoraka svih delova klijanaca za hibrid ZP 434, vidi se variranje u T_g između 81.53 i 98.24°C (Slika 52 (a)). U slučaju

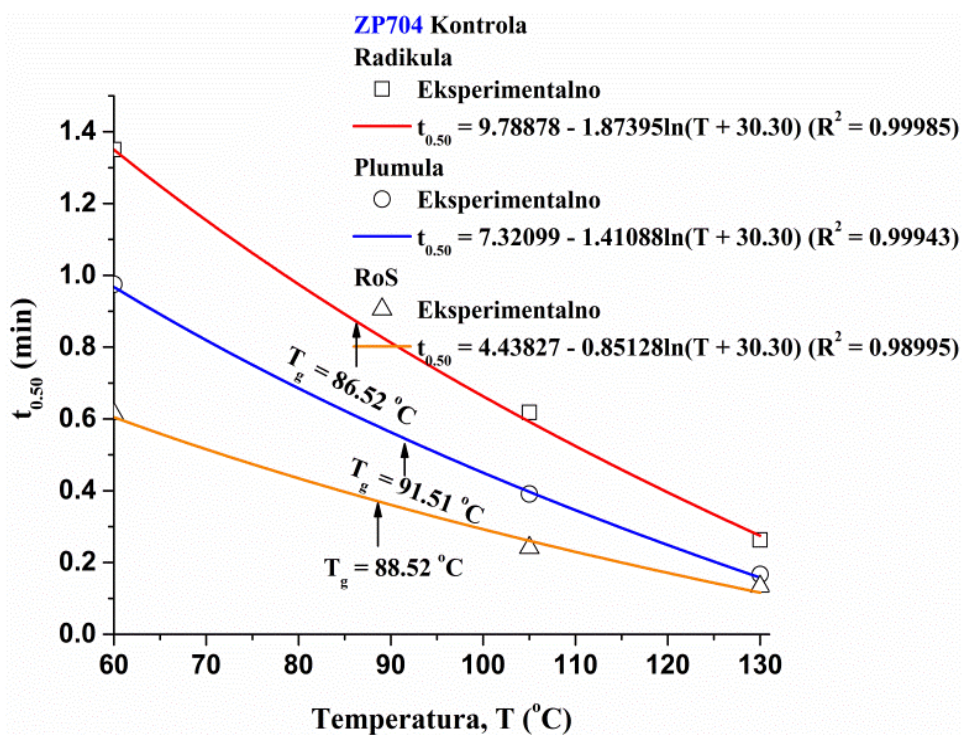
svih delova kljanaca, za kontrolne uzorke, variranje T_g je znatno manje (u opsegu od 86.52 do 91.51°C) (Slika 52 (b)). Širi opseg variranja T_g za hibrid ZP 434 u odnosu na hibrid ZP 704 ukazuje da je u hibridu ZP 434, posmatrajući sve delove kljanaca, aktivirano više jedinjenja i da se više jedinjenja akumulira i utiče na otpornost delova kljanaca na dehidratacioni stres. Različito ponašanje hibrida se odražava kroz različito ponašanje svih delova kljanaca, što se može videti sa Slike 52. (c) i (d). Viša vrednost $(T - T_g)$ (tj. iznad staklastog prelaza) znači veću brzinu reakcije. Najveće vrednosti konstanti brzine povezane sa porastom $(T - T_g)$ su bile uočene u plumuli hibrida ZP 434 hibrida i u RoS za hibrid ZP 434 (Slika 52 (c) i (d)).

Sve krive predstavljene na Slici. 52 (c) pokazuju ne tako niske vrednosti konstanti brzine kada se proces prati na temperaturama ispod T_g . Ovi rezultati potvrđuju prethodno iznetu činjenicu da je zadržavanje vode produženo u slučaju hibrida ZP 434 u odnosu na hibrid ZP 704, kada su kontrolni uzorci u pitanju. Razlike se posebno mogu videti kada je u pitanju plumula (Slika 52 (a) i (b)), i one su reverzibilne. Slično grupi 3 LEA proteina, GmPM16 protein interaguje sa saharozom i rafinozom (prvenstveno sa saharozom) (Slika 18 i 20) i na taj način povećava T_g šećerno-proteinskog matriksa, što sugerise da je zajednička uloga grupe 3 i 4 LEA proteina (Shih *et al.* 2004) povezana sa formiranjem čvrstog staklastog matriksa u osušenim delovima kljanaca. Za proteine ove grupe je pronađeno da se akumuliraju u delovima kljanaca kukuruza (Shih *et al.* 2004), čime se može dati pretpostavka za višu toleranciju na sušu kod kljanaca hibrida ZP 434 u odnosu na hibrid ZP 704 (Slika 52).

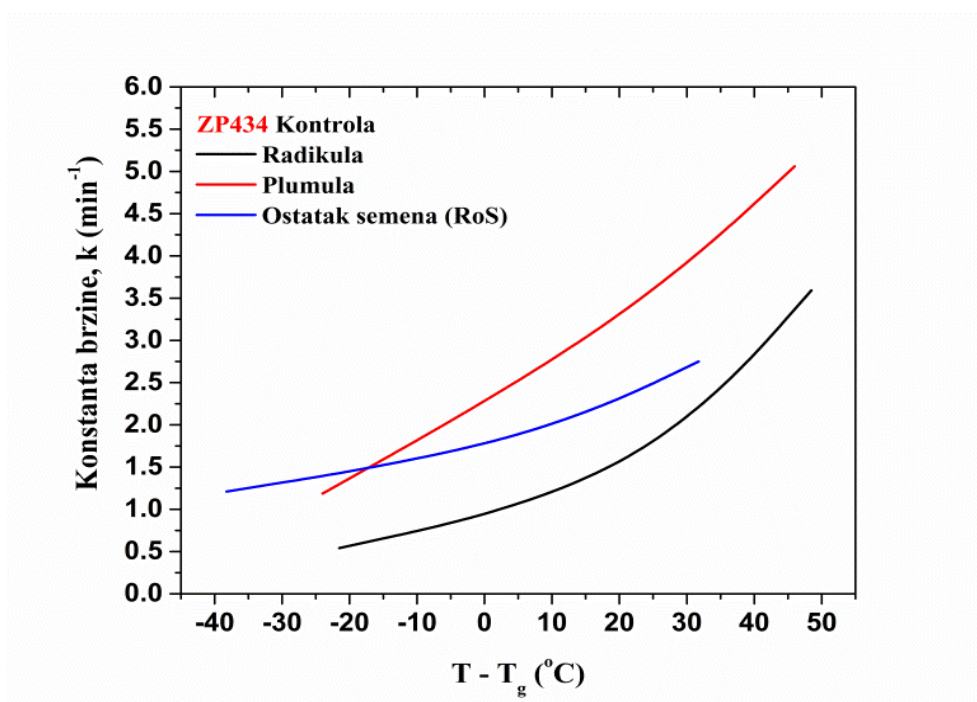
Pretpostavka je da LEA proteini akumulirani u visokom procentu (Tunnacliffe *et al.*, 2010; Beckett and Minibayeva, 2007) povećavaju gustinu šećerno-proteinskog matriksa sačinjenog od saharoze, čime se učvršćuje jačina veze između molekula vodonika u mrežnoj strukturi semena kukuruza, što prouzrokuje povećanje T_g . Ovakvo ponašanje je dokazano i u prethodno iznetim rezultatima (kako sa kinetičkog tako i termodinamičkog stanovišta) i dominantnije je kod hibrida ZP 434, čiji kljanci pokazuju karakteristike otpornijeg hibrida u odnosu na hibrid ZP 704 kada je stres suše u pitanju.



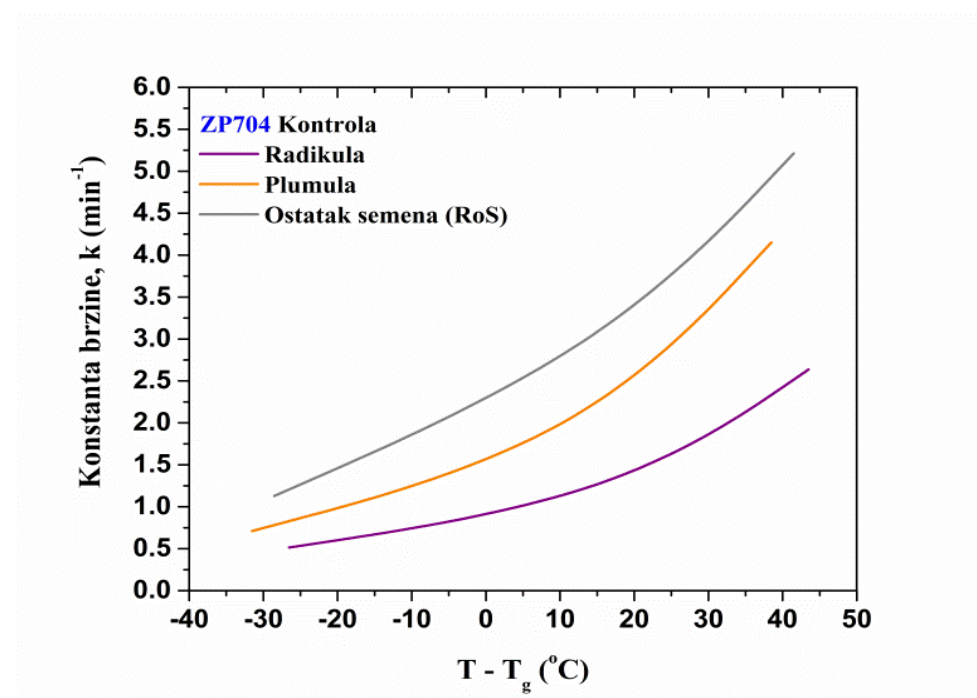
a



b



c



d

Slika 52. od (a) do (b) Krive polu-vremena ($t_{0.50}$) u funkciji temperature (T), sa naznačenim vrednostima temperature staklastog prelaza (T_g) i od (c) do (d) vrednosti konstanti brzine povezane sa porastom ($T - T_g$)

5. ZAKLJUČCI

5 ZAKLJUČCI

Posmatrajući uticaj 24-EBL-a na klijanje semana hibrida ZP 434 i hibrida ZP 704, može se zaključiti da hibridi reaguju različito na egzogeno dodati 24-EBL. Najveći (inhibitorni) uticaj 24-EBL na klijanje semena oba hibrida zapažen je pri najvišoj primenjenoj koncentraciji (5.2×10^{-7} M) i iznosi 86% za ZP 434 i 72% za ZP 704. Može se zaključiti da su klijanci hibrida ZP 434 osetljiviji na dejstvo 24-EBL-a u odnosu na klijanace hibrida ZP704, zato što semena hibrida ZP 434 imaju višu klijavost pri dejstvu svih ispitivanih koncentracija 24-EBL-a, dok hibrid ZP 704 pokazuje tako visoku klijavost jedino pri najnižoj ispitivanoj koncentraciji (5.2×10^{-15} M) 24-EBL-a.

Utvrđeno je da niže koncentracije egzogeno dodatog 24-EBL-a imaju pozitivan efekat na izduživanje plumule kod klijanaca hibrida ZP 434. Tretman 24-EBL-om deluje negativno na preraspodelu suve mase u plumulama oba hibrida kukuruza, dok se zapaža izvesno uvećanje mase kod klijanaca hibrida ZP434, sve do tretmana 24-EBL-om koncentracije od 5.2×10^{-11} M. Koncentracija 24-EBL-a nema bitnog uticaja na suvu masu korenova klijanaca ZP704 hibrida, sve do najviše primenjene koncentracije 24-EBL (5.2×10^{-7} M), kada se zapaža inhibitorno dejstvo 24-EBL-a.

Hibrid ZP 434 je imao veće vrednosti SVI-II pri nižim koncentracijama 24-EBL-a u poređenju sa kontrolnim uzorcima, dok je hibrid ZP 704 imao niže vrednosti SVI-II na svim koncentracijama, u poređenju sa kontrolnim uzorcima, što dodatno potvrđuje zapaženu činjenicu različite osetljivosti semena i klijanaca ispitivanih hibrida kukuruza na egzogeno dodati 24-EBL. Možemo pretpostaviti da će klijanci hibrida ZP 434, tretirani nižim koncentracijama 24-EBL (od 5.2×10^{-15} do 5.2×10^{-12} M) imati veće šanse za preživljavanje i povećanu toleranciju na različite negativne uticaje iz životne sredine u ranim fazama vegetativnog razvoja.

Niske vrednosti odnosa hlorofila *a* i hlorofila *b* (Chl *a/b*) fotosintetičkih pigmenata, u plumulama oba hibrida kukuruza ukazuje na nisku aktivnost fotosintetičkog aparata, što i nije iznenađujuće za rane stadijume rastenja i razvića klijanaca kukuruza.

Iz analize sadržaja mineralnih elemenata i nalaza o redistribuciji visoko toksičnih elemenata na nivou klijanca, može se zaključiti da klijanci kukuruza ispitivanih hibrida tretirani različitim, uglavnom niskim koncentracijama 24-EBL-a, mogu preživeti područja zagađena teškim metalima pre svega zahvaljujući blokiranju pokretljivosti toksičnih elemenata pre nego što se distribuiraju u stablo i koren (plumulu i radikulu). Takođe, posmatrajući hibride ZP 704 i ZP 434, može se zaključiti da su usled smanjene distribucije toksičnih elemenata unutar klijanaca isti pogodni za rastenje na zagađenom području, ali ih upravo taj razlog ne čini pogodnima za fitoremedijaciju zagađenog zemljišta.

Nađeno je da hibrid ZP 434 sadrži veoma polarna jedinjenja koja su prisutnija u hibridu ZP 434 u većem obimu, za razliku od hibrida ZP 704, kao i da visoke koncentracije 24-EBL-a imaju inhibirajući efekat na sadržaj polifenola. Metodom masene spektrometrije visoke rezolucije izvršena je identifikacija različitih polifenolnih jedinjenja i njihovih klasa u uzorcima i nađeno je da 24-EBL različito deluje na dva ispitivana hibrida kukuruza. Takođe, nađeno je da hibrid ZP 434 sadrži veći broj polifenolnih jedinjenja u odnosu na hibrid ZP 704. Kod oba hibrida, sadržaj polifenola je veći u plumuli u poređenju sa radikulom.

Na osnovu izokonverzionog pristupa primenjenog na klijancima različitih hibrida kukuruza, nađeno je da prividna energija aktivacije verovatno zavisi od interakcija molekula vode i proteinskih struktura u klijancima, naročito u ranim stupnjevima dehidratacionog procesa. Nađeno je i da prisustvo 24-EBL-a ima značajan uticaj na promenu izokonverzionog reakcionog profila u slučaju plumule i radikule kod hibrida ZP 434, kao i na isti profil vezan za plumulu hibrida ZP 704 pri koncentracijama 24-EBL-a od 5.2×10^{-9} i 5.2×10^{-12} M. Takođe, u slučaju radikule kod ZP 434 hibrida je nađeno da je vrednost prividne energije aktivacije direktno proporcionalna sadržaju trehaloze, čiji porast uzrokuju niže koncentracije 24-EBL-a.

U slučaju kontrolnih uzoraka oba ispitivana hibrida, nađeno je prisustvo mehanizma dehidratacije prvog reda, koji se može pripisati gubitku prvog vodenog sloja koji pripada strukturi međuslojeva od kojih je sistem sačinjen. Utvrđeno je da porast temperature smanjuje difuzioni efekat, najverovatnije usled porasta ravnotežnog

sadržaja molekula vode koji se oslobađaju iz delova klijanaca, gde uloga proteina i njihove “okoline”, može uticati na brzinu dehidracije.

Ustanovljeno je da u slučaju hibrida ZP 434, 24-EBL-a, najverovatnije utiče na dehidratacione procese preko sadržaja fosfora u delovima klijanaca. Pretpostavljeno je da egzogeno dodati 24-EBL, prouzrokuje osetljivost na dehidracioni stres u plumuli preko fenomena interakcije vode sa primarnim amino grupama kao katjonima u poliaminima. Niska koncentracija 24-EBL-a najverovatnije omogućava interakciju molekula vode sa poliaminima preko vodoničnih veza. Detaljna analiza je pokazala da dobijene vrednosti aktivacije u slučaju oba hibrida odgovaraju vrednostima energije disocijacije veze potrebne za raskidanje vodoničnih veza. Na osnovu analize koja uključuje kinetičko predviđanje procesa, pokazano je da ekstremno visoka temperatura u slučaju hibrida ZP704 snabdeva sistem sa dovoljno energije, time povećavajući mobilnost vode, čime se povećava i brzina dehidracije, a skraćuje vreme života klijanaca.

Termodinamičkom analizom oba ispitivana hibrida kukuruza tretirana različitim koncentracijama 24-EBL-a je nađeno da svi delovi klijanca, u slučaju hibrida ZP 704, u poređenju sa hibridom ZP 434, pokazuju višu stabilnost (u energetsom pogledu) na uticaj egzogeno dodatog 24-EBL-a tokom procesa dehidracije.

Na osnovu enatalpijsko-entropijske kompezacione teorije, nađeno je da je mehanizam desorpcije vode u ispitivanim hibridima entropijski kontrolisan, gde dobijeni rezultati ukazuju da mikrostruktura klijanaca nije stabilna i da trpi promene tokom dehidracije. Takođe, na osnovu BET i modifikovanog BET pristupa, nađeno je da je klijanci hibrida ZP 704 u prisustvu 24-EBL-a lakše odaju vodu za razliku od hibrida ZP 434, kod koga 24-EBL izaziva teže odavanje vode.

Porast temperature u slučaju hibrida ZP704 dovodi do snižavanja pritiska širenja i bržeg odavanja vode iz radikule, što nije slučaj kod hibrida ZP 434.

6. *LITERATURA*

6 LITERATURA

- Abe H. 1989. Advances in brassinosteroid research and prospects for its agricultural application. *Japan Pesticide Information* 10-14.
- Adebisi M A, Kehinde T O, Porbeni J B O, Oduwaye O A, Biliaminu K, and Akintunde S A 2014. Seed and Seedling Vigour in Tropical Maize Inbred Lines. *Plant Breeding and Seed Science*, **67**(1), 87-102
- Adebisi M A, Okelola F S, Ajala M O, Kehinde T O, Daniel I O, and Ajani O O. 2013. Evaluation of Variations in Seed Vigour Characters of West African Rice (*Oryza sativa* L.) Genotypes Using Multivariate Technique. *American Journal of Plant Sciences*, **4**(2).
- Ahmad, P., & Rasool, S. (Eds.). (2014). Emerging Technologies and Management of Crop Stress Tolerance: The Role of Carbohydrates in Plant Resistance to Abiotic Stresses Marina S. Krasavina, Natalia A. Burmistrova and Galina N. Raldugina (Vol. 1). *Academic Press*.
- Albertorio F, Chapa VA, Chen X, Diaz AJ, Cremer PS. 2007. The α,α -(1–1) linkage of trehalose is key to anhydrobiotic preservation. *Journal of the American Chemical Society*. 129:10567–74
- Ali, Q., & Ashraf, M. (2011). Induction of drought tolerance in maize (*Zea mays* L.) due to exogenous application of trehalose: growth, photosynthesis, water relations and oxidative defence mechanism. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 197(4), 258-271.
- Amić, A. (2012) Utjecaj navodnjavanja i prihrane dušikom na fotosintetsku efikasnost listova kukuruza (*Zea mays* L.). *Diplomski rad*. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
- Ankudo, F. T. (2004). ‘Immunomodulation of brassinosteroid function in seeds of *Arabidopsis thaliana* (L.). *Akademik Derece Tezi, Martin-Luther Üniversitesi, Matematik-Doğa Bilimleri-Mühendislik Bilimleri, Halle-Wittenberg, Almanya*, 1-71.

- Anonymus a., (2016).
<http://www.plantsciences.ucdavis.edu/gepts/pb143/LEC17/pb143l17.htm>
- Anonymus b., (2016) http://www.obz.hr/vanjski/CD_AGBASE2/HTM/kukuruz.htm
- Anonymus c ., (2016).
https://bs.wikipedia.org/wiki/Kukuruz#/media/File:Zea_mays_K%C3%B6hler%E2%80%93Medizinal-Pflanzen-283.jpg
- Anonymus d., (2016)- <http://www.chm.bris.ac.uk/motm/brassinolide/brassinolideh.htm>
- Anonymus e., (2016)-<http://www.uqtr.quebec.ca/~daoustb/publication.html>
- Anonymus(f), (2016)-
<http://faculty.virginia.edu/mcgarveylab/Carbsyn/Carblast/html/disacch.html>
- Anonymus g., (2016)-<https://mrizp.rs/>
- Arnous, A., Makris, D. P., & Kefalas, P. (2001). Effect of principal polyphenolic components in relation to antioxidant characteristics of aged red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(12), 5736-5742.
- Asada, K. (1999). The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual review of plant biology*, 50(1), 601-639.
- Asakawa, S., Abe, H., Nishikawa, N., Natsume, M., & Koshioka, M. (1996). Purification and identification of new acyl-conjugated teasterones in lily pollen. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 60(9), 1416-1420.
- Asami, T., Min, Y. K., Nagata, N., Yamagishi, K., Takatsuto, S., Fujioka, S., ... & Yoshida, S. (2000). Characterization of brassinazole, a triazole-type brassinosteroid biosynthesis inhibitor. *Plant Physiology*, 123(1), 93-100.
- Asami, T., Mizutani, M., Shimada, Y., Hideki, G. O. D. A., Kitahata, N., Sekimata, K., ... & Yoshida, S. (2003). Triadimefon, a fungicidal triazole-type P450 inhibitor, induces brassinosteroid deficiency-like phenotypes in plants and binds to DWF4 protein in the brassinosteroid biosynthesis pathway. *Biochemical Journal*, 369(1), 71-76.
- Baitalow, F., Schmidt, H. G., & Wolf, G. (1999). Formal kinetic analysis of processes in the solid state. *Thermochimica Acta*, 337(1), 111-120.

- Bajguz, A. (2007). Metabolism of brassinosteroids in plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45(2), 95-107.
- Bajguz, A. (2011). Brassinosteroids - occurrence and chemical structures. In Brassinosteroids: A class of plant hormones, S. Hayat and A. Ahmad, eds (*Dordrecht: Springer*), pp. 1-27
- Bajguz, A., & Asami, T. (2005). Suppression of *Wolffia arrhiza* growth by brassinazole, an inhibitor of brassinosteroid biosynthesis and its restoration by endogenous 24-epibrassinolide. *Phytochemistry*, 66(15), 1787-1796.
- Bajguz, A., & Czerpak, R. (1998). Physiological and biochemical role of brassinosteroids and their structure-activity relationship in the green alga *Chlorella vulgaris* Beijerinck (Chlorophyceae). *Journal of Plant Growth Regulation*, 17(3), 131-139.
- Bajguz, A., & Hayat, S. (2009). Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47(1), 1-8.
- Beckett, R.P., & Minibayeva, F.V. (2007). Desiccation Tolerance in Lichens, In: *Plant Desiccation Tolerance*, Ch. 4, Jenks, M.A., & Wood, A.J. (Eds.), Blackwell Publishing Ltd., Ames, Iowa 50014, USA, pp. 93-115.
- Bian, H. W., Wang, J. H., Lin, W. Q., Han, N., & Zhu, M. Y. (2002). Accumulation of soluble sugars, heat-stable proteins and dehydrins in cryopreservation of protocorm-like bodies of *Dendrobium candidum* by the air-drying method. *Journal of Plant Physiology*, 159(10), 1139-1145.
- Bishop, G. J., & Koncz, C. (2002). Brassinosteroids and plant steroid hormone signaling. *The Plant Cell*, 14(suppl 1), S97-S110.
- Brown, M. E., & Galwey, A. K. (1989). Arrhenius parameters for solid-state reactions from isothermal rate-time curves. *Analytical Chemistry*, 61(10), 1136-1139.
- Brunauer, S., Emmett, P.H., & Teller, E. (1938). Adsorption of gases in multimolecular layers. *Journal of the American Chemical Society*, 60(2), 309-319.

- Buitink, J., Walters-Vertucci, C., Hoekstra, F.A., & Leprince, O. (1996). Calorimetric properties of dehydrating pollen: Analysis of a desiccation tolerant and an intolerant species. *Plant Physiology*, 111, 235-242.
- Darley, C. P., Forrester, A. M., & McQueen-Mason, S. J. (2001). The molecular basis of plant cell wall extension. In *Plant Cell Walls* (pp. 179-195). Springer Netherlands.
- Celik, H., Asik, B. B., Gurel, S., & Katkat, A. V. (2010). Effect of potassium and iron on macro element uptake of maize. *Zemdirbyste-Agriculture*, 97(1), 11-22.
- Chang, B. S., Beauvais, R. M., Dong, A., & Carpenter, J. F. (1996). Physical factors affecting the storage stability of freeze-dried interleukin-1 receptor antagonist: glass transition and protein conformation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 331(2), 249-258.
- Churikova, V.V., and Vladimirova, I.N. 1997. Effect of epin on activity of enzymes of oxidative metabolism of cucumber in peronosporous epiphytotic conditions. In: 4th Conference (Abstract) on Plant Growth and Development Regulators. Moscow, pp. 78.
- Close, T.J. (1996). Dehydrins: Emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. *Physiologia Plantarum*, 97, 795-803.
- Close, T.J. (1997). Dehydrins: A commonality in the response of plants to dehydration and low temperatures. *Physiologia Plantarum*, 100, 291-296.
- Clouse S. D. & Sasse J. M. (1998). Brassinosteroids: Essential Regulators of Plant Growth and Development. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49: 427–51.
- Clouse, S. D., & Zurek, D. (1991). Molecular analysis of brassinolide action in plant growth and development. In *ACS Symposium series-American Chemical Society (USA)*.
- Clouse, S. D., Hall, A. F., Langford, M., McMorris, T. C., & Baker, M. E. (1993). Physiological and molecular effects of brassinosteroids on *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Growth Regulation*, 12(2), 61-66.

Clouse, S. D. (2002). Brassinosteroids. *The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists*, 1, e0009

Clouse, S. D. (2011). Brassinosteroids. *The Arabidopsis book*, e0151.

Clouse, S. D., Zurek, D. M., McMorris, T. C., & Baker, M. E. (1992). Effect of brassinolide on gene expression in elongating soybean epicotyls. *Plant Physiology*, 100(3), 1377-1383.

Cramer, G. R., Urano, K., Delrot, S., Pezzotti, M., & Shinozaki, K. (2011). Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. *BMC plant biology*, 11(1), 163.

Crowe, J. H., Leslie, S. B., & Crowe, L. M. (1994). Is vitrification sufficient to preserve liposomes during freeze-drying?. *Cryobiology*, 31(4), 355-366.

Cui, S. W. (Ed.). (2005). *Food carbohydrates: chemistry, physical properties, and applications*. CRC Press.

D. T. Britto, H. J. Kronzucker, Sodium efflux in plant roots: What do we really know? *Journal of plant physiology*. 186 (2015) 1-12

De la Parra C., Serna-Saldivar S.O., & Liu R.H., Effect of processing on the phytochemical profiles and antioxidant activity of corn for production of masa, tortillas, and tortilla chips, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55, 4177–4183.

Del Pozo-Insfran, D., Brenes, C. H., Saldivar, S. O. S., & Talcott, S. T. (2006). Polyphenolic and antioxidant content of white and blue corn (*Zea mays* L.) products. *Food Research International*, 39(6), 696-703.

Dhillon, K. S., & Dhillon, S. K. (1996). Studies on the toxicity of selenium and other elements in soil-plant-animal system using radiotracer techniques. In *Isotopes and radiations in agriculture and environment research*.

Duddu, S. P., & Dal Monte, P. R. (1997). Effect of glass transition temperature on the stability of lyophilized formulations containing a chimeric therapeutic monoclonal antibody. *Pharmaceutical research*, 14(5), 591-595.

Edwards, G., & Walker, D. (1983). C3, C4: mechanisms, and cellular and environmental regulation, of photosynthesis. *University of California Press*.

Egerton-Warburton, L.M., Balsamo, R.A., & Close, T.J. (1997). Temporal accumulation and ultrastructural localization of dehydrins in *Zea mays* L. *Physiologia Plantarum*, 101, 545-555.

Ekdawi-Sever, N., de Pablo, J.J., Feick, E., von Meerwall, E., 2003. Diffusion of sucrose and α,α – trehalose in aqueous solutions. *The Journal of Physical Chemistry A* 107, 936-943.

El-Khallal, S. M., Hathout, T. A., Ashour, A. E. A., & Kerit, A. A. A. (2009). Brassinolide and salicylic acid induced growth, biochemical activities and productivity of maize plants grown under salt stress. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 5(4), 380-390.

EPA U.S. Method 3051B (2007) Microwave assisted acid digestion of sediments, sludges, 1155 soils, and oils.

Babani F. & Lichtenthaler H. K. (1996). Light-induced and Age-dependent Development of Chloroplasts in Etiolated Barley Leaves as Visualized by Determination of Photosynthetic Pigments, CO₂ Assimilation Rates and Different Kinds of Chlorophyll Fluorescence Ratios. *Journal of Plant Physiology*. 148 (5) 555-566

Bittner, F. (2014). Molybdenum metabolism in plants and crosstalk to iron. *From soil to seed: micronutrient movement into and within the plant*, 73.

Farooq, M., Wahid, A., & Basra, S. M. A. (2009). Improving water relations and gas exchange with brassinosteroids in rice under drought stress. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 195(4), 262-269.

Fasina, O.O., Ajibola, O.O., & Tyler, R.T. (1999). Thermodynamics of moisture sorption in winged bean seed and gari. *Journal Of Food Process Engineering*, 22, 405-418.

Feng, X. H., & Derynck, R. (1997). A kinase subdomain of transforming growth factor- β (TGF- β) type I receptor determines the TGF- β intracellular signaling specificity. *The EMBO Journal*, 16(13), 3912-3923.

Fiziologija biljaka, Mirjana Nešković, Radomir Konjević, Ljubinka Čulafić, *NNK International, Beograd, (2010)*

Friedman, H. L. (1964, January). Kinetics of thermal degradation of char-forming plastics from thermogravimetry. Application to a phenolic plastic. In *Journal of Polymer Science Part C: Polymer Symposia* (Vol. 6, No. 1, pp. 183-195). Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company.

Fujioka, S., & Sakurai, A. (a) (1997). Brassinosteroids. *Natural product reports*, 14(1), 1-10.

Fujioka, S., & Sakurai, A. (1997). Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids. *Physiologia Plantarum*, 100(3), 710-715.

Fujioka, S., & Yokota, T. (2003). Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids. *Annual Review of Plant Biology*, 54(1), 137-164.

Fujioka, S., Inoue, T., Takatsuto, S., Yanagisawa, T., Yokota, T., & Sakurai, A. (1995). Identification of a new brassinosteroid, cathasterone, in cultured cells of *Catharanthus roseus* as a biosynthetic precursor of teasterone. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 59(8), 1543-1547.

Fujita F. 1985. Prospects for brassinolide utilization in agriculture. *Chemical Biology* 23: 717-725.

Fujita, S., Ohnishi, T., Watanabe, B., Yokota, T., Takatsuto, S., Fujioka, S., ... & Mizutani, M. (2006). *Arabidopsis* CYP90B1 catalyses the early C-22 hydroxylation of C27, C28 and C29 sterols. *The Plant Journal*, 45(5), 765-774.

Fukuda H. (1997) Tracheary element differentiation. *Plant Cell* 9:1147–56;

Gaffney, S. H., Haslam, E., Lilley, T. H., & Ward, T. R. (1988). Homotactic and heterotactic interactions in aqueous solutions containing some saccharides. Experimental results and an empirical relationship between saccharide solvation and solute–solute interactions. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1: Physical Chemistry in Condensed Phases*, 84(8), 2545-2552.

Gallego-Bartolomé, J., Minguet, E. G., Grau-Enguix, F., Abbas, M., Locascio, A., Thomas, S. G., ... & Blázquez, M. A. (2012). Molecular mechanism for the interaction between gibberellin and brassinosteroid signaling pathways in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(33), 13446-13451.

Galmés, J., Pou, A., Alsina, M. M., Tomas, M., Medrano, H., & Flexas, J. (2007). Aquaporin expression in response to different water stress intensities and recovery in Richter-110 (*Vitis* sp.): relationship with ecophysiological status. *Planta*, 226(3), 671-681.

Geiger, D. R., Servaites, J. C., & Fuchs, M. A. (2000). Role of starch in carbon translocation and partitioning at the plant level. *Functional Plant Biology*, 27(6), 571-582.

Giaquinta, R. T. (1983). Phloem loading of sucrose. *Annual Review of Plant Physiology*, 34(1), 347-387.

Goetz, M., Godt, D. E., & Roitsch, T. (2000). Tissue-specific induction of the mRNA for an extracellular invertase isoenzyme of tomato by brassinosteroids suggests a role for steroid hormones in assimilate partitioning. *The Plant Journal*, 22(6), 515-522.

Gogarten, J.P., Fichmann, J., Braun, Y., Morgan, L., Styles, P., and Taiz, S.L., 1992. The use of antisense mRNA to inhibit the tonoplast H⁺ ATPase in carrot. *Plant Cell*, 4: 851–864.

Gotor, F. J., Criado, J. M., Malek, J., & Koga, N. (2000). Kinetic analysis of solid-state reactions: the universality of master plots for analyzing isothermal and nonisothermal experiments. *The journal of physical chemistry A*, 104(46), 10777-10782.

- Griffiths G, P., Sasse M, J., Yokota, T., & Cameron W, D. (1995). 6-Deoxotyphasterol and 3-Dehydro-6-deoxoteasterone, Possible Precursors to Brassinosteroids in the Pollen of *Cupressus arizonica*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 59(5), 956-959.
- Grove M.D., Spencer G.F., Rohwedder W.K., Mandava N., Worley J.F., Warthen J.D., Stefiens G.L., Flippen-Anderson J.L. & Cook J.C. (1979). Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from *Brassica napus* pollen. *Nature* 281: 216-217.
- Lichtenthaler H. K., Chlorophyll and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in enzymology*. 148 (1987) 350-382.
- Marschner H., Functions of mineral nutrients: macronutrients. Mineral nutrition of higher plants 2nd Edition. *Academic Press*, NY, (1995) 299-312.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (1989). Lipid peroxidation: a radical chain reaction. *Free radicals in biology and medicine*, 2, 188-218.
- Hancock, J. D., & Sharp, J. H. (1972). Method of Comparing Solid-State Kinetic Data and Its Application to the Decomposition of Kaolinite, Brucite, and BaCO₃. *Journal of the American Ceramic Society*, 55(2), 74-77.
- Hartwig, T., Corvalan, C., Best, N. B., Budka, J. S., Zhu, J. Y., Choe, S., & Schulz, B. (2012). Propiconazole is a specific and accessible brassinosteroid (BR) biosynthesis inhibitor for Arabidopsis and maize. *PLoS One*, 7(5), e36625.
- Hastorf, C. A. (2009). Rio Balsas most likely region for maize domestication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(13), 4957-4958.
- Haubrick, L. L., & Assmann, S. M. (2006). Brassinosteroids and plant function: some clues, more puzzles. *Plant, cell & environment*, 29(3), 446-457.
- Hayat, S., & Ahmad, A. (Eds.). (2010). *Brassinosteroids: a class of plant hormone*. Springer Science & Business Media.
- Hayat, S., Ahmad, A., & Fariduddin, Q. (2003). *Brassinosteroids: A regulator of 21st century* (pp. 231-246). Springer Netherlands.

- Hayat, S., Ahmad, A., Mobin, M., Fariduddin, Q., & Azam, Z. M. (2001). Carbonic anhydrase, photosynthesis, and seed yield in mustard plants treated with phytohormones. *Photosynthetica*, 39(1), 111-114.
- He, R. Y., Wang, G. J., & Wang, X. S. (1991). Effects of brassinolide on growth and chilling resistance of maize seedlings. In *ACS Symposium series American Chemical Society*.
- Hellmann, H., Barker, L., Funck, D., & Frommer, W. B. (2000). The regulation of assimilate allocation and transport. *Functional Plant Biology*, 27(6), 583-594.
- Hirel, B., Martin, A., Tercé-Laforgue, T., Gonzalez-Moro, M. B., & Estavillo, J. M. (2005). Physiology of maize I: a comprehensive and integrated view of nitrogen metabolism in a C4 plant. *Physiologia Plantarum*, 124(2), 167-177.
- Holá, D., Rothová, O., Kočová, M., Kohout, L., & Kvasnica, M. (2010). The effect of brassinosteroids on the morphology, development and yield of field-grown maize. *Plant growth regulation*, 61(1), 29-43.
- Holá, D. (2011). Brassinosteroids and photosynthesis. In *Brassinosteroids: A class of plant hormone* (pp. 143-192). Springer Netherlands.
- Holclajtner-Antunović, I. D. (2000). *Opšti kurs fizičke hemije*. Zavod za udžbenike i nastavna sredstva.
- Hong, Z., Ueguchi-Tanaka, M., Shimizu-Sato, S., Inukai, Y., Fujioka, S., Shimada, Y., ... & Uozu, S. (2002). Loss-of-function of a rice brassinosteroid biosynthetic enzyme, C-6 oxidase, prevents the organized arrangement and polar elongation of cells in the leaves and stem. *The Plant Journal*, 32(4), 495-508.
- Hong, Z., Ueguchi-Tanaka, M., Umemura, K., Uozu, S., Fujioka, S., Takatsuto, S., ... & Matsuoka, M. (2003). A rice brassinosteroid-deficient mutant, ebisu dwarf (d2), is caused by a loss of function of a new member of cytochrome P450. *The Plant Cell*, 15(12), 2900-2910.

- Hong, Z., Ueguchi-Tanaka, M., & Matsuoka, M. (2004). Brassinosteroids and rice architecture. *Journal of Pesticide Science*, 29(3), 184-188.
- Horton, D. (2012). *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry* (Vol. 68). Academic Press.
- Hradecká, D., Urban, J., Pulkrábek, J., & Hnilicka, R. (2009). Utilization of brassinosteroids to stress control during growth and yield formation of sugar beet. *Listy Cukrovarnické a Reparské*, 125(9-10), 271.
- Parveen, I., Winters, A., Threadgill, M. D., Hauck, B., & Morris, P. (2008). Extraction, structural characterisation and evaluation of hydroxycinnamate esters of orchard grass (*Dactylis glomerata*) as substrates for polyphenol oxidase. *Phytochemistry*, 69(16), 2799-2806.
- Iganathane, C., Womac, A.R., Sokhansanj, S., & Pordesimo, L.O. (2007). Moisture sorption thermodynamic properties of corn stover fractions. *Transactions of the ASABE*, 50, 2151-2160.
- Iglesias, H.A., Chirife, J., & Viollaz, P. (1976). Thermodynamics of water vapour sorption by sugar beet root. *Journal of Food Technology*, 11, 91-101.
- Ikekawa, N., & Zhao, Y. (1991). Application of 24-epibrassinolide in agriculture. In *ACS Symposium series-American Chemical Society (USA)*.
- ISTA, International Seed Testing Association, Seed Testing International, International rules for seed testing. *Seed Science and Technology*. 21 (Suppl.) (1996) 1-288.
- Li, J., & Chory, J. (1999). Brassinosteroid actions in plants. *Journal of Experimental Botany*, 50(332), 275-282.
- Pearson, J. N., & Rengel, Z. (1994). Distribution and remobilization of Zn and Mn during grain development in wheat. *Journal of Experimental Botany*, 45(12), 1829-1835.

- Jones-Held, S., VanDoren, M., & Lockwood, T. (1996). Brassinolide application to *Lepidium sativum* seeds and the effects on seedling growth. *Journal of Plant Growth Regulation*, 15(2), 63-67.
- Kang, Y. Y., Guo, S. R., Li, J., & Duan, J. J. (2009). Effect of root applied 24-epibrassinolide on carbohydrate status and fermentative enzyme activities in cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings under hypoxia. *Plant growth regulation*, 57(3), 259-269.
- Kauschmann, A., Jessop, A., Koncz, C., Szekeres, M., Willmitzer, L., & Altmann, T. (1996). Genetic evidence for an essential role of brassinosteroids in plant development. *The Plant Journal*, 9(5), 701-713.
- Kaya, S., & Kahyaoglu, T. (2005). Thermodynamic properties and sorption equilibrium of pestil (grape leather). *Journal of Food Engineering*, 71, 200-207.
- Kharb, R. P. S., Lather, B. P. S., & Deswal, D. P. (1994). Prediction of field emergence through heritability and genetic advance of vigour parameters. *Seed science and technology*, 22(3), 461-466.
- Khawam, A., & Flanagan, D. R. (2006). Solid-state kinetic models: basics and mathematical fundamentals. *The journal of physical chemistry B*, 110(35), 17315-17328.
- Khripach, V. A., Zhabinskii, V. N., & Khripach, N. B. (2003). New practical aspects of brassinosteroids and results of their ten-year agricultural use in Russia and Belarus. In *Brassinosteroids* (pp. 189-230). Springer Netherlands.
- Khripach, V., Zhabinskii, V., & de Groot, A. (2000). Twenty years of brassinosteroids: steroidal plant hormones warrant better crops for the XXI century. *Annals of Botany*, 86(3), 441-447.
- Knežević, M. (2006) *Atlas korovne, ruderalne i travnjačke flore*. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera, Poljoprivredni fakultet, Osijek, 11,25

- Koch, K., & Mengel, K. (1974). The influence of the level of potassium supply to young tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L.) on short-term uptake and utilisation of nitrate nitrogen (^{15}N). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 25(5), 465-471.
- Kočová, M., Rothová, O., Holá, D., Kvasnica, M., Kohout, L., 2010. The exogenous application of brassinosteroids does not affect photosynthetic parameters in leaves of two fieldgrown maize inbred lines or their F1 hybrid. *Biologia Plantarum*, 54: 785–788.
- Komor, E. (2000). Source physiology and assimilate transport: the interaction of sucrose metabolism, starch storage and phloem export in source leaves and the effects on sugar status in phloem. *Functional Plant Biology*, 27(6), 497-505.
- Koornneef, M., & Karssen, C. M. (1994). 12 seed dormancy and germination. *Cold Spring Harbor Monograph Archive*, 27, 313-334.
- Korableva, N. P., Platonova, T. A., Dogonadze, M. Z., & Bibick, N. D. (1999). A stability change of potato to premature germination and diseases under the brassinosteroid action. *Regulators of plant growth and development*, 5, 102-103.
- Kravić, N. (2013). Analiza genetičke varijabilnosti kukuruza na tolerantnost prema suši.
- Leffler, J.E. (1955). The enthalpy-entropy relationship and its implications for organic chemistry. *The Journal of Organic Chemistry*, 20, 1202-1231.
- Leffler, J.E. (1965). Concerning the isokinetic relationship. *Nature*, 205, 1101-1102.
- Leopold, A.C., 1990. Coping with Desiccation. In: *Stress Responses in Plants: Adaptation and Acclimation Mechanisms*. Alscher, R., (Ed.), Wiley-Liss, Inc., New York, NY, USA, pp. 37-56.
- Leprince, O., Van der Werf, A., Deltour, R., & Lambers, H. (1992). Respiratory pathway in germinating maize radicles correlated with desiccation tolerance and soluble sugars. *Physiologia Plantarum* 85, 581-588.
- Lopez-Martinez, L. X., Parkin, K. L., & Garcia, H. S. (2011). Phase II-inducing, polyphenols content and antioxidant capacity of corn (*Zea mays* L.) from phenotypes

of white, blue, red and purple colors processed into masa and tortillas. *Plant foods for human nutrition*, 66(1), 41-47..

Lopez-Martinez, L. X., Oliart-Ros, R. M., Valerio-Alfaro, G., Lee, C. H., Parkin, K. L., & Garcia, H. S. (2009). Antioxidant activity, phenolic compounds and anthocyanins content of eighteen strains of Mexican maize. *LWT-Food Science and Technology*, 42(6), 1187-1192.

Lewis, D. H. (Ed.). (1984). *Storage Carbohydrates in Vascular Plants: Distribution, Physiology, and Metabolism* (Vol. 19). CUP Archive.

Li J, and Chory J. 1999. Brassinosteroid actions in plants. *Journal of Experimental Botany*, 50(332), 275-282

Li, L., Staden, J. V., & Jäger, A. K. (1998). Effects of plant growth regulators on the antioxidant system in seedlings of two maize cultivars subjected to water stress. *Plant Growth Regulation*, 25(2), 81-87.

Liu, X., & Huang, B. (2000). Carbohydrate accumulation in relation to heat stress tolerance in two creeping bentgrass cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 125(4), 442-447.

Loescher, W. H. (1987). Physiology and metabolism of sugar alcohols in higher plants. *Physiologia Plantarum*, 70(3), 553-557.

Lopez-Martinez, L. X., Oliart-Ros, R. M., Valerio-Alfaro, G., Lee, C. H., Parkin, K. L., & Garcia, H. S. (2009). Antioxidant activity, phenolic compounds and anthocyanins content of eighteen strains of Mexican maize. *LWT-Food Science and Technology*, 42(6), 1187-1192.

Lunn, J.E., Delorge, I., María Figueroa, C., Van Dijck, P., & Stitt, M. (2014). Trehalose metabolism in plants. *The Plant Journal*, 79, 544-567.

Brolis, M. B. N. R. F. F., Gabetta, B., Fuzzati, N., Pace, R., Panzeri, F., & Peterlongo, F. (1998). Identification by high-performance liquid chromatography–diode array detection–mass spectrometry and quantification by high-performance liquid

chromatography–UV absorbance detection of active constituents of *Hypericum perforatum*. *Journal of Chromatography A*, 825(1), 9-16.

Gomes, M. M. A. (2011). Physiological effects related to brassinosteroid application in plants. In *Brassinosteroids: A Class of Plant Hormone* (pp. 193-242). Springer Netherlands.

Ma C., Xiao S., Li Z., Wang W., Du L., Characterization of active phenolic components in the ethanolic extract of *Ananas comosus* L, leaves using highperformance liquid chromatography with diode array detection and tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography, A*, 2007, 1165 (1-2),39–44.

Mandava, N. B. (1991). Brassinosteroids: US Department of Agriculture contributions and Environmental Protection Agency registration requirements. In *ACS Symposium series-American Chemical Society (USA)*.

Mandava, N., Kozempel, M., Worley, J. F., Matthees, D., Warthen Jr, J. D., Jacobson, M., ... & Grove, M. D. (1978). Isolation of brassins by extraction of rape (*Brassica napus* L.) pollen. *Industrial & Engineering Chemistry Product Research and Development*, 17(4), 351-354.

Mangelsdorf, D. J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schütz, G., Umesono, K., ... & Evans, R. M. (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*, 83(6), 835-839.

Mangelsdorf, P. C. (1986). The origin of corn. *Scientific American*, 255(2), 80-86.

Marko, K. (2014). Biohemijska i fiziološka karakterizacija klonova topole (*Populus* spp.) u procesu fitoekstrakcije bakra, nikla i kadmijuma.

Marumo, S., Hattori, H., Abe, H., Nonoyama, Y., & Munakata, K. (1968). The presence of novel plant growth regulators in leaves of *Distylium racemosum* Sieb et Zucc. *Agricultural and Biological Chemistry*, 32(4), 528-529.

- Matsuoka, Y., Vigouroux, Y., Goodman, M. M., Sanchez, J., Buckler, E., & Doebley, J. (2002). A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(9), 6080-6084.
- Matusmoto, T., Yamada, K., Yoshizawa, Y., & Oh, K. (2016). Comparison of Effect of Brassinosteroid and Gibberellin Biosynthesis Inhibitors on Growth of Rice Seedlings. *Rice Science*, 23(1), 51-55.
- Maugh, T. H. (1981). New chemicals promise larger crops. *Science*, 212(4490), 33-34.
- Mayer, A. M., & Poljakoff-Mayber, A. (1982). *The Germination of Seeds: Pergamon International Library of Science, Technology, Engineering and Social Studies*. Elsevier.
- Mazorra, L. M., & Núñez, M. (2000). Brassinosteroid analogues differentially modify peroxidase activity, superoxide dismutase activity and protein content in tomato seedlings. *Cultivos Tropicales*, 21(4), 29-34.)
- McCord, J. M. (2000). The evolution of free radicals and oxidative stress. *The American journal of medicine*, 108(8), 652-659.
- McMinn, W.A.M., & Magee, T.R.A. (2003). Thermodynamic properties of moisture sorption of potato. *Journal of Food Engineering*, 60, 157-165.
- Medford, J. I., Elmer, J. S., & Klee, H. J. (1991). Molecular cloning and characterization of genes expressed in shoot apical meristems. *The Plant Cell*, 3(4), 359-370.
- Menkov, N.D. (2000). Moisture sorption isotherms of vetch seeds at four temperatures. *Journal of Agricultural Engineering Research*, 76, 373-380.
- Middleton, E., Kandaswami, C., & Theoharides, T. C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological reviews*, 52(4), 673-751.
- Mihaljev, T. A., Čupić, T. N., Tivkov-Baloš, M. M., & Jakšić, S. M. (2015). Nivoi makroelemenata i toksičnih elemenata u biljnim čajevima. *Chemical Industry/Hemijska Industrija*, 69(2).

- Milošević M, Vujaković M, and Karagić Đ. 2010. Vigour tests as indicators of seed viability. *Genetika*, **42**(1), 103-118.
- Hurtta, M., Pitkänen, I., & Knuutinen, J. (2004). Melting behaviour of D-sucrose, D-glucose and D-fructose. *Carbohydrate research*, **339**(13), 2267-2273.
- Mitchell, J. W., & Whitehead, M. R. (1941). Responses of vegetative parts of plants following application of extract of pollen from *Zea mays*. *Botanical gazette*, 770-791.
- Mitchell, J. W., & Gregory, L. E. (1972). Enhancement of overall plant growth, a new response to brassins. *Nature*, **239**(95), 253-254.
- Mitchell, J. W., Mandava, N., Worley, J. F., Plimmer, J. R., & Smith, M. V. (1970). Brassins-a new family of plant hormones from rape pollen. *Nature*, **225**(5237), 1065-6.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., & Van Breusegem, F. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in plant science*, **9**(10), 490-498.
- Moiset, G., López, C. A., Bartelds, R., Syga, L., Rijpkema, E., Cukkemane, A., ... & Marrink, S. J. (2014). Disaccharides impact the lateral organization of lipid membranes. *Journal of the American Chemical Society*, **136**(46), 16167-16175.
- Mondo, V. H. V., Cicero, S. M., Dourado-Neto, D., Pupim, T. L., & Dias, M. A. N. (2013). Seed vigor and initial growth of corn crop. *Journal of Seed Science*, **35**(1), 64-69.
- Mondo, V. H. V., Cicero, S. M., Dourado-Neto, D., Pupim, T. L., & Dias, M. A. N. (2012). Maize seed vigor and plant performance. *Revista Brasileira de Sementes*, **34**(1), 143-155.
- Nakajima, N., & Toyama, S. (1999). Effects of Epibrassinolide on Sugar Transport and Allocation to the Epicotyl in Cucumber Seedlings. *Plant production science*, **2**(3), 165-171.
- Nardini, M., & Ghiselli, A. (2004). Determination of free and bound phenolic acids in beer. *Food Chemistry*, **84**(1), 137-143.

- Nes, W. R. (1977). The biochemistry of plant sterols. *Advances in Lipid Research*.
- Ninan, K. N., Krishnan, K., & Krishnamurthy, V. N. (1991). Kinetics and mechanism of thermal decomposition of insitu generated calcium carbonate. *Journal of thermal analysis*, 37(7), 1533-1543.
- Nishikawa, N., Shida, A., & Toyama, S. (1995). Metabolism of ¹⁴C-labeled epibrassinolide in intact seedlings of cucumber and wheat. *Journal of plant research*, 108(1), 65-69.
- Noctor, G., & Foyer, C. H. (1998). Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual review of plant biology*, 49(1), 249-279.
- Ntuli, T. M., Finch-Savage, W. E., Berjak, P., & Pammenter, N. W. (2011). Increased Drying Rate Lowers the Critical Water Content for Survival in Embryonic Axes of English Oak (*Quercus robur* L.) Seeds F. *Journal of integrative plant biology*, 53(4), 270-280.
- Oaks, A. (1994). Efficiency of nitrogen utilization in C3 and C4 cereals. *Plant Physiology*, 106(2), 407.
- Oh, M. H., Romanow, W. G., Smith, R. C., Zamski, E., Sasse, J., & Clouse, S. D. (1998). Soybean BRU1 encodes a functional xyloglucan endotransglycosylase that is highly expressed in inner epicotyl tissues during brassinosteroid-promoted elongation. *Plant and cell physiology*, 39(1), 124-130.
- Ohnishi, T., Szatmari, A. M., Watanabe, B., Fujita, S., Bancos, S., Koncz, C., ... & Szekeres, M. (2006). C-23 hydroxylation by *Arabidopsis* CYP90C1 and CYP90D1 reveals a novel shortcut in brassinosteroid biosynthesis. *The Plant Cell*, 18(11), 3275-3288.
- Ojediran, J., Raji, A. O., & Owamah, H. I. (2013). Isosteric Heats of Water Vapor Sorption in Two Castor Varieties. *Journal of Chemical Engineering & Process Technology*, 2013.

Ozawa, T. (1986). Non-isothermal kinetics and generalized time. *Thermochimica Acta*, 100(1), 109-118.

Özdemir, F., Bor, M., Demiral, T., & Türkan, İ. (2004). Effects of 24-epibrassinolide on seed germination, seedling growth, lipid peroxidation, proline content and antioxidative system of rice (*Oryza sativa* L.) under salinity stress. *Plant Growth Regulation*, 42(3), 203-211.

Sharma, P., Bhardwaj, R., Arora, N., Arora, H. K., & Kumar, A. (2008). Effects of 28-homobrassinolide on nickel uptake, protein content and antioxidative defence system in *Brassica juncea*. *Biologia Plantarum*, 52(4), 767-770.

Pan, D. (2000). Starch synthesis in maize. *Developments in Crop Science*, 26, 125-146.

Pandey, R., Singh, A., Maurya, S., Singh, U. P., & Singh, M. (2013). Phenolic acids in different preparations of Maize (*Zea mays*) and their role in human health. *International Journal of Current Microbiology and Applied Science*, 2(6), 84-92.

Paul, M. J., Primavesi, L. F., Jhurrea, D., & Zhang, Y. (2008). Trehalose metabolism and signaling. *Annual review of plant biology*, 59, 417.

Pedreschi, R., & Cisneros-Zevallos, L. (2007). Phenolic profiles of Andean purple corn (*Zea mays* L.). *Food Chemistry*, 100(3), 956-963.

Piperno, D. R., Ranere, A. J., Holst, I., Iriarte, J., & Dickau, R. (2009). Starch grain and phytolith evidence for early ninth millennium BP maize from the Central Balsas River Valley, Mexico. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(13), 5019-5024.

Pistón, M., Machado, I., Branco, C. S., Cesio, V., Heinzen, H., Ribeiro, D., ... & Freitas, M. (2014). Infusion, decoction and hydroalcoholic extracts of leaves from artichoke (*Cynara cardunculus* L. subsp. *cardunculus*) are effective scavengers of physiologically relevant ROS and RNS. *Food Research International*, 64, 150-156..

Poppenberger, B., Fujioka, S., Soeno, K., George, G. L., Vaistij, F. E., Hiranuma, S., ... & Bowles, D. (2005). The UGT73C5 of *Arabidopsis thaliana* glucosylates

brassinosteroids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(42), 15253-15258.

Pwa, P. W. (1998). Atkins: Physical Chemistry, Sixth and Seventh Edition.

Li, Q. F., & He, J. X. (2013). Mechanisms of signaling crosstalk between brassinosteroids and gibberellins. *Plant signaling & behavior*, 8(7), e24686.

Graham, R. D., & Welch, R. M. (1996). *Breeding for staple food crops with high micronutrient density* (Vol. 3). Intl Food Policy Res Inst.

Gupta, R., & Chakrabarty, S. K. (2013). Gibberellic acid in plant: still a mystery unresolved. *Plant signaling & behavior*, 8(9), e25504.

Radosavljević, M., & Milašinović, M. (2008). ZP hibridi kukuruza kao sirovina za proizvodnju skroba. *Časopis za procesnu tehniku i energetiku u poljoprivredi/PTEP*, 12(4), 191-195.

Rahman, M. S. (2009). „Glass transition data and models of foods “. *Food Properties Handbook*, 247-285.

Rahman, M.S. (2009). Food stability beyond water activity and glass transition: Macro-micro region concept in the state diagram. *International Journal of Food Properties*, 12(4), 726-740.

Ramos-Escudero, F., Muñoz, A. M., Alvarado-Ortíz, C., Alvarado, A., & Yáñez, J. A. (2012). Purple corn (*Zea mays* L.) phenolic compounds profile and its assessment as an agent against oxidative stress in isolated mouse organs. *Journal of medicinal food*, 15(2), 206-215.

Ribaut, J. M. (Ed.). (2006). *Drought adaptation in cereals*. CRC Press.

Richards R A. 2000. Selectable traits to increase crop photosynthesis and yield of grain crops. *Journal of Experimental Botany*, 51(suppl 1), 447-458.

Richter, A., Wanek, W., Werner, R. A., Ghashghaie, J., Jäggi, M., Gessler, A., ... & Bathellier, C. (2009). Preparation of starch and soluble sugars of plant material for the

analysis of carbon isotope composition: a comparison of methods. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 23(16), 2476-2488.

Rizvi, S.S.H. (1995). Thermodynamics of Food and Dehydration. In: *Engineering Properties of Foods*, Rao, M.A., & Rizvi, S.S.H. (Eds.), Marcel Dekker, New York, USA, pp. 223-309.

Rogers, G.F.C., & Mayhew, Y.R. (1981). Thermodynamic and Transport Properties of Fluids. The 3rd Edition, Basil Blackwell, Oxford, UK, pp. 35-42.

Roitsch, T., & González, M. C. (2004). Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. *Trends in plant science*, 9(12), 606-613.

Roitsch, T., Balibrea, M. E., Hofmann, M., Proels, R., & Sinha, A. K. (2003). Extracellular invertase: key metabolic enzyme and PR protein. *Journal of Experimental Botany*, 54(382), 513-524.

Roos, Y., & Karel, M. (1992). Crystallization of amorphous lactose. *Journal of Food Science*, 57, 775-777.

Anuradha, S., & Rao, S. S. R. (2003). Application of brassinosteroids to rice seeds (*Oryza sativa* L.) reduced the impact of salt stress on growth, prevented photosynthetic pigment loss and increased nitrate reductase activity. *Plant Growth Regulation*, 40(1), 29-32.

Hayat, S., Ali, B., Hasan, S. A., & Ahmad, A. (2007). Brassinosteroid enhanced the level of antioxidants under cadmium stress in *Brassica juncea*. *Environmental and Experimental Botany*, 60(1), 33-41.

Sairam, R. K. (1994). Effects of homobrassinolide application on plant metabolism and grain yield under irrigated and moisture-stress conditions of two wheat varieties. *Plant Growth Regulation*, 14(2), 173-181.

Sarma, B.K., and Singh, U.P. 2003. Ferulic acid mayu prevent infection by *Sclerotium rolfsii* in *Cicer arietinum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 19: 123-127.

Schlagenhauer, C. D., & Arteca, R. N. (1985). Brassinosteroid-induced epinasty in tomato plants. *Plant physiology*, 78(2), 300-303.

Sharma, P., & Bhardwaj, R. (2007). Effects of 24-epibrassinolide on growth and metal uptake in *Brassica juncea* L. under copper metal stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 29(3), 259-263.

Sharp, J. H., Brindley, G. W., & Achar, B. N. (1966). Numerical data for some commonly used solid state reaction equations. *Journal of the American Ceramic Society*, 49(7), 379-382.

Shih, M.D., Lin, S.D., Hsieh, J.S., Tsou, C.H., Chow, T.Y., Lin, T.P., & Hsing, Y.I.C. (2004). Gene cloning and characterization of a soybean (*Glycine max* L.) LEA protein, GmPM16. *Plant Molecular Biology*, 56, 689-703.

Simić, M., Dolijanović, Ž., Maletić, R., Filipović, M., Grčić, N., Simić, M., ... & Grkić, N. (2009). The genotype role in maize competitive ability. *Genetika*, 41(1), 59-67.

Simpson, G. M., & Naylor, J. M. (1962). Dormancy studies in seed of *avena fatua*: 3. A relationship between maltase, amylases, and gibberellin. *Canadian Journal of Botany*, 40(12), 1659-1673.

Singh, D. K., Sale, P. W., Pallaghy, C. K., & Singh, V. (2000). Role of proline and leaf expansion rate in the recovery of stressed white clover leaves with increased phosphorus concentration. *New Phytologist*, 146(2), 261-269.

Milosavljević, M. S. (1994). Strukturne instrumentalne metode, Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet, Beograd, 1-37.

Sola-Penna, M., & Meyer-Fernandes, J. R. (1998). Stabilization against thermal inactivation promoted by sugars on enzyme structure and function: why is trehalose more effective than other sugars? *Archives of biochemistry and biophysics*, 360(1), 10-14.

Sootsuwan, K., Thanonkeo, P., Keeratrakha, N., Thanonkeo, S., Jaisil, P., & Yamada, M. (2013). Sorbitol required for cell growth and ethanol production by *Zymomonas mobilis* under heat, ethanol, and osmotic stresses. *Biotechnology for biofuels*, 6(1), 1.

- Štajner, D., Popović, B. M., Čalić-Dragosavac, D., Malenčić, Đ., & Zdravković-Korać, S. (2011). Comparative study on *Allium schoenoprasum* cultivated plant and *Allium schoenoprasum* tissue culture organs antioxidant status. *Phytotherapy Research*, 25(11), 1618-1622.
- Steber, C. M., & McCourt, P. (2001). A role for brassinosteroids in germination in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 125(2), 763-769
- Street, T. O., Bolen, D. W., & Rose, G. D. (2006). A molecular mechanism for osmolyte-induced protein stability. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(38), 13997-14002.
- Sun, W. Q. (2002). Methods for the study of water relations under desiccation stress. *Desiccation and survival in plants: Drying without dying*, 47-91.
- Sun, W. Q., & Davidson, P. (1998). Protein inactivation in amorphous sucrose and trehalose matrices: effects of phase separation and crystallization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1425(1), 235-244.
- Sun, W. Q., & Leopold, A. C. (1994). Glassy state and seed storage stability: a viability equation analysis. *Annals of Botany*, 74(6), 601-604.
- Sun, W. Q., & Leopold, A. C. (1997). Cytoplasmic vitrification and survival of anhydrobiotic organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 117(3), 327-333.
- Suzuki, H., Fujioka, S., Takatsuto, S., Yokota, T., Murofushi, N., & Sakurai, A. (1995). Biosynthesis of brassinosteroids in seedlings of *Catharanthus roseus*, *Nicotiana tabacum*, and *Oryza sativa*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 59(2), 168-172.
- Suzuki, H., Inoue, T., Fujioka, S., Takatsuto, S., Yanagisawa, T., Yokota, T., Murofushi, N. & Sakurai, A. (1994). Possible involvement of 3-dehydroteasterone in the conversion of teasterone to typhasterol in cultured cells of *Catharanthus roseus*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 58(6), 1186-1188.

Suzuki, M., Xiang, T., Ohyama, K., Seki, H., Saito, K., Muranaka, T., ... & Ebizuka, Y. (2006). Lanosterol synthase in dicotyledonous plants. *Plant and Cell Physiology*, 47(5), 565-571.

Swamy, K. N., & Rao, S. S. R. (2009). Effect of 24-epibrassinolide on growth, photosynthesis, and essential oil content of *Pelargonium graveolens* (L.) Herit. *Russian Journal of Plant Physiology*, 56(5), 616-620.

Sze, H., Li, X., & Palmgren, M. G. (1999). Energization of plant cell membranes by H⁺-pumping ATPases: regulation and biosynthesis. *The Plant Cell*, 11(4), 677-689.

Tabaković, M. J. (2012). Uticaj vremenskih uslova, zemljišta i genotipske kombinacije na osobine hibridnog semena kukuruza.

Takatsuto, S. (1994). Brassinosteroids: Distribution in plants, bioassays and microanalysts by gas chromatography—mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 658(1), 3-15.

Tanaka, K., Nakamura, Y., Asami, T., Yoshida, S., Matsuo, T., & Okamoto, S. (2003). Physiological roles of brassinosteroids in early growth of *Arabidopsis*: brassinosteroids have a synergistic relationship with gibberellin as well as auxin in light-grown hypocotyl elongation. *Journal of Plant Growth Regulation*, 22(3), 259-271.

Thomas, B. R., & Rodriguez, R. L. (1994). Metabolite signals regulate gene expression and source/sink relations in cereal seedlings. *Plant Physiology*, 106(4), 1235.

Thummel, C. S., & Chory, J. (2002). Steroid signaling in plants and insects—common themes, different pathways. *Genes & development*, 16(24), 3113-3129.

TOMINAGA, R., & SAKURAI, N. (1996). Brassinolide induces vacuolar H⁺-ATPase activation and stem elongation. *Plant and cell physiology*, 37, 152.

Trudić, B., Kebert, M., Popović, B. M., Štajner, D., Orlović, S., Galović, V., & Pilipović, A. (2013). Utjecaj onečišćenosti tla teškim metalima na klonove topola iz Srbije. *Šumarski list*, 137(5-6), 287-295.

Tunnacliffe, A., Hinch, D.K., Leprince, O., & Macherel, D. (2010). LEA Proteins: Versatility of Form and Function, In: *Topics in Current Genetics – Dormancy and Resistance in Harsh Environments*, Ch. 6, Lubzens, E., Cerdà, J., & Clark, M.S. (Eds.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany, pp. 91-109.

Semenčenko, V. V., Mojović, L. V., Radosavljević, M. M., Terzić, D. R., Milašinović-Šeremešić, M. S., & Janković, M. Z. (2013). Mogućnosti iskorišćenja sporednih proizvoda prerade kukuruznog zrna iz proizvodnje etanola i skroba. *Hemijska industrija, Online first (00)*, 90-90.

Vardhini, B. V., & Rao, S. S. R. (2003). Amelioration of osmotic stress by brassinosteroids on seed germination and seedling growth of three varieties of sorghum. *Plant Growth Regulation*, 41(1), 25-31.

Vasyukova, N. I., Chalenko, G. I., Kaneva, I. M., Khripach, V. A., & Ozeretskovskaya, O. L. (1994). Brassinosteroids and potato late blight. *Prikladnaia Biokhimiia i Mikrobiologii*, 30(3), 464-470.

Vertucci, C.W., & Leopold, A.C. (1984). Bound water in soybean seed and its relation to respiration and imbibitional damage. *Plant Physiology*, 75, 114-117.

Vyazovkin, S., & Sbirrazzuoli, N. (2006). Isoconversional kinetic analysis of thermally stimulated processes in polymers. *Macromolecular Rapid Communications*, 27(18), 1515-1532.

Vyazovkin, S., & Wight, C. A. (1997). Kinetics in solids. *Annual review of physical chemistry*, 48(1), 125-149.

Wada, K., Marumo, S., Abe, H., Morishita, T., Nakamura, K., Uchiyama, M., & Mori, M. (1984). A rice lamina inclination test—a micro-quantitative bioassay for brassinosteroids. *Agricultural and biological chemistry*, 48(3), 719-726.

Waisi, H., Kosović, A., Krstić, Đ., Milojković-Opsenica, D., Nikolić, B., Dragičević, V., & Trifković, J. (2015). Polyphenolic Profile of Maize Seedlings Treated with 24-Epibrassinolide. *Journal of Chemistry*, 2015.

- Wanek, W., Heintel, S., & Richter, A. (2001). Preparation of starch and other carbon fractions from higher plant leaves for stable carbon isotope analysis. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 15(14), 1136-1140.
- Wang, M., Zheng, Q., Shen, Q., & Guo, S. (2013). The critical role of potassium in plant stress response. *International journal of molecular sciences*, 14(4), 7370-7390.
- Wilén, R. W., Sacco, M., Gusta, L. V., & Krishna, P. (1995). Effects of 24-epibrassinolide on freezing and thermotolerance of bromegrass (*Bromus inermis*) cell cultures. *Physiologia Plantarum*, 95(2), 195-202.
- Wu, C.Y., Trieu, A., Radhakrishnan, P., Kwok, S.F., Harris, S., Zhang, K., Wang, J., Wan, J., Zhai, H., Takatsuto, S., Matsumoto, S., Fujioka, S., Feldmann, K.A., & Pennell, R.I. 2008. Brassinosteroids regulate grain filling in rice. *The Plant Cell*, 20: 2130–2145.
- Rouau, X., Cheynier, V., Surget, A., Gloux, D., Barron, C., Meudec, E., ... & Criton, M. (2003). A dehydrotrimer of ferulic acid from maize bran. *Phytochemistry*, 63(8), 899-903.
- Xu, F., Luan, L. Y., Zhang, Z. W., Huo, S. S., Gao, X., Fang, Y. L., & Xi, Z. M. (2014). Phenolic profiles and antioxidant properties of young wines made from Yan73 (*Vitis vinifera* L.) and cabernet sauvignon (*Vitis vinifera* L.) grapes treated by 24-Epibrassinolide. *Molecules*, 19(7), 10189-10207.
- Xu, W., Purugganan, M. M., Polisensky, D. H., Antosiewicz, D. M., Fry, S. C., & Braam, J. (1995). *Arabidopsis* TCH4, regulated by hormones and the environment, encodes a xyloglucan endotransglycosylase. *The Plant Cell*, 7(10), 1555-1567.
- Yamaguchi, N., Suzuki, S., & Makino, A. (2013). Starch degradation by alpha-amylase in tobacco leaves during the curing process. *Soil science and plant nutrition*, 59(6), 904-911.
- Yamamuro C., Ihara Y., Wu X., Noguchi T., Fujioka S., Takatsuto S., Ashikari M., Kitano H., & Matsuoka M. (2000). Loss of function of a rice brassinosteroid

insensitive1 homolog prevents internode elongation and bending of the lamina joint. *The Plant Cell*, 12(9): 1591-606;

Yang, W.H., & Cenkowski, S. (1993). Latent heat of vaporization for canola as affected by cultivars and multiple drying – Rewetting cycles. *Canadian Agricultural Engineering*, 35, 195-198.

Yin, Y., Wang, Z. Y., Mora-Garcia, S., Li, J., Yoshida, S., Asami, T., & Chory, J. (2002). BES1 accumulates in the nucleus in response to brassinosteroids to regulate gene expression and promote stem elongation. *Cell*, 109(2), 181-191.

Yokota, T., Higuchi, K., Takahashi, N., Kamuro, Y., Watanabe, T., & Takatsuto, S. (1998). Identification of brassinosteroids with epimerized substituents and/or the 23-oxo group in pollen and anthers of Japanese cedar. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 62(3), 526-531.

Yokota, T. (1997). The structure, biosynthesis and function of brassinosteroids. *Trends in Plant Science*, 2(4), 137-143.

Yokota, T. & Takahashi, N., in *Plant Growth Substances* (ed. Bopp, M.), Springer-Verlag, Berlin, 1986, pp. 129–138.

Zhang, S., Wei, Y., Lu, Y., & Wang, X. (2009). Mechanisms of brassinosteroids interacting with multiple hormones. *Plant signaling & behavior*, 4(12), 1117-1120.

Zullo, M. A. T., & Adam, G. (2002). Brassinosteroid phytohormones: structure, bioactivity and applications. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 14(3), 143-181.

Zurek, D. M., & Clouse, S. D. (1994). Molecular cloning and characterization of a brassinosteroid-regulated gene from elongating soybean (*Glycine max* L.) epicotyls. *Plant Physiology*, 104(1), 161-170.

Zurek, D. M., Rayle, D. L., Mc Morris, T. C., & Clouse, S. D. (1994). Investigation of gene expression, growth kinetics, and wall extensibility during brassinosteroid-regulated stem elongation. *Plant Physiology*, 104(2), 505-513.

Вороннина Л.П. (2007) Определение специфической активности 24-эпибрассинолида в биотестах. в: Полифункциональность действия brassinостероидов. Сборник научных трудов. ISBN 978-5-9901146-1-6 (Малеванная Н.Н., ур.), изд. „НЭСТ М“, Москва, Россия, стр. 115- 128.

OPŠTI I PODACI O AUTORSKIM PRAVIMA

BIOGRAFIJA

Hadi K. Waisi je рођен 01.08.1984. године у Загребу, Република Хрватска. Биолошки факултет, смер Екологија и заштита животне средине, Универзитета у Београду је завршио 2011. године са просечном оценом 8.03 (осам, 3/100). Дипломски рад је урадио у Институту за заштиту биља и животну средину, код ментора др Жарка Ивановића под називом: „Идентификација бактерије *Agrobacterium tumefaciens* проузроковача тумора на виновој лози“ и одбранио исти са оценом 10 (десет). Докторске студије је уписао школске 2011/12. године, на Биолошком факултету Универзитета у Београду, под менторством др Богдана Николића и др Тијане Цветић Антић. Од 2012. до 2013. године је радио у Институту за заштиту биља и животну средину, Одсек за фитофармацију и заштиту животне средине и учесник је пројекта МПНТР Р. Србије: „Разрада интегрисаног управљања и примене савремених принципа сузбијања штетних организама у заштити биља“ ТР 31018. Од 2013. године је запослен у Институту за Водопривреду „Јарослав Черни“ у заводу за научноистраживачки рад и информатику као Истраживач сарадник, као учесник пројекта МПНТР Р. Србије: „Биодиверзитет као потенцијал у екоремедијационим технологијама оштећених екосистема“ ТР 31080.

Као запослен у институту за Водопривреду „Јарослав Черни“, као Еколог заштите животне средине, учествовао је у неколико значајних студија о процени утицаја на животну средину, као и стратешки важним плановима заштите вода Србије од загађења. До сада је публикувао радове и саопштења различитих категорија: три М23, два М24, шест М33, шест М34, два М51, два М52 и четири М64, од којих је већина везана за област физиологије биљака.

Изјава о ауторству

Потписани Hadi K.Waisi

број уписа Б3021/2011

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом Утицај брасиностероида 24-епибрасинолида на клијање и ране фазе растења и развића различитих хибрида кукуруза (*Zea mays* L.)

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 14.07.2016.



Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Hadi K.Waisi

Број уписа Б3021/2011

Студијски програм Биологија/ Физиологија и молекуларна биологија биљака

Наслов рада Утицај брасиностероида 24-епибрасинолида на клијање и ране фазе растења и развића различитих хибрида кукуруза (*Zea mays* L.)

Ментори др Богдан Николић и др Тијана Цветић

Потписани Hadi K.Waisi

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 14.07.2016.



Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Утицај брасиностероида 24-епибрасинолида на клијање и ране фазе растења и развића различитих хибрида кукуруза (*Zea mays* L.)

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио.

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 14.07.2016.



1. Ауторство - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.