

UNIVERZITET U BEOGRADU

HEMIJSKI FAKULTET

Jelena Z. Vukadinović

**UTICAJ HERBICIDA NIKOSULFURONA I
MEZOTRIONA I FOLIJARNOG ĐUBRIVA
NA SADRŽAJ FITOHEMIKALIJA U LISTU I
ZRNU KUKURUZA ŠEĆERCA**

doktorska disertacija

Beograd, 2021.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF CHEMISTRY

Jelena Z. Vukadinović

**EFFECT OF NICOSULFURON AND
MESOTRIONE HERBICIDES AND FOLIAR
FERTILIZER ON THE PHYTOCHEMICALS
CONTENT IN THE SWEET MAIZE LEAF
AND GRAIN**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2021.

Mentori:

dr Dušanka Milojković-Opsenica, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet

dr Snežana Mladenović Drinić, naučni savetnik
Institut za kukuruz „Zemun Polje“

Članovi komisije:

dr Jelena Trifković, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet

dr Vesna Dragičević, naučni savetnik
Institut za kukuruz „Zemun Polje“

Datum odbrane:

U Beogradu, _____2021.

Zahvalnica

Hvala Institutu za kukuruz „Zemun Polje“ što je omogućio izradu ove doktorske disertacije, kao i Katedri za Analitičku hemiju, Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Prvenstveno se zahvaljujem mentoru, dr Dušanki Milojković-Opsenici, redovnom profesoru Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu na svestranoj podršci, razumevanju i pomoći tokom izrade i pisanja ove doktorske disertacije. Zahvalnost dugujem i dr Snežani Mladenović Drinić, naučnom savetniku Instituta za kukuruz „Zemun Polje“ na korisnim sugestijama i podršci koji su bili od neizmernog značaja u toku izrade doktorske disertacije.

Posebnu zahvalnost dugujem dr Vesni Dragičević, naučnom savetniku Instituta za kukuruz „Zemun Polje“ na nesebičnoj pomoći tokom realizacije eksperimentalnog dela, kao i pisanja ove doktorske disertacije, beskrajnomo razumevanju, kao i korisnim sugestijama koje su doprinele kvalitetu ove doktorske disertacije. Takođe, zahvaljujem se dr Jeleni Trifković, vanredovnom profesoru Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu na korisnim sugestijama i smernicama pri završnoj izradi doktorske disertacije.

Veliku zahvalnost dugujem dr Mileni Simić, naučnom savetniku Instituta za kukuruz „Zemun Polje“ koja učestvovala u osmišljavanju ogleada i nesebično mi je prenela svoje znanje i uvela me, u za mene nepoznatu, oblast primene agrotehničkih mera u kukuruzu. Zahvaljujem se dr Jeleni Srdić, naučnom savetniku Instituta za kukuruz „Zemun Polje“ koja je sa mnom podelila svoje znanje o kukuruzu specifičnih svojstava, učestvovala u realizaciji ogleada, kao i na pomoći oko statističke obrade rezultata. Zahvaljujem se dr Milanu Brankov, naučnom saradniku Instituta za kukuruz „Zemun Polje“ na pomoći u toku izrade eksperimentalnog dela disertacije kao i tumačenju rezultata proisteklih u ovoj doktorskoj disertaciji.

Hvala svim kolegama koji su na bilo koji način pomogli u izradi ove doktorske disertacije, a posebno se zahvaljujem Biljani Noro, Branki Radovanović, Miroslavu Maksimoviću i Milanu Kostiću, kao i kolegamicama iz grupe za Selekciju hibrida kukuruza specifičnih svojstava Instituta za kukuruz „Zemun Polje“.

Na kraju, ali ne i najmanje važno, beskrajnomo zahvalnost dugujem majci Zorici i suprugu Milošu na bezuslovnoj podršci, razumevanju i ljubavi.

Uticaj herbicida nikosulfurona i mezotriona i folijarnog đubriva na sadržaj fitohemikalija u listu i zrnu kukuruza šećerca

Predmet ove disertacije bio je proučavanje uticaja herbicida sa ili bez primene folijarnog đubriva na sadržaj fitohemikalija u listu i zrnu četiri hibrida kukuruza šećerca (ZP504_{su}, ZP355_{su}, ZP553_{su} i ZP515_{su}) tokom dve godine, u cilju definisanja njihove tolerantnosti i karakterističnog odgovora. Sadržaj fitohemikalija određen je primenom visoko-efikasne tečne hromatografije sa ultravioletnim detektorom sa više dioda i fluorescentnim detektorom i visoko-efikasne jonske hromatografije sa pulsno-amperometrijskim detektorom. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja, glutationa i antioksidativna aktivnost određeni su primenom UV/VIS spektrofotometrije. Hromatografska razdvajanja su postignuta pri nižim protocima mobilnih faza uz smanjen utrošak organskih rastvarača podržavajući na taj način trendove zelene analitičke hemije. Dobra linearnost, tačnost, niska granica detekcije, direktno HPLC određivanje ekstrakata bez derivatizacije, skraćeno vreme ekstrakcije i trajanja analize omogućili su rutinsko korišćenje primenjenih hromatografskih metoda. Rezultati su pokazali da je uticaj tretmana bio izraženiji u zrnu, dok u listu uglavnom nije bio statistički značajan. Primena oba herbicida dovela je do statistički značajnog povećanja ukupnog sadržaja svih fitohemikalija u ZP553_{su} na osnovu čega se on može definisati kao tolerantan genotip. Primenjeni tretmani izazvali su aktiviranje neenzimskih antioksidanasa kod ZP355_{su}, a kod ZP515_{su} aktiviranje metabolizma ugljenih hidrata. Rezultati su pokazali da se sadržaj karotenoida, vitamina E, fenolnih kiselina i šećera može koristiti kao jedinstven pokazatelj genotipa nakon primenjenih tretmana. Pokazano je da kontrolisana upotreba herbicida može dovesti do poboljšanja fitohemijskog profila i povećanja nutritivnog statusa kukuruza šećerca.

Ključne reči: *Zea mays* L. Saccharata; nutritivni kvalitet; herbicidi; folijarna prihrana; fitohemijski profil; profil šećera; HPLC-DAD; HPLC-FLD; HPAEC-PAD

Naučna oblast: Hemija

Uža naučna oblast: Analitička hemija

Effect of nicosulfuron and mesotrione herbicides and foliar fertilizer on the phytochemicals content in the leaf and grain of the sweet maize

The subject of this doctoral dissertation was the impact of herbicides with or without foliar fertilizer on phytochemicals content in leaf and grain in four hybrids of sweet maize (ZP504*su*, ZP355*su*, ZP553*su*, and ZP515*su*) during two years in order to define their tolerance and characteristic response. The content of phytochemicals was determined using high-performance liquid chromatography with an ultraviolet multi-diode detector and a fluorescent detector, and high-performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection. The content of total phenolic compounds, glutathione and antioxidant activity was determined using UV / VIS spectrophotometry. Chromatographic separations were achieved at lower mobile phase flows with reduced consumption of organic solvents, thus supporting the trends of green analytical chemistry. Good linearity, accuracy, low limit of detection, direct HPLC determination of extracts without derivatization, shortened extraction time, and duration of analysis enabled the routine use of applied chromatographic methods. The results showed that the impact of the treatment was more conspicuous in the grain, while in the leaf it was generally not statistically significant. The application of both herbicides led to a statistically significant increase in the total content of all phytochemicals in ZP553*su*, based on which it can be defined as a tolerant genotype. The applied treatments caused the activation of non-enzymatic antioxidants in ZP355*su*, and in ZP515*su* the activation of carbohydrate metabolism. The results of this study indicated that the content of carotenoids, vitamin E, phenolic acids and sugars can be used as a characteristic phytochemical parameter of the genotype after the applied treatments. It has been shown that the controlled use of herbicides can lead to an improvement in the phytochemical profile and an increase in the nutritional status of sweet maize.

Keywords: *Zea mays* L. Saccharata; nutritional quality; herbicides; foliar fertilizer; phytochemical profile; sugar profile; HPLC-DAD; HPLC-FLD; HPAEC-PAD

Scientific area: Chemistry

Field of Academic Expertise: Analytical Chemistry

Sadržaj

1. Uvod	1
2. Opšti deo	3
2.1. Kukuruz šećerac	3
2.2. Herbicidi i njihov metabolizam.....	4
2.2.1. Mehanizam delovanja mezo-triona i nikosulfurona	5
2.3. Folijarna prihrana	6
2.4. Fitohemikalije.....	6
2.4.1. Karotenoidi	7
2.4.1.1. Metode za određivanje karotenoida	7
2.4.2. Vitamin E.....	8
2.4.2.1. Metode za određivanje vitamina E	10
2.4.3. Fenolne kiseline	10
2.4.3.1. Hromatografske metode za određivanje fenolnih kiselina.....	11
2.4.3.2. Spektrofotometrijske metode.....	12
2.5. Šećeri.....	13
2.5.1. Metode za određivanje šećera	13
3. Eksperimentalni deo	15
3.1. Hemikalije, standardi i reagensi	15
3.2. Ogled u polju i biljni materijal	15
3.3. Meteorološki uslovi	16
3.4. Priprema biljnog materijala za analizu	17
3.5. Sadržaj vlage u uzorcima	18
3.6. Metode za ekstrakciju fito-hemikalija za hromatografske analize	18
3.6.1. Ekstrakcija karotenoida iz svežeg lista i zrna	18
3.6.2. Ekstrakcija vitamina E iz svežeg zrna	18

3.6.3. Ekstrakcija slobodnih fenolnih kiselina iz svežeg lista i zrna	18
3.6.4. Ekstrakcija šećera iz svežeg zrna	18
3.7. Spektrofotometrijske analize lista i zrna	20
3.7.1. Određivanje sadržaja ukupnih polifenola	20
3.7.2. Određivanje ukupne antioksidativne aktivnosti	20
3.7.3. Određivanje sadržaja ukupnog glutaciona	21
3.8. Analiza fitohemikalija primenom tečne hromatografije	21
3.8.1. Kvantifikacija karotenoida	21
3.8.2. Kvantifikacija tokoferola i tokotrienola	22
3.8.3. Kvantifikacija fenolnih kiselina	23
3.8.4. Parametri validacije primenjenih HPLC metoda	23
3.9. Kvantifikacija šećera u zrnu primenom jonske hromatografije	26
3.10. Statistička obrada podataka	27
4. Rezultati	28
4.1. Fitohemikalije u listu kukuruza	28
4.1.1. Sadržaj karotenoida	28
4.1.1.1. Sadržaj karotenoida nakon primene herbicida	28
4.1.1.2. Sadržaj karotenoida nakon primene folijarnog đubriva i herbicida	28
4.1.2. Sadržaj slobodnih fenolnih kiselina	31
4.1.2.1. Sadržaj slobodnih fenolnih kiselina nakon primene herbicida	34
4.1.2.2. Sadržaj fenolnih kiselina nakon primene herbicida i folijarnog đubriva	34
4.1.3. Sadržaj ukupnih fenola, glutaciona i antioksidativna aktivnost lista	35
4.1.3.1. Sadržaj ukupnih fenola, glutaciona i antioksidativna aktivnost lista nakon primene herbicida	35
4.1.3.2. Sadržaj ukupnih fenola, glutaciona i antioksidativna aktivnost lista nakon primene herbicida i folijarnog đubriva	35
4.2. Sadržaj fitohemikalija u zrnu	38
4.2.1. Sadržaj karotenoida	38

4.2.1.1. Sadržaj karotenoida nakon primene herbicida	38
4.2.1.2. Sadržaj karotenoida nakon primene herbicida i folijarnog đubriva.....	38
4.2.2. Sadržaj tokoferola i tokotrienola	41
4.2.2.1. Sadržaj tokoferola i tokotrienola nakon primene herbicida	44
4.2.2.2. Sadržaj tokoferola i tokotrienola nakon primene herbicida i folijarnog đubriva	44
4.2.3. Sadržaj slobodnih fenolnih kiselina	44
4.2.3.1. Sadržaj slobodnih fenolnih kiselina nakon primene herbicida	45
4.2.3.2. Sadržaj slobodnih fenolnih kiselina nakon primene herbicida i folijarnog đubriva ..	46
4.2.4. Sadržaj šećera.....	49
4.2.4.1. Sadržaj šećera nakon primene herbicida	54
4.2.4.2. Sadržaj šećera nakon primene herbicida i folijarnog đubriva	54
4.2.5. Sadržaj ukupnih fenola, glutaciona i antioksidativna aktivnost zrna.....	55
4.2.5.1. Sadržaj ukupnih fenola, glutaciona i antioksidativna aktivnost zrna nakon primene herbicida	55
4.2.5.2. Sadržaj ukupnih fenola, glutaciona i antioksidativna aktivnost zrna nakon primene herbicida i folijarnog đubriva.....	55
4.3. Prinos svežeg zrna kukuruza šećerca	57
4.3.1. Zavisnost prinosa i sadržaja fitohemikalija u listu.....	57
4.3.2. Zavisnost prinosa i sadržaja fitohemikalija u zrnu.....	59
4.4. Multivarijantna analiza	59
5. Diskusija	61
5.1. Performanse primenjenih postupaka ekstrakcija i HPLC metoda	61
5.1.1. Ekstrakcija i hromatografija karotenoida	61
5.1.2. Ekstrakcija i hromatografija tokotrienola i tokoferola	61
5.1.3. Ekstrakcija i hromatografija slobodnih fenolnih kiselina.....	62
5.2. Uticaj primenjenog tretmana na sadržaj fitohemikalija u listu	62
5.2.1. Uticaj herbicida na sadržaj karotenoida	62
5.2.2. Uticaj folijarnog đubriva i herbicida na sadržaj karotenoida.....	63

5.2.3. Uticaj herbicida na sadržaj slobodnih fenolnih kiselina.....	63
5.2.4. Uticaj folijarnog đubriva i herbicida na sadržaj slobodnih fenolnih kiselina	64
5.2.5. Uticaj herbicida na sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja, ukupnog glutaciona i antioksidativne aktivnosti.....	64
5.2.6. Uticaj folijarnog đubriva i herbicida na sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja, ukupnog glutaciona i antioksidativne aktivnosti	64
5.3. Uticaj primenjenih tretmana na sadržaj fitohemikalija u zrnu	65
5.3.1. Uticaj herbicida na sadržaj karotenoida	65
5.3.2. Uticaj folijarnog đubriva i herbicida na sadržaj karotenoida.....	65
5.3.3. Uticaj herbicida na sadržaj tokoferola i tokotrienola	66
5.3.4. Uticaj folijarnog đubriva i herbicida na sadržaj tokoferola i tokotrienola	67
5.3.5. Uticaj herbicida na sadržaj slobodnih fenolnih kiselina.....	67
5.3.6. Uticaj folijarnog đubriva i herbicida na sadržaj slobodnih fenolnih kiselina	68
5.3.7. Uticaj herbicida na sadržaj šećera	68
5.3.8. Uticaj folijarnog đubriva i herbicida na sadržaj šećera	70
5.3.9. Uticaj herbicida na sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja, ukupnog glutaciona i antioksidativne aktivnosti.....	70
5.3.10. Uticaj folijarnog đubriva i herbicida na sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja, ukupnog glutaciona i antioksidativne aktivnosti	70
5.3.11. Analiza glavnih komponentata i klasterka analiza	71
5.4. Prinos i povezanost sa sadržajem ispitivanih fitohemikalija.....	72
6. Zaključak.....	74
7. Literatura	77
8. Prilog.....	85

1. Uvod

U ljudskoj ishrani kukuruz šećerac se u svežem stanju pretežno konzumira kao povrće i bogat je izvor različitih fitohemikalija. Prema statističkim podacima, u proteklih deset godina svetska proizvodnja smrznutog i konzerviranog kukuruza šećerca povećana je približno za 49%, odnosno 33%, respektivno (FAOSTAT, 2016). Ovakav podatak ukazuje na povećanu potražnju i potrošnju kukuruza šećerca u svetu i istovremeno na potrebu za njegovom intenzivnijom proizvodnjom.

Primena herbicida je agrotehnička mera neophodna u poljorivredi u cilju suzbijanju korova. Poznato je da bez primene herbicida prinos useva može biti smanjen i do 50% kao i da nestručna primena herbicida može izazvati više štete nego koristi. Ovo je od izuzetne važnosti naročito kod šećerca kao kukuruza specifičnih svojstava, jer je osetljiviji na stres, uključujući delovanje herbicida, u odnosu na standardne hibride kukuruza. Takođe, još jedna agrotehnička mera koja ima za cilj povećanje kvaliteta i prinosa useva jeste folijarna prihrana koja se koristi kao dopuna osnovnom đubrenju. Pod osnovnim đubrenjem podrazumeva se unosenje mineralnih supstanci u zemljište kojima se omogućava pravilna ishrana useva i održava plodnost zemljišta. Međutim, vrlo često se može javiti njihovo smanjeno usvajanje od strane biljke usled gubitaka ispiranjem, karakteristika samog zemljišta (struktura, pH vrednost, hemijski sastav i dr.) kao i zbog prisustva određenih mikroorganizama u zemljištu. Folijarna prihrana omogućava brzo i lako usvajanje hranljivih elemenata preko lista, a ne preko korenovog sistema, pri čemu se zaobilaze navedeni nedostaci osnovnog đubrenja. Folijarna đubriva mogu da sadrže makro- i mikro-elemente, amino-kiseline, biljne hormone i biostimulatore rasta. Na osnovu navedenog, pretpostavlja se, a postoje i literaturni podaci, da folijarna prihrana može umanjiti i stres koji nastaje usled primene herbicida (Brankov i saradnici, 2017).

Hrana koja sadrži supstance koje blagotvorno deluju na zdravlje čoveka naziva se funkcionalna hrana. U brojnim dosadašnjim studijama pokazana je pozitivna korelacija između konzumiranja funkcionalne hrane i smanjenja rizika od pojave različitih bolesti (Dauchet i saradnici 2006; Rodriguez-Casado, 2016). Zbog toga je u današnje vreme popularizacija, kao i potraga za funkcionalnom hranom, postala svetski trend. Karotenoidi, tokoferoli i fenolna jedinjenja koja ispoljavaju antioksidativna svojstva zastupljeni su u voću i povrću i sve više im se posvećuje ogromna pažnja. Isto tako, novija istraživanja pokazuju da i šećeri mogu ispoljiti antioksidativnu aktivnost i da su funkcionalni oligosaharidi neophodni čoveku, jer se smatraju dijetetskim vlaknima i prebioticima. S obzirom da je u savremenoj poljoprivrednoj praksi primena herbicida postala neizbežan korak, potrebno je ispitati njihov uticaj na kvalitet useva a posebno onih koji se koriste direktno u ljudskoj ishrani kao što je kukuruz šećerac. Selektivnost herbicida ne zavisi samo od vrste herbicida i primenjene koncentracije, već i od stanja samog useva, kao i njegovog genotipa. Vrlo često različiti genotipovi iste vrste useva pokazuju različitu osetljivost prema dejstvu istog herbicida (Brankov, 2016). Pri proizvodnji šećerca jedan od najvažnijih parametara je prinos, međutim potrebno je veću pažnju posvetiti i nutritivnom kvalitetu šećerca u cilju njegovog promovisanja kao funkcionalne hrane. Povećanje nutritivnog kvaliteta nakon primene herbicida u zrnu kukuruza šećerca prikazano je do sada samo u dve studije (Cutulle i saradnici, 2018; Kopsell i saradnici, 2009), ukazujući na veliku potrebu da se ispita uticaj herbicida, sa ili bez primene folijarnog đubriva, s obzirom na to da je u poljoprivrednoj praksi postalo uobičajeno da se oni primenjuju zajedno.

U disertaciji su ispitivani herbicidi nikosulfuron i mezotrion, koji su se u praksi pokazali kao najbezbedniji za primenu u usevu šećerca kao kukuruza specifičnih svojstava koji je osetljiviji na delovanje herbicida od standardnih hibrida kukuruza. Izabrani herbicidi pripadaju različitim grupama jedinjenja (sulfoniluree i triketoni) i imaju različite mehanizme delovanja (inhibicija aktivnosti enzima acetolaktat-sintetaze i inhibicija aktivnosti enzima 4-hidroksifenil-piruvat-dioksigenaze). Shodno tome, od interesa je da se ispita u kojoj meri ove dve aktivne supstance utiču na nutritivni kvalitet kukuruza šećerca. U cilju što potpunije karakterizacije kukuruza šećerca, u ovoj disertaciji je optimizacija analitičkih metoda za identifikaciju i kvantifikaciju karotenoida, fenolnih kiselina, tokoferola i tokotrienola postignuta primenom visoko-efikasne tečne hromatografije (High-Performance Liquid Chromatography - HPLC) povezane sa ultravioletnim detektorom sa više dioda (Diode Array Detector - DAD) ili sa fluorescentnim detektorom (Fluorescence Detector - FLD). Identifikacija i kvantifikacija šećera vršena je pomoću visoko-efikasne jonske hromatografije sa elektrohemijskim detektorom (High Performance Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection - HPAEC-PAD). Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja, ukupnog glutationa kao i ukupna antioksidativna aktivnost određena je primenom UV/VIS spektrofotometrije. Analiza glavnih komponenata (Principal Component Analysis - PCA) je primenjena u cilju pronalaženja i definisanja karakterističnog odgovora genotipa u pogledu sadržaja fitohemikalija nakon primenjenih tretmana.

S obzirom na to da do sada u literaturi ne postoje podaci o ispitivanju uticaja herbicida na sadržaj fitohemikalija, naročito u kombinaciji sa ili bez primene folijarnog đubriva, naučni cilj ove disertacije bio je da se ispituju promene u sadržaju fitohemikalija u zrnu nakon primene herbicida, sa ili bez folijarnog đubriva, u cilju pronalaženja karakterističnog odgovora genotipa, a u odnosu na promene nutritivnog kvaliteta, kao i eventualno izdvajanje genotipa tolerantnog na potencijalni stres izazvan herbicidima na osnovu korelacije prinosa, sadržaja fitohemikalija i primenjenih tretmana.

2. Opšti deo

2.1. Kukuruz šećerac

Kukuruz šećerac (*Zea mays* L. *saccharata*) je mutant standardnog tipa kukuruza i pripada tipu kukuruza specifičnih svojstava. U poređenju sa zrnom standardnog kvaliteta u zrnju šećerca se, usled mutacije koja postoji, akumuliraju u vodi rastvorljivi polisaharidi (Water Soluble Polysaccharide - WSP), i to se odigrava u mlečnoj fazi razvoja endosperma, dajući karakterističnu slatkoću i kremastu teksturu zrna kukuruza šećerca (Srđić, 2009). Kukuruz šećerac se širom sveta koristi za ishranu ljudi u mlečnoj (tehnološkoj) fazi zrelosti kada je zrno nežno, slatko i sočno i stoga se smatra povrćem.

Na osnovu koncentracije akumuliranog šećera u endospermu, kukuruz šećerac se može podeliti u tri genetičke grupe: standardni ili normalni sa *su* genom, superslatki ili *shrunkened* (*sh2*) i *sugary enhanced* (*se*) (Alan i saradnici, 2014). Kod standardnog tipa šećerca, *su* gen na 4. hromozomu usporava ili sprečava biohemijsku konverziju prostih šećera u skrob koja se normalno dešava u endospermu kukuruza standardnog kvaliteta (kao što su zubani). Kao posledica, formira se fitoglikogen, rastvorljivi oblik skroba, koji daje karakterističnu nežnost i kremastu strukturu zrna. Standardni šećerac sadrži 10,2% saharoze i 22,8% WSP (u tehnološkoj zrelosti) što je za tri i osam puta, respektivno, više u odnosu na zrno standardnog kukuruza. Pored saharoze koja određuje slatkoću zrna šećerca, od prostih šećera, u zrnju šećerca prisutni su glukoza, fruktoza i maltoza. Pored šećera sveža masa zrna šećerca sadrži 2,1% - 4,5% proteina, 3% - 20% skroba, 1,1% - 2,7% masti, 0,9% - 1,9% celuloze, 9 -12 mg vitamina C, male količine vitamina A, B1, B2 i mineralne komponente, kao što su natrijum, kalijum, magnezijum, kalcijum, fosfor, gvožđe, selen, bakar, nikel i hrom (Szymanek, 2016).

U ljudskoj ishrani šećerac se koristi kao povrće i njegova proizvodnja orijentisana je ka tri različita tržišta: sveže, smrznuto i konzervirano (Alan i saradnici, 2014). U Evropi najveći proizvođači, prema zasejanim površinama, su Mađarska (39.000 ha) i Francuska (26.000 ha). U svetu, ipak, najveći proizvođač i izvoznik kukuruza šećerca su Sjedinjene Američke Države. Prema statističkim podacima, u proteklih deset godina ukupna svetska izvozna količina zamrznutih i konzerviranih proizvoda na bazi kukuruza šećerca povećana je za oko 49% i 33%, respektivno (FAOSTAT, 2016). Sveže zrno se može koristiti svega 5-6 dana nakon berbe (Szymanek, 2016). To znači da je period berbe i čuvanja za standardni šećerac veoma kratak i uslovljava tehnološke procese obrade, tj. konzerviranje i smrzavanje. Šećerac sa *su* genom akumulira manje šećera u poređenju sa ostalim tipovima šećerca. Imaju kremastu strukturu, odlične senzorne karakteristike i poseduju dobru snagu klijavosti zrna. *Sh2* hibridi su karakteristični po dva do tri puta većoj koncentraciji šećera i manjem sadržaju skroba u poređenju sa standardnim tipom šećerca. Imaju produženi rok trajanja u svežem stanju zbog sporije konverzije prostih šećera u skrob nakon berbe. *Se* tipovi šećerca imaju dva puta više šećera nego standardni šećerac, izuzetno nežno zrno, kremastu strukturu i zadovoljavajuću aromu. Slatkoća zrna zadržava se duže nakon berbe. Ipak, pored poželjnih senzornih karakteristika proizvodnja *sh2* i *se* tipa šećerca je manja zbog lošije klijavosti, slabije otpornosti na patogene i teže semenske proizvodnje zbog nestandardnog oblika zrna (Alan i saradnici, 2014).

Ipak, slast zrna nije uslovljena samo genetikom već zavisi kako od vremena berbe, tako i od postupka prerade i daljeg čuvanja (Alan i saradnici, 2014). Negativna karakteristika šećerca sa *su* genom je kratko zadržavanje visokog kvaliteta zrna, odnosno u prvih 24 h nakon berbe javlja se značajno smanjenje sadržaja saharoze što za posledicu ima gubitak slasti zrna. Stoga je veoma bitno odrediti pravo vreme berbe u cilju zadržavanja odgovarajućeg fitohemijskog sastava šećerca i dobijanja što ukusnijeg proizvoda.

Period od 20 do 25 dana nakon oprašivanja (faza tehnološke zrelosti) je najbolji momenat berbe, jer tada šećerac ima najveću nutritivnu vrednost (Wong, i saradnici, 1994; Szymanek i saradnici, 2016). Pokazano je da postoji obrnuta proporcionalnost između sadržaja saharoze, glukoze i fruktoze tokom razvoja endosperma šećerca. Naime, kako sadržaj saharoze raste i dostiže svoj maksimum 25 dana od oprašivanja, tako sadržaj druga dva šećera opada (Srđić, 2009). Sa porastom zrelosti endosperma i prelaskom u voštanu fazu zrelosti sadržaj šećera opada i praćen je porastom sadržaja skroba. Sadržaj saharoze raste dok sadržaj redukujućih šećera opada u momentu optimalne zrelosti. Slično, sadržaj proteina i slobodnih amino-kiselina raste do voštane faze nakon čega gradijento opada.

2.2. Herbicidi i njihov metabolizam

Primena herbicida predstavlja direktnu hemijsku meru i jednu od najznačajnijih agrotehničkih mera zaštite useva od korova. Prosečan gubitak prinosa useva u svetu, prouzrokovan korovima, štetočinama i patogenima, iznosi 34%, 18% i 16%, respektivno. Globalno smanjenje prinosa kukuruza usled prisustva korova iznosi oko 10% (Oerke, 2006). Procena da će do 2050. godine broj ljudi na planeti biti blizu 9 milijardi ukazuje na potrebu za povećanjem proizvodnje hrane za 70%. Stoga, primena herbicida je neophodna mera u cilju postizanja većih prinosa useva i ujedno obezbeđivanja dovoljnih količina hrane za stanovništvo planete koje je u stalnom porastu.

Korovske biljke za razvoj i rast koriste velike količine vode redukujući na taj način sadržaj pristupačne vlage u zemljištu. Pored vode, korovske biljke troše iz zemljišta i velike količine hranljivih mikro- i makro-elemenata koji su neophodni za rast, funkcionisanje kao i plodonošenje useva. Stoga suzbijanje korova predstavlja neizbežan korak u sistemu biljne proizvodnje i tehnologiji gajenja useva. Ovo je od posebnog značaja za kukuruz šećerac jer on predstavlja slabijeg konkurenta zbog nižeg i slabije razvijenog habitusa u poređenju sa korovskim biljkama (Stefanović i saradnici, 2011). Reč herbicid potiče od latinske reči: *herba*- što znači biljka i *cedo* – *cedere* što znači ubiti. Stoga je veoma važno poznavati način delovanja herbicida, jer u suprotnom mogu negativno delovati i na gajenu vrstu i izazvati ogromne štete. Generalno, herbicidi se mogu podeliti prema: hemijskom sastavu (neorganski i organski); karakteru delovanja na biljku (neselektivni i selektivni); načinu delovanja na biljku (kontaktni i translokacioni); načinu primene (zemljišni i folijarna primena) i vremenu primene (pre setve useva, istovremeno sa setvom, pre nicanja useva i posle nicanja useva). Selektivni herbicid treba da efikasno uništava korovske biljke i da što manje nanosi štetu gajenom usevu. Selektivnost herbicida predstavlja mogućnost herbicida da ispolji toksično delovanje na korovsku biljku, a da ujedno ne ošteti gajeni usev. Ovaj parametar zavisi od dosta faktora: aktivne komponente (hemijska struktura i sastav), količine, koncentracije, načina i vremena primene herbicida, ali i od morfoloških, fizioloških i biohemijskih karakteristika same biljke. Isto tako, na selektivnost herbicida utiču i klimatski uslovi, kao što su temperatura i vlaga. Selektivnost zapravo zavisi od brzine apsorpcije i transporta, odnosno načina metabolizma herbicida u biljkama (Stefanović i saradnici, 2011).

Metabolizam herbicida u biljci može se podeliti u četiri faze: faza I - konverzija; faza II - konjugacija; faza III - sekundarna konverzija i transport do vakuola i faza IV - skladištenje krajnjeg metaboličkog produkta (de Carvalho i saradnici, 2009). Edwards i saradnici (2005) sugerišu da metabolički proces koji biljka aktivira za detoksikaciju molekula herbicida uključuje biosistem odgovoran za detoksikaciju, transport i biotransformaciju ksenobiotika u ćeliji. Tokom I faze metabolizma herbicida aktivna komponenta herbicida (molekul herbicida) prolazi kroz hemijske modifikacije kao što su oksidacija, redukcija, hidroliza, oksigenizacija, ili hidroksilacija u kojoj dolazi do inkorporiranja ili oslobađanja funkcionalnih grupa (-OH, -NH₂, -COOH), pri čemu se formiraju hidrofilniji i takođe manje toksični molekuli (Edwards i saradnici, 2005; de Carvalho i saradnici, 2009).

Najznačajniji enzim koji je uključen u metabolizam detoksikacije herbicida je citohrom P450-monooksigenaza koja predstavlja vezani hem-protein za membranu koji katalizuje oksido-redukcionu reakciju endogenih i ksenobiotskih supstrata (Edwards i saradnici, 2005). Tokom faze II, molekul herbicida ili metabolit iz faze I se konjuguje sa šećerima, amino-kiselinama ili sa glutationom povećavajući na taj način rastvorljivost u vodi i smanjujući fitotoksičnost. Tokom ove faze najznačajniji mehanizam predstavlja konjugacija sa glutationom, homo-glutationom i glukozom. Glutation-S-transferaze su enzimi odgovorni za konjugaciju glutationa sa molekulima herbicida (de Carvalho i saradnici, 2009). U fazi III metaboliti iz faze II se transportuju do vakuola pomoću ABC (ATP vezivne kasete) transportera i tada je moguća sekundarna konjugacija. Kasnije, u fazi IV metaboliti detoksikacionih procesa, skladišteni u vakuolama, mogu biti združeni sa komponentama ćelijskog zida (pektin, lignin, polisaharidi) formirajući nerastvorne ostatke (Edwards i saradnici, 2005). Tolerantne biljke brzo metabolišu i inaktiviraju molekul herbicida i na taj način se sprečava njegovo fitotoksično delovanje. Međutim, kod osetljivijih biljaka, usled nemogućnosti brze detoksikacije molekula herbicida, on stiže do mesta delovanja i dovodi do ispoljavanja fitotoksičnih simptoma, slično kao kod korovskih biljaka, kao što su nekroza lista, uvrtanje lista, smanjenje rasta i dr. Energija za metabolizam detoksikacije herbicida u biljci je prirodno dostupna, ali ipak energija za oporavak usled ispoljavanja fitotoksičnosti nije obuhvaćena kao prirodni odgovor biljke usled čega dolazi do manjeg ili većeg gubitka prinosa useva. Herbicidi u biljci mogu izazvati privremeni ili trajni stres, u zavisnosti od primenjene koncentracije, stanja i tipa useva, faze razvoja, balansa vode i klimatskih uslova. Privremeni stres omogućava brzi oporavak biljke od stresa sa neznatnim ili bez gubitka prinosa, dok trajni stres ometa normalan rast i razvoj biljke i dovodi do većeg gubitka prinosa (de Carvalho i saradnici, 2009).

2.2.1. Mehanizam delovanja meotriona i nikosulfurona

Meotrion je 2,4-disupstituisani benzoilcikloheksan-1,3-dion i pripada grupi triketona - klase herbicida koji su zapravo derivati prirodnog fitotoksina leptospermona. Triketoni inhibiraju aktivnost enzima *p*-hidroksifenilpiruvat-dioksigenaze (HPPD), ključnog enzima koji katalizuje konverziju tirozina u plastohinon i dalje u α -tokoferol. U senzitivnim biljkama, kao posledica inhibiranja HPPD enzima dolazi do smanjene biosinteze karotenoida i do izbeljivanja („belching“) listova (Mitchell i saradnici, 2001). Kasnije, dolazi i do nekroze listova i propadanja same biljke usled nedostatka hlorofila. Meotrion se primenjuje zemljišno, posle setve a pre nicanja, ili folijarno kada je kukuruz u fazi od 6 do 8 listova. Meotrion obezbeđuje kontrolu širokolisnih korova koji ometaju proizvodnju kukuruza, a veoma brzo se mikrobiološki razgrađuje u zemljištu.

Nikosulfuron, iako pripada grupi sulfonilurea herbicida, razlikuje se od ostalih herbicida iz te grupe prema strukturi. Na levoj strani sulfonilurea mosta umesto benzena nalazi se piridin, na kojem je karboksamidna grupa (Gonzalez i Ukrainczyk, 1996). Nikosulfuron se primenjuje u maloj dozi i ima nizak potencijal kontaminacije podzemnih voda, nisku toksičnost i minimalan uticaj na životnu sredinu. Sulfonilurea herbicidi inhibiraju acetolaktat-sintetazu (ALS), prvi enzim u biosintezi esencijalnih amino-kiselina razgranatog lanca: leucina, valina i izoleucina (O'Sullivan i saradnici, 2000). S obzirom da su za rast biljke neophodni proteini, u slučaju zaustavljanja biosinteze proteina zaustavljaju se i drugi vitalni metabolički procesi. Ipak, potpuno formirana tkiva poseduju određene količine rezervnih proteina koje mogu ublažiti i potkrepiti nedostatak leucina, valina i izoleucina. Zbog toga, kod osetljivih biljaka simptomi postaju vidljivi na starijim listovima, nakon čega sledi i propadanje same biljke. Nikosulfuron se može primeniti i zemljišno i folijarno, nakon nicanja, kada je kukuruz u fazi do 6 razvijenih listova (Brankov, 2016).

2.3. Folijarna prihrana

Folijarna prihrana je široko korišćena agrotehnička mera koja se dodatno koristi kao dopuna osnovnom đubrenju u cilju poboljšanja kvaliteta i povećanja prinosa useva (Oosterhuis, 2009). Primenom mineralnih đubriva preko osnovnog đubrenja omogućava se snabdevanje osnovnim hranljivim nutrijentima (makro-nutrijentima) neophodnim za rast i razvoj biljke (Marschner, 2012). U ovom slučaju primenjene hranljive komponente se usvajaju preko korenovog sistema biljke. Međutim, u uslovima nepovoljnih karakteristika zemljišta, kao što je visoka pH vrednost, kao i na karbonatnim zemljištima javlja se nemogućnost iskorišćenja hranljivih elemenata, uz veću mogućnost ispiranja, kao i mikrobiološku razgradnju mineralnih đubriva u zemljištu.

Kako bi nutrijenti primenjeni folijarnom prihranom bili usvojeni od strane biljke, nutrijenti moraju da prodru u list i stignu do citoplazme ćelija unutar lista, gde će dalje biti metabolisani (Fageria i saradnici, 2009). Postoje dva moguća načina prodiranja folijarno primenjenih jedinjenja u list: kroz stomu ili kroz spoljašnju kutikulu. Opšte je prihvaćeno da se apsorpcija nutrijenata uglavnom odigrava kroz sloj kutikule, ali da se ipak može desiti i indirektan prodor, kroz stomu lista. Kutikula je voštani hidrofobni sloj koji štiti sve površinske delove biljke od spoljašnjih faktora i zapravo predstavlja barijeru za apsorpciju folijarno primenjenih nutrijenata. Usvajanje folijarno primenjenih lipofilnih jedinjenja kroz kutikulu omogućeno je putem difuzije, dok se hidrofilna jedinjenja, usled odsustva surfaktanata, usvajaju mnogo sporije (Fernández i saradnici, 2013). Usled stresa nedostatka vode, zabeleženo je i povećanje debljine sloja kutikule za približno 33% (Oosterhuis, 2009), što dodatno otežava prodiranje folijarno primenjenih nutrijenata.

Folijarna prihrana omogućava brzo i lako usvajanje hranljivih elemenata preko lista, pri čemu se zaobilaze navedeni nedostaci osnovnog đubrenja (Fageria i saradnici, 2009). Folijarna đubriva mogu da sadrže fitohormone, stimulatore rasta, amino-kiseline i esencijalne mikro- i makro-elemente. Efikasnost folijarne prihrane zavisi od tipa i koncentracije đubriva, pH primenjenog rastvora, primene surfaktanata (ađuvanata), kompatibilnosti sa primenjenim herbicidom, kao i meteoroloških uslova (Fernández i saradnici, 2013). Folijarnom prihranom se obezbeđuje optimalna snabdevenost svih potrebnih nutrijenata neophodnih za neometan rast i razvoj biljke. Takođe, folijarnom prihranom se može otkloniti nedostatak pojedinih nutrijenata u zemljištu i na taj način pomoći biljci da se normalno razvija i raste. Folijarnim đubrivom povećava se i otpornost biljke prema abiotskom i biotskom stresu, kao što su suša, razne štetočine i patogeni. Folijarnom prihranom moguće je i ublažiti stres nastao usled nepovoljnih klimatskih uslova, kao i primene herbicida. Pored pozitivnih efekata koje folijarna prihrana ispoljava, postoje i nedostaci, kao što su nemogućnost primene veće količine đubriva, problem rastvorljivosti, pogotovo u hladnoj vodi, potreba za pogodnim vremenskim uslovima (vetar, temperatura, vlaga), starost lista (fiziološka aktivnost) i nekompatibilnost sa određenim hemikalijama (Oosterhuis, 2009).

2.4. Fitohemikalije

Kroz veliki broj epidemioloških studija pokazano je da veća upotreba voća i povrća u ljudskoj ishrani može smanjiti rizik od nastanka različitih bolesti i degeneartivnih procesa (Dauchet i saradnici 2006; Rodriguez-Casado, 2016). Povećana upotreba voća i povrća ujedno povećava unos u vodi i u mastima rastvorljivih vitamina, dijetetskih vlakana i fitohemikalija (karotenoida, fenola, glukozinolata), koji imaju pozitivne efekte na ljudsko zdravlje (Lock i saradnici, 2005). Ovu tvrdnju potkrepile su studije koje se odnose na blagotvoran uticaj nekih od navedenih jedinjenja (Lambert i Yang, 2003; Tanaka i saradnici, 2012, Tsuduki i saradnici, 2013). Zbog toga, u današnje vreme, potraga za hranom koja ima visok sadržaj fitohemikalija postala je svetski trend.

Shodno tome, procesi biofortifikacije putem selekcije se uveliko primenjuju u cilju stvaranja genotipova koji akumuliraju veće količine mikronutrijenata u poređenju sa standardnim genotipovima (Lockyer i saradnici, 2018).

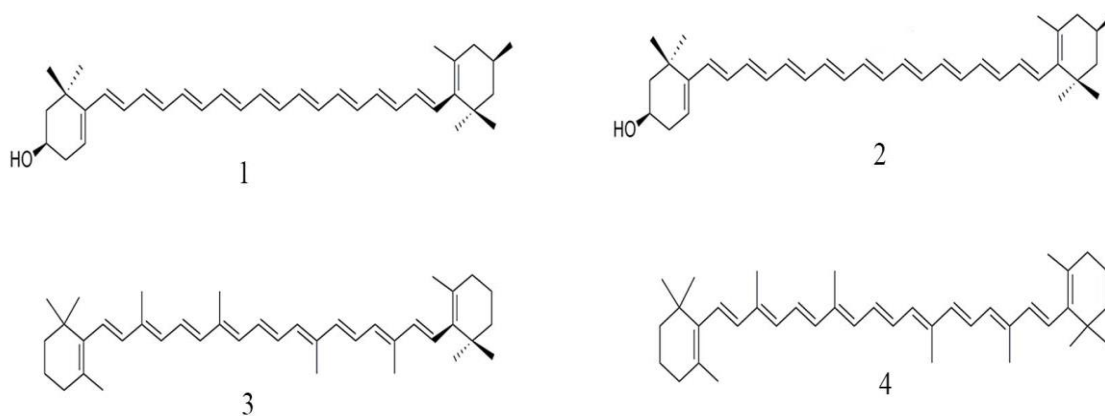
2.4.1. Karotenoidi

Karotenoidi su pigmenti rastvorljivi u mastima i odgovorni su za žutonarandžastu, a ponekad i crvenu boju voća i povrća. Prema strukturi mogu se podeliti u dve velike grupe: ksantofile, molekule koje sadrže kiseonik (lutein i zeaksantin) i karotene, molekule koji ne sadrže kiseonik (β -karoten i likopen). Postoji preko 700 karotenoida u prirodi ali samo oko 50 njih ima provitamin A aktivnost. U ljudskom organizmu najznačajniji prekursori vitamina A su α -karoten, β -kriptoksantin i β -karoten. Ksantofili, lutein i zeaksantin, štite očno tkivo od fototoksičnih oštećenja tako što apsorbuju štetno plavo svetlo visoke energije (Basu i saradnici, 2001). Konzumiranje karotenoida povezano je sa velikim brojem benefita po ljudsko zdravlje kao što su hemoprotekcija kancera, prevencija srčanih i vaskularnih bolesti, prevencija hroničnih bolesti (katarakta i makularna degeneracija oka), kao i degenerativnih bolesti (Alchajmerova bolest) (Agarwal i saradnici, 2012; Obulesu i saradnici, 2011). Skoro svi karotenoidi, u većoj ili manjoj meri, pokazuju „hvatačka“ svojstva prema velikom broju slobodnih radikala koji se proizvode tokom životnog ciklusa ćelije. Antioksidativni potencijal karotenoida je najviše ispitan i pretpostavlja se da je glavni mehanizam njihovog delovanja. Ipak, dosta studija je objavljeno i na temu delovanja karotenoida na ćelijske procese (modulacija gena, ćelijski ciklus, komunikacija na nivou ćelija, citotoksičnost i apoptoza) (Rafi i saradnici, 2013; Liu i saradnici, 2009).

Kukuruz, u poređenju sa ostalim žitaricama, ima najveći sadržaj karotenoida. Među njima najzastupljeniji su zeaksantin, lutein, β -kriptoksantin i β -karoten (Suri i Tanumihardjo, 2016) (Slika 1). S obzirom da od navedenih karotenoida β -kriptoksantin i β -karoten imaju mogućnost konverzije u vitamin A, u poslednje vreme veliki broj istraživanja zasnovan je na programima biofortifikacije kukuruza kroz različite metode selekcije, koja za cilj ima poboljšanje nutritivnog kvaliteta kukuruza što ujedno podrazumeva i povećanje sadržaja karotenoida (Safawo i saradnici, 2010). Ipak, sadržaj karotenoida zavisi od mnogih faktora kao što su genotip, klimatski, kao i drugi uslovi proizvodnje, vreme berbe, dorada nakon berbe, skladištenje (Suri i Tanumihardjo, 2016). Suprotno, Kurilich i saradnici (1999) su u svojoj studiji pokazali da vreme berbe ne utiče na sadržaj karotenoida, dok su Ibrahim i Juvik (2009) pokazali da vegetaciona sezona ne utiče na sadržaj karotenoida u zrnu kukuruza šećerca.

2.4.1.1. Metode za određivanje karotenoida

Za ekstrakciju karotenoida najčešće korišćena procedura je direktna ekstrakcija karotenoida iz matriksa pomoću odgovarajućeg organskog rastvarača. Izbor odgovarajućeg rastvarača je najbitniji korak u ekstrakciji karotenoida, posebno zbog njihove različite polarnosti (ksantofili i karoteni). Napolarni rastvarači, kao što je heksan, predstavljaju dobar izbor za ekstahovanje karotenoida i esterifikovanih karotenoida, dok su polarni rastvarači (etanol i aceton) pogodniji za ekstrahovanje ksantofila. Takođe, osetljivost karotenoida prema oksidaciji je nešto što treba imati na umu kada se optimizuje metoda za ekstrakciju karotenoida. Molekuli karotenoida su stabilni u matriksu, ali u rastvoru postaju osetljivi prema svetlosti, temperaturi, kiselinama i kiseoniku (Amorim-Carrilho i saradnici, 2014).



Slika 1. Najzastupljeniji karotenoidi u kukuruзу: 1 – Lutein; 2 - Zeaksantin; 3 - α -Karoten; 4 - β -Karoten.

U procesu ekstrahovanja karotenoida, vrlo često se primenjuje i proces saponifikacije. Međutim, nekoliko studija je ukazalo na gubitak karotenoida nakon saponifikacije (Divya i saradnici, 2012; Muzhingi i saradnici, 2008). Howe i saradnici (2006) ukazuju da korak saponifikacije u procesu ekstrahovanja karotenoida iz kukuruза nije potreban, jer se oni ne nalaze u esterifikovanom obliku. Rivera i saradnici (2012) su pokazali da je metanol u kombinaciji sa manje polarnim rastvaračem imao bolji učinak u ekstrakciji karotenoida iz zrna kukuruза nego etanol, aceton ili kombinacija aceton:etanol:heksan.

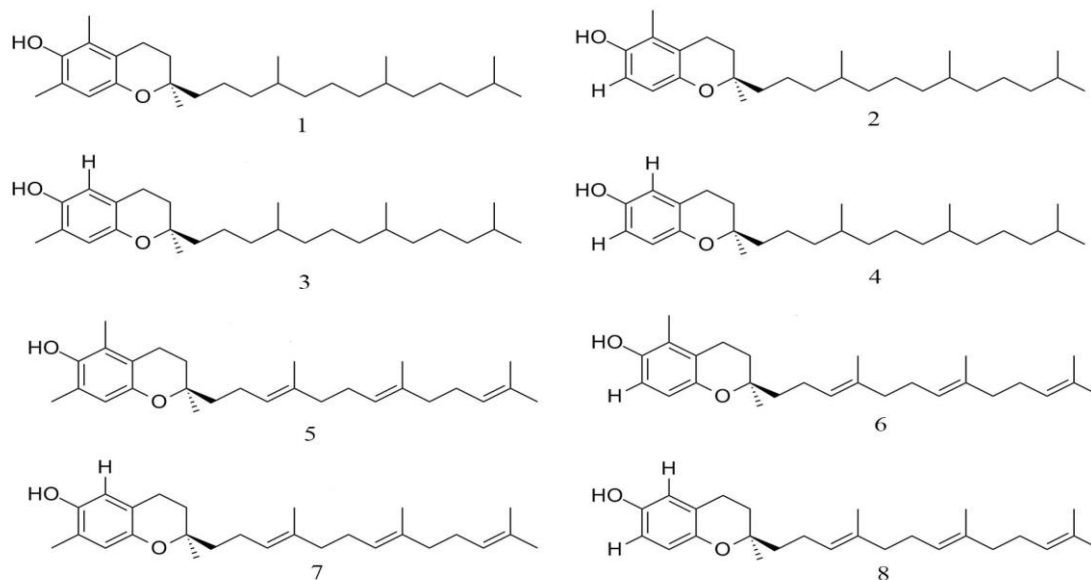
Hemijska struktura karotenoida koja predstavlja osam izoprenskih jedinica sa konjugovanim dvostrukim vezama ukazuje na moguću pojavu izomera. Dvostruke veze podložne su reakcijama oksidacije, izomerizacije (*cis-trans*), posebno ukoliko su karotenoidi izloženi delovanju svetlosti, temperataure i kiseonika. Ciklizacija, hidrogenizacija, dehidrogenizacija su samo neke od modifikacija koje mogu dovesti do stvaranja vrlo složenih jedinjenja karotenoida sa veoma sličnim strukturama. Identifikacija karotenoida može biti potvrđena pomoću HPLC povezane sa masenim (Mass Spectrometry – MS) ili DAD detektorom (Amorim-Carrilho i saradnici, 2014). Hromatografsko razdvajanje karotenoida može se ostvariti reverzno-faznom hromatografijom sa C8, C18 i C30 stacionarnim fazama. C18 kolone obezbeđuju dobro radvajanje karotenoida kratkih lanaca i manjih molekulskih masa. Sa druge strane, C30 kolona obezbeđuje bolju selektivnost i bolje razdvajanje karotenoida dužih lanaca, odnosno nepolarnijih karotenoida (likopena i β -karotena), što je čini kolonom prvog izbora za kvantifikaciju karotenoida. Međutim, kada je potrebno izvršiti istovremeno hromatografsko razdvajanje i karotena i ksantofila iz biljnog matriksa, nastali hromatogram sa C30 kolonom je sličan onom koji se dobija sa C18 kolonom, ali sa dužim vremenom trajanja analize (Daood i saradnici, 2014). Najčešće korišćeni rastvarači kao mobilne faze u cilju razdvajanja karotenoida su acetonitril i metanol. Takođe, manje polarni rastvarači (dihlormetan, tetrahidrofuran, etil-acetat, heksan i aceton) mogu se dodati osnovnom rastvaraču kao modifikatori kako bi se dobila odgovarajuća retencija, povećala rastvorljivost ili poboljšala rezolucija (Amorim-Carrilho i saradnici, 2014).

2.4.2. Vitamin E

Vitamin E u prirodi čine četiri tokoferola (α -T, β -T, γ -T, δ -T) i četiri tokotrienola (α -T3, β -T3, γ -T3, δ -T3), koji se razlikuju po broju i položaju metil grupe na hromanolnom prstenu. Tokoferoli i tokotrienoli se još zajedničkim imenom nazivaju tokohromanoli ili tokoli.

Svi tokoli imaju fitil lanac sačinjen od 16 atoma ugljenika koji je vezan za hromanolni prsten, pri čemu tokoferoli nemaju a totrienoli imaju tri dvostruke veze (Slika 2).

Ljudi i životinje ne mogu da sintetišu vitamin E i zbog toga je neophodan unos iz biljaka koje jedine imaju mogućnost njegovog sintetisanja. U biljkama najrasprostranjeniji oblik je γ -tokotrienol, dok je u krvi ljudi zabeležena mnogo veća koncentracija α -tokoferola. Od svih tokola, α -tokoferol pokazuje najveću biološku aktivnost dok γ -tokoferol poseduje svega 10-30% aktivnosti α -tokoferola (Saini i Keum, 2016).



Slika 2. Strukture tokohromanola: 1 - α -Tokoferol; 2 - β -Tokoferol; 3 - γ -Tokoferol; 4 - δ -Tokoferol; 5 - α -Tokotrienol; 6 - β -Tokotrienol; 7 - γ -Tokotrienol I; 8 - δ -Tokotrienol.

Vitamin E je poznat kao moćan antioksidans i pokazuje antikancersku aktivnost. Mnoge studije su pokazale snažne benefite vitamina E na ljudsko zdravlje kao što su antihipertenzivna, nefroprotektivna, neuroprotektivna, antiinflamatorna dejstva (Rashid i saradnici, 2015; Saini i Keum, 2016; Tsuduki i saradnici, 2013). Takođe, vitaminu E se pridaje sve veća pažnja u kozmetičkim preparatima i kliničkoj dermatologiji zbog fotoprotektivnog i antioksidativnog potencijala (Thiele i saradnici, 2005). α -Tokoferol štiti ćelijske membrane tako što neutrališe lipoproteine male gustine i lančane peroksidne radikale, nastale usled lipidne oksidacije (Saini i Keum, 2016). Oksidovani oblici lipoproteina male gustine povezani su sa nastankom kardiovaskularnih bolesti zbog skladištenja lipida na zidovima arterija. Novije studije pokazuju da tokotrienoli poseduju antioksidativnu aktivnost i antiinflamatorna svojstva koja su superiornija od tokoferola u prevenciji mnogih hroničnih bolesti. Zbog nezasićenog ugljovodoničnog lanca koji poseduju, tokotrienoli mogu uspešno proći kroz ćelijsku membranu. Tokotrienoli poseduju antikancerski, antidijabetski, antiinflamatorni, imunostimulatorni kao i nefroprotektivni potencijal (Ahsan i saradnici, 2014).

2.4.2.1. Metode za određivanje vitamina E

Razvijen je veliki broj metoda za ekstrahovanje tokola iz različitih matriksa. Ekstrakcione metode podrazumevaju razne tehnike kao što su ekstrakcija rastvaračem (direktna ekstrakcija, ekstrakcija po Soksletu (Soxhlet) ili saponifikacija), maceracija, tečna ekstrakcija pod pritiskom, ultrazvučna ekstrakcija i ekstrakcija pomoću superkritičnog fluida (Ramos, 2012). Ipak najčešće korišćen vid ekstrakcije, pogotovo za ekstrahovanje iz matriksa žitarica, je ekstrakcija rastvaračem i ultrazvučna ekstrakcija. Ofori-Boateng i Lee (2014) su pokazali u svojoj studiji da je ekstrakcija ultrazvukom efikasnija za ekstrakciju tokoferola u poređenju sa ekstrakcijom po Soksletu, saponifikacijom i maceracijom. Rastvarači koji se najčešće koriste su heksan, etanol, metanol i aceton kao i njihove kombinacije. Ekstrakcija etanolom praćena saponifikacijom je široko korišćena metoda za ekstrahovanje tokola (Mitei i saradnici, 2009). Ipak, mnogo autora je ukazalo na gubitak tokola nakon procesa saponifikacije usled degradacije (Lim i saradnici, 2007; Stinco i saradnici, 2014). Annunziata i saradnici (2012) su sugerisali da je pri ekstrakciji sa čistim metanolom bez saponifikacije dobijen veći sadržaj tokola u poređenju sa hladnim acetonom i etanolom u kombinaciji sa procesom saponifikacije. Slično, Gliszczyńska-Swigło i Sikorska (2004) su u svojoj studiji ekstrahovali tokole pomoću 2-propanola bez saponifikacije.

Metode koje se koriste za identifikaciju i kvantifikaciju tokola su gasna hromatografija, tečna hromatografija, kapilarna elektrochromatografija, kapilarna tečna hromatografija, i tankoslojna hromatografija. Ipak od svih navedenih, za rutinske analize najčešće se koristi normalno- (*Normal Phase - NP*) ili reverzno-fazna (*Reversed Phase - RP*) tečna hromatografija povezana sa DAD, FLD ili MS detektorom. Od svih navedenih detektora FLD je detektor prvog izbora, jer je najosetljiviji za detekciju tokola zbog njihove prirodne osobine da poseduju fluorofore (Saini i Keum, 2016). U NP sistemu, tokoferoli se eluiraju pre nego tokotrienoli zbog njihovog većeg afiniteta prema silanolnim grupama na površini silika gela, dok je u RP sistemu redosled eluiranja obrnut. NP sistem pokazuje bolju selektivnost u razdvajanju tokola, uz mogućnost razdvajanja β i γ tokoferola i tokotrienola, za razliku od RP sistema. Ipak, ukoliko razdvajanje β i γ tokoferola i tokotrienola nije od ključne važnosti, kao što je slučaj sa uzorcima kukuruza, C18 kolone mogu se koristiti prvenstveno zbog kraćeg vremena ekvibracije i bolje reproduktivnosti (Gliszczyńska-Swigło i Sikorska, 2004; Abidi, 2000). Takođe, prednost RP sistema je svakako kraće vreme analize i smanjena upotreba štetnih rastvarača.

Noviji pomaci u razvijanju materijala koji se koriste kao stacionarne faze u hromatografiji omogućili su razdvajanje β i γ tokoferola i tokotrienola u RP sistemima. Nove, pentafluorofenil (PFP) kolone imaju porozne šupljine koje omogućavaju smanjenje difuzije analita između čestica stacionarne faze, obezbeđuju bolji prenos mase i rezultuju boljom rezolucijom pri nižem pritisku u poređenju sa konvencionalnim kolonama (Knecht i saradnici, 2015). Rastvarači koji se najčešće koriste kao mobilne faze u RP sistemu su metanol ili acetonitril uz mali dodatak vode. Alkohol, etar, dihloretar ili heksan se mogu dodati i organskoj i neorganskoj fazi u cilju postizanja dobrog razdvajanja ispitivanih tokola (Abidi, 2000).

2.4.3. Fenolne kiseline

Fenolna jedinjenja predstavljaju aromatične sekundarne metabolite, široko rasprostranjene u biljnom svetu. Pretpostavlja se da preko 8000 jedinjenja koja postoje u biljkama su fenoli. Mnogi oblici stresa kao što su infekcije, oštećenja biljnog tkiva, UV radijacija i povišena temperatura dovode do povećanja ili *de novo* sinteze fenolnih jedinjenja u biljkama. Za razliku od voća i povrća, fenolna jedinjenja u žitaricama mogu biti prisutna u slobodnom, slobodno esterifikovanom i nerastvorno vezanom obliku (Das i Singh, 2016). Isti autori su pokazali da je u zrnu kukuruza šećerca najveći sadržaj slobodnih kiselina zabeležen u klici, a vezanih u perikarpu.

Fenolne kiseline su podgrupa fenolnih jedinjenja i mogu se prema hemijskoj strukturi klasifikovati u ne flavonoide (Teixeira i saradnici, 2013). Fenolne kiseline u svojoj strukturi sadrže jednostavan skelet od šest atoma ugljenika i predstavljaju hidroksi derivate benzojeve i cimetine kiseline. Kofeinska, *p*-kumarinska, sinapinska i ferulinska kiselina pripadaju derivatima hidroksicimetine kiseline. Vanilinska i protokatehinska kiselina su najpoznatiji hidroksi derivati benzojeve kiseline. Mnogo pažnje je posvećeno galnoj, vanilinskoj, kofeinskoj i *p*-kumarinskoj kiselini koje se nalaze u mnogim biljkama (Inbaraj i saradnici, 2010). Fenolne kiseline su odgovorne za neutralisanje slobodnih radikala, heliranje metalnih jona, a takođe učestvuju u modifikaciji enzimske aktivnosti. Osim toga, pokazuju antiviralnu i antiinflamatornu aktivnost, kao i diuretsko i antialergeno dejstvo (Zheng i saradnici, 2001). Takođe, učestvuju u regenerativnim i adaptacionim procesima u čoveku i koriste se u prevenciji mnogih bolesti. Pokazano je da deluju preventivno protiv nastanka koronarnih bolesti, inflamacije, dijabetesa tipa 2 kao i u borbi protiv tumora. Novija istraživanja pokazala su prokoagulantnu aktivnost fenolnih kiselina (Huang i saradnici, 2010). Ferulinska i kofeinska kiselina nazivaju se još i inhibitorima rasta tumora. Od svih žitarica, najveći sadržaj ferulinske kiseline zabeležen je u kukuruzu ukazujući na njegov potencijal u smislu funkcionalne hrane (Boz, 2015). Sadržaj fenolnih kiselina zavisi od genotipa, sastava zemljišta, uslova gajenja, faze zrelosti, uslova nakon berbe, primenjenih agrotehničkih mera, kao i od meteoroloških uslova (Naczki i Shahidi, 2006).

2.4.3.1. Hromatografske metode za određivanje fenolnih kiselina

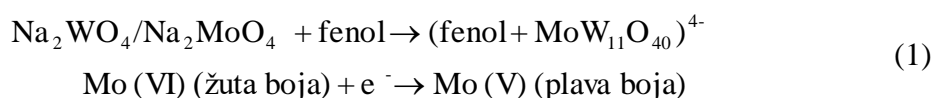
Najčešće korišćene ekstrakcione metode u cilju izdvajanja fenolnih kiselina iz čvrstog matriksa su ekstrakcija rastvaračem (direktna ekstrakcija ili ekstrakcija po Soksletu) ultrazvučna ekstrakcija i ekstrakcija pomoću superkritičnog fluida (Arceusz i saradnici, 2013). Najčešće korišćeni rastvarači kao ekstrakciona sredstva su metanol, etanol, aceton, etil-acetat i njihove kombinacije sa određenom količinom vode (Naczki i Shahidi, 2006), bez obzira što su fenolne kiseline rastvorne u organskim rastvaračima. Galanakis i saradnici (2013) u svojoj studiji potvrdili su da se dodatkom vode u organski rastvarač povećava efikasnost ekstrakcije. Fenolne kiseline su stabilnije na nižim pH vrednostima, te se zbog toga njihova ekstrakcija pretežno vrši u kiseloj sredini. S obzirom da fenolne kiseline mogu biti prisutne i u vezanim nerastvornim kompleksima, koji su povezani sa ćelijskim zidom, prilikom ekstrakcije, u cilju njihovog oslobađanja, bazna, kisela i enzimaska hidroliza mora biti upotrebljena (Mattila i Kumpulainen, 2002). Vrlo često, u toku ekstrakcije upotrebljavaju se i antioksidansi koji imaju ulogu stabilizatora kao što su askorbinska kiselina, *terc*-butilhidrohinon i butilovani hidroksianizol (Arceusz i saradnici, 2013).

U cilju razdvajanja, identifikacije i kvantifikacije fenolnih kiselina iz biljnog matriksa koriste se tečna i gasna hromatografija (Arceusz i saradnici, 2013). Pomoću gasne hromatografije moguće je analizirati mali broj fenolnih kiselina (mase ispod 600 Da). Takođe, u gasnoj hromatografiji se koriste visoke temperature za razdvajanje što može dovesti do razlaganja ispitivanih analita (Lin i saradnici, 2010). Stoga visoko-efikasna tečna hromatografija, uglavnom RP sistemi, sa MS ili DAD detektorom je najčešće korišćena metoda za analiziranje fenolnih kiselina (Arceusz i saradnici, 2013). Fenolne kiseline apsorbuju u UV oblasti (220 - 450 nm) i odabir talasnih dužina je jako bitan u detekciji i kvantifikaciji, posebno ako jedinjenje od interesa ne poseduje specifične hromofore. Nedostatak DAD detektora je nemogućnost pružanja informacija o strukturi analita što ograničava njegovu primenu. Pomoću MS detektora omogućena je selektivnija i pouzdanija identifikacija jedinjenja od interesa u poređenju sa DAD detektorom (Lucci i saradnici, 2017). Najčešće korišćeni rastvarači, kao mobilne faze, su voda, metanol i acetonitril. Ponekad, kad je potrebno dobiti bolju rezoluciju razdvajanja analita od interesa dodaju se modifikatori kao što su mravlja kiselina, sirćetna kiselina ili amonijum-acetat (Arceusz i saradnici, 2013).

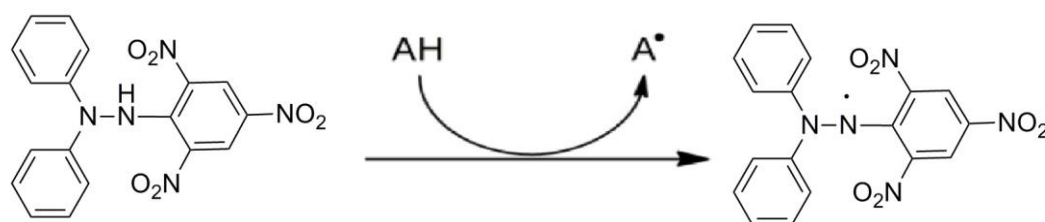
2.4.3.2. Spektrofotometrijske metode

Spektrofotometrijske metode su brze i jednostavne metode za određivanje ukupnog sadržaja fenola, flavonoida, antocijana i antioksidativne aktivnosti nekog uzorka. Ipak treba imati na umu da spektrofotometrijske metode nisu specifične samo za fenolna jedinjenja te mogu lako dovesti do pogrešne interpretacije rezultata (Everette i saradnici, 2010).

Za određivanje ukupnog sadržaja fenola najčešće se koristi *Folin-Ciocalteu* metoda. Struktura *Folin-Ciocalteu* reagensa nije u potpunosti razjašnjena ali smatra se da njegova žuta boja potiče od prisutnih soli fosfovolframske i fosfomolibdenske kiseline (Sánchez-Rangel i saradnici, 2013). Sama reakcija, pri pH = 10, zasniva se na interakciji fenolnih jedinjenja i *Folin-Ciocalteu* reagensa, pri čemu dolazi do deprotonovanja fenola i nastajanja fenolatnog jona. Nastali fenolatni jon ima sposobnost redukcije *Folin-Ciocalteu* reagensa, pri čemu se formira smeša volfram-oksida i molibden-oksida plave boje (jednačina 1). Intenzitet boje je proporcionalan količini fenolnih jedinjenja u uzorku i njihova koncentracija se određuje spektrofotometrijskim merenjem apsorpcije na 765 nm. Standard galne kiseline najčešće se koristi za konstruisanje kalibracione krive (zavisnost apsorpcije i koncentracije), dok se sadržaj ukupnih fenola izražava kao ekvivalent galne kiseline (Sánchez-Rangel i saradnici, 2013). Iako sama metoda nije zahtevna, ne zahteva skupu opremu i brzo se izvodi, ipak nedostatak je neselektivnost i osetljivost prema drugim redukujućim supstancama, što može dovesti do pogrešnih rezultata pogotovo u kompleksnom uzorku kao što je biljni (Rover i Brown, 2013). Everette i saradnici (2010) su pokazali da se *Folin-Ciocalteu* metoda može koristiti kao gruba aproksimacija ukupnog sadržaja fenolnih jedinjenja u biljnom uzorku, jer su ona najzastupljenija u poređenju sa prisutnim jonima metala, proteinima, tiolima, itd.



Spektrofotometrijske metode koje se koriste za određivanje antioksidativne aktivnosti su: ABTS (2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina), FRAP (redukcija antioksidativne moći gvožđa – Ferric Reducing Antioxidant Power), ORAC (kapacitet apsorpcije kiseoničnog radikala - Oxygen Radical Absorbance Capacity) i DPPH[•] metoda (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal). Sve pomenute metode zasnivaju se na reakciji reaktivnih vrsta kiseonika sa primenjenim reagensom, pri čemu nastaju kompleksi koji se mogu kasnije spektrofotometrijski detektovati (Karadag i saradnici, 2009). Međutim, od pomenutih metoda najčešće se koristi metoda sa DPPH[•] reagensom, jer ne zahteva puno vremena i veoma je jednostavna za izvođenje. DPPH[•] je organsko jedinjenje, tj. stabilan slobodni radikal koji ne podleže dimerizaciji zbog delokalizacije nesparenog elektrona preko celog molekula (Kedare i Singh, 2011). Sama reakcija između DPPH[•] reagensa i jedinjenja sa antioksidativnom aktivnošću zasniva se na redukciji DPPH[•] reagensa (Slika 3). Tada boja etanolnog rastvora DPPH[•] reagensa prelazi iz ljubičaste u žutu. Promena boje DPPH[•] reagensa proporcionalna je koncentraciji jedinjenja sa antioksidativnim svojstvom i određuje se spektrofotometrijskim merenjem smanjenja intenziteta apsorpcije u opsegu od 515 nm do 528 nm (Karadag i saradnici, 2009). Dobijeni rezultati mogu se prikazati na nekoliko načina, a jedan od njih je izražavanje antioksidativne aktivnosti kao ekvivalent troloksa.



Slika 3. Određivanje sadržaja fenola pomoću DPPH[•] reagensa.

2.5. Šećeri

Ugljeni hidrati su velika i jako važna klasa prirodnih organskih jedinjenja. Po hemijskoj strukturi su polihidroksi aldehidi i ketoni sa različitim stepenom polimerizacije. Prema broju osnovnih jedinica ugljeni hidrati se mogu podeliti na monosaharide ili proste šećere (njihovom hidrolizom ne mogu se dobiti jednostavnija jedinjenja), oligosaharide (dva do deset monosaharidnih ostataka) i polisaharide (veliki broj monosaharidnih ostataka). Takođe, u proste šećere mogu se svrstati i polioli, odnosno šećerni alkoholi. Prosti šećeri su osnovno energetsko gorivo ćelije i predstavljaju esencijalne molekule za životni ciklus ćelije. Procesom glikolize, preko ciklusa limunske kiseline ili pentozno-fosfatnog puta, aerobnim ili anaerobnim putem, monosaharidi se transportuju do ćelije. Različitim metaboličkim putevima prosti šećeri se zatim razlažu u visokoenergetske molekule i taj proces se naziva ćelijska respiracija (Dashty, 2013).

Funkcionalni oligosaharidi (izomaltoza, izomaltotrioza, panoza, trehaloza, maltotrioza, rafinoza i dr.) izazivaju sve veću pažnju i prema Ibrahim, (2018) predstavljaju ugljene hidrate koji imaju 2 do 10 monosaharidnih jedinica povezanih glikozidnom vezom. Maltoza, saharoza i laktoza, s obzirom da su svarljivi, ne ubrajaju se u funkcionalne oligosaharide. Prema definiciji, funkcionalni oligosaharidi su nesvarljivi i omogućavaju pozitivna dejstva na čovekovo zdravlje i stoga se smatraju dijetetskim vlaknima i prebioticima (Cheng i saradnici, 2017). Benefitna uloga funkcionalnih oligosaharida je pre svega prebitoska, ali takođe oni povećavaju apsorpciju minerala, poboljšavaju odnos HDL/LDL holesterola, smanjuju nivo lipida u serumu, kao i holesterola u krvi, eliminišu toksine iz tela i imaju nizak glikemijski indeks. Stoga, sve više se primenjuju kao dijetetski suplementi, a u zadnje vreme funkcionalni oligosaharidi primenjuju se i u farmaceutskim i kozmetičkim preparatima (Loftsson i Duchêne, 2007). Trehaloza ima važnu biofarmaceutsku primenu kao konzervans i stabilizator osetljivih terapijskih proteina i kao krioprotektant za održavanje bioloških materijala (Ibrahim, 2018). Shodno tome, u novije vreme, zbog velike potrebe za funkcionalnim oligosaharidima razvijen je enzimski postupak proizvodnje funkcionalnih oligosaharida iz različitih, prirodno bogatih ugljenim hidratima izvora kao zamena za skupe ekstrakcione metode iz biljnog materijala (Ibrahim, 2018).

2.5.1. Metode za određivanje šećera

Ugljeni hidrati predstavljaju jedne od najizazovnijih biomolekula za analiziranje posebno zbog njihovog sastava i prostorne orijentacije atoma. Zbog toga je otežano i razvijanje opštih analitičkih metoda za analizu šećera (Nagy i saradnici, 2017). Najčešće korišćena ekstrakciona metoda u cilju izdvajanja rastvorljivih šećera iz čvrstog matriksa je direktna ekstrakcija rastvaračem. Kao ekstrakciona sredstva najčešće se koriste metanol, etanol i voda (Giannoccaro i saradnici, 2006; Karkacier i saradnici, 2003). Karkacier i saradnici (2003) su u svojoj studiji ukazali da je voda efektivnije ekstrakciono sredstvo za ekstrakciju šećera u poređenju sa metanolom. U slučaju velikog udela ulja u uzorku, prvo se vrši odmaščivanje pomoću dietiletra a zatim ekstrakcija šećera etanolom (Maness, 2010).

Kao analitičke metode u cilju identifikacije i kvantifikacije šećera najčešće se koriste HPLC i HPAEC povezane sa refraktometrijskim (*Refractive Index* –RI), PAD ili MS detektorom. Gasna hromatografija se takođe može primeniti za analizu šećera, ali zahteva derivatizaciju uzorka što može dovesti do nepotpune derivatizacije za neke šećere (Maness, 2010). PAD detektor je selektivniji i osetljiviji u poređenju sa RI detektorom, te se zbog toga od svih navedenih metoda najviše i primenjuje HPAEC sa PAD detektorom (Giannoccaro i saradnici, 2006). Kolone koje se koriste za analizu šećera uglavnom su pakovane kao katjon-izmenjivačke smole, dok se kao mobilne faze koriste voda i kombinacija acetonitrila i vode, kao i puferi. Najčešće korišćene kolone za analizu šećera su CarboPac[®] koje su jonoizmenjivačke, a kao mobilna faza koristi se vodeni rastvor natrijum-hidroksida koji ima visoku pH vrednost (alkalna sredina). Usled alkalne sredine, OH grupe na šećerima se deprotonuju pri čemu se stvara negativno naelektrisanje molekula ispitivanog šećera te se na taj način šećeri mogu određivati pomoću HPAEC (Maness, 2010).

3. Eksperimentalni deo

3.1. Hemikalije, standardi i reagensi

Standardi karotenoida (lutein, zeaksantin, β -karoten), tokoferola (α -T, γ -T, δ -T), tokotrienola (α -T3, γ -T3, δ -T3) i fenolnih kiselina (protokatehinska, *p*-kumarinska, kofeinska, cimeta, sinapinska i ferulinska kiselina) nabavljeni su od proizvođača *Sigma-Aldrich* (Minhen, Nemačka). Standardi šećera (arabinoza, glukoza, fruktoza, saharoza, izomaltoza, gentiobioza, trehaloza, turanoza, maltoza, rafinoza, izomaltotrioza, panoza i maltotrioza) i šećernog alkohola sorbitola bili su proizvodi kompanije *Tokyo Chemical Industry* (TCI, Tokio, Japan). Acetonitril, metanol, etanol, hlorovodonična kiselina (svi HPLC čistoće), DPPH^{*} (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) i TCA (trihlorsirćetna kiselina) su nabavljeni od *Sigma-Aldrich* kompanije (Minhen, Nemačka). Etil-acetat, mravlja kiselina, aceton i amonijum-acetat, svi HPLC čistoće, nabavljeni su od proizvođača *Fisher Scientific* (Lester, Engleska). TRIS (2-amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diol), *Folin-Ciocalteu* reagens i DTNB (2,2'-dinitro-5,5'-ditiobenzoeva kiselina) kupljeni su od firme *Merck* (Darmstadt, Nemačka). Apsolutni etanol, aceton, sirćetna kiselina, natrijum-acetat, svi *p.a.* čistoće, kupljeni su od firme Zorka (Šabac, Srbija). Ultračista voda, provodljivosti 0,055 μ S/cm, (TKA, Nemačka) korišćena je za pripremu odgovarajućih standardnih rastvora i uzoraka, dok su za filtriranje ekstrakata korišćeni Target2[®] špric-filtri (PTF membrana, 0,45 μ m, prečnik 17 mm).

3.2. Ogled u polju i biljni materijal

Ogled je postavljen na eksperimentalnom polju Instituta za kukuruz „Zemun Polje“ u toku dve vegetacione sezone, 2016. i 2017. godine. U ogledu su testirana četiri hibrida: ZP504su, ZP355su, ZP553su i ZP515su. Ogled je postavljen po slučajnom blok sistemu parcela, u tri ponavljanja. U okviru parcele, svaki hibrid je posejan u tri reda dužine 5 m koji se sastojao od po 10 kućica sa po 2 semena. Međuredno rastojanje bilo je 0,7 m dok je rastojanje između kućica bilo 0,5 m, a između elementarnih parcela 1,5 m. Setva je obavljena ručno, početkom aprila, u obe vegetacione sezone. Pre setve primenjene su standardne agrotehničke mere. Tokom jeseni 2015. i 2016. godine 100 kg/h neorganskog đubriva monoamonijum-fosfata (odnos azota (N) i fosfora (P) – 11% : 52%) je inkorporirano u zemljište. Tokom proleća 2016. i 2017. godine 250 kg/h i 200 kg/h uree je inkorporirano u zemljište.

U ogledu je ispitano pet tretmana:

- K - kontrola (bez primene herbicida i folijarnog đubriva (FĐ));
- M - mezotrion;
- N - nikosulfuron;
- M + FĐ – mezotrion + folijarno đubrivo;
- N + FĐ – nikosulfuron + folijarno đubrivo.

Primenjeni herbicidi i njihove doze prikazani su u Tabeli 1. Folijarno đubrivo (pH = 5), primenjeno je u preporučenoj dozi od 1,5 L/ha, a njegov sastav prikazan je u Tabeli 2. Ispitivani herbicidi, sa ili bez folijarnog đubriva, primenjeni su kada je kukuruz bio u fazi 5 - 6 razvijenih listova pomoću leđne prskalice Solo[®] (Nemačka) sa diznom TeeJet[®] XR11003, uz potrošnju vode od 250 L/ha.

Tabela 1. Primenjeni herbicidi i njihove koncentracije.

Aktivna supstanca	Preparat	Sadržaj aktivne komponente (g/L)	Količina primene aktivne supstance (g/ha)	Količina primene preparata (L/ha)
Mezotrion	Callisto [®] + 0,5% Atplus-463	480	120	0,25
Nikosulfuron	Motivell Extra 6 OD [®]	60	45	0,75

Tabela 2. Sastav primenjenog folijarnog đubriva.

	Organska supstanca	Ukupne amino kiseline	Slobodne L-amino kiseline	Azot (N)	Cink (Zn)	Mangan (Mn)	Bor (B)	Gvožđe (Fe)	Bakar (Cu)	Molibden (Mo)	Kobalt (Co)
%	40,0	10,0	8,0	5,0	0,75	0,75	0,10	0,10	0,10	0,02	0,01
g/L	500,8	125,2	100,2	62,6	9,4	9,4	1,3	1,3	1,3	0,3	0,1

Biljni materijal je uzorkovan (list kukuruza) u dve faze: 48 h (faza I) i 2 nedelje (faza II) nakon primene tretmana. Listovi su uzorkovani sa biljaka iz spoljnih redova, dok su biljke u srednjem redu ostavljene za merenje prinosa svežeg zrna. U toku same vegetacije kukuruza šećerca praćena je pojava svilanja. Pod pojmom svilanja podrazumeva se da u okviru parcele s pojedinim genotipom postoji 50% pojave svile što dalje ukazuje na momenat oplodnje. Stoga, 21 dan nakon pojave svilanja, u fazi tehnološke zrelosti, izvršena je ručna berba klipova (sredina jula za obe vegetacione sezone) (Slika 4). Prinos svežeg klipa očišćenog od komušine meren je po elementarnoj parceli i nakon toga preračunat u t/ha. Radi ispitivanja uticaja primenjenih tretmana, od svakog hibrida izabrano je po 10 klipova sa kojih su uzimana zrna. Klipovi su čuvani u zamrzivaču na -21 °C do izvođenja odgovarajućih analiza.

3.3. Meteorološki uslovi

Podaci o prosečnim temperaturama i ukupnim padavinama za vegetacionu sezonu 2016. i 2017. godinu preuzeti su iz meteorološke stanice Instituta za kukuruz „Zemun Polje“ i prikazani su u Tabeli 3. Tokom dvogodišnjeg poljskog oglada trend u meteorološkim uslovima bio je različit.



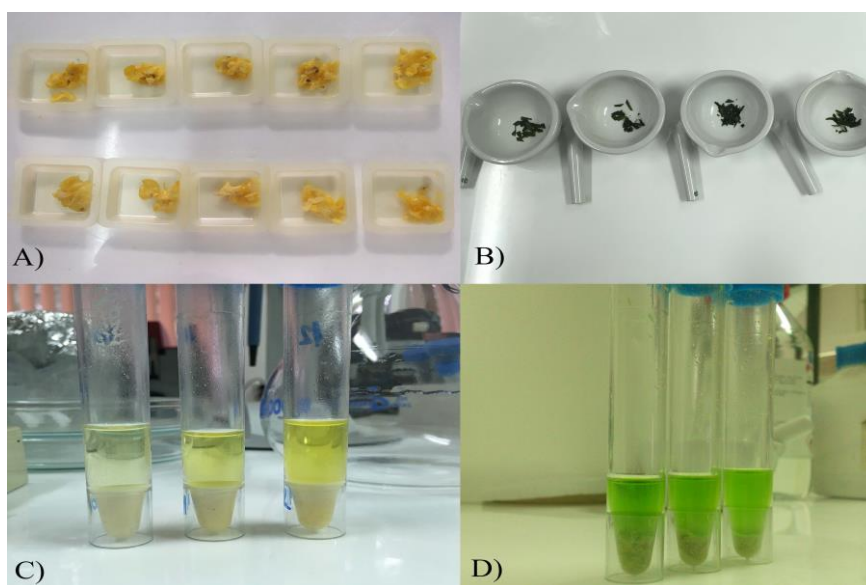
Slika 4. Primena tretmana (a), uzorkovanje lista u fazi I (b) i II (c) kao i berba klipova kukuruza šećerca (d).

Tabela 3. Prosečne mesečne temperature i padavine na lokaciji Zemun Polje u 2016. i 2017. godini.

		Mart	April	Maj	Jun	Jul	Avgust	Prosek/ Ukupno
Prosečna temperatura (°C)	2016	8,8	15,3	17,6	23,0	24,2	22,3	18,5
	2017	11,0	12,4	18,6	24,4	25,5	25,8	19,6
Ukupne padavine (mm)	2016	71,1	51,9	47,4	107,4	33,6	43,2	413,7
	2017	21,3	47,1	49,2	39,0	26,7	23,7	241,5

3.4. Priprema biljnog materijala za analizu

Za hromatografske analize korišćeni su sveži uzorci listova i zrna (Slika 5). Sveži listovi iz faza I i II, nakon merenja i usitnjavanja pomoću makaza, prenošeni su u porcelanski avan, gde je biljno tkivo pomoću tučka dodatno usitnjeno i razoreno. Zatim je dodavan 1 mL ekstrakcionog sredstva. Još 1 mL odgovarajućeg ekstrakcionog sredstva je dodavan u avan kako bi se osiguralo kvantitativno prenošenje uzorka u kivetu, a zatim je kiveta dopunjena ekstrakcionim sredstvom do odgovarajuće zapremine. Sveže zrno kukuruza je skidano sa klipa (nakon odmrzavanja, 5 h na sobnoj temperaturi) i samo neoštećena zrna su korišćena za analizu. Nakon merenja, zrno je seckano pomoću skalpela na staklenoj podlozi i sa svim svojim mlečnim sokom prenošeno u plastičnu kivetu. Zatim je dodavano odgovarajuće ekstrakciono sredstvo.



Slika 5. Sveži uzorci zrna (a), lista (b) i ekstrakti (c i d) pripremljeni za hromatografske analize.

Za spektrofotometrijske analize bili su potrebni uzorci osušenih listova i zrna kukuruza. Shodno tome, jedan deo svežih listova sušen je na temperaturi od 40 °C u ventilacionoj sušnici u periodu od 8 h i 15 h za fazu I i II, respektivno. Takođe, jedan deo svežeg zrna sušen je u ventilacionoj sušnici na temperaturi od 35 °C u trajanju od 12 h. Osušeni uzorci listova i zrna su samleveni u brašno, veličine čestica od 500 µm, na laboratorisjkom mlinu 120, proizvođača Perten (Štoholm, Švedska). Uzorak lista i zrna (u obliku brašna) nakon merenja, prenošen je u plastičnu kivetu uz dodavanje odgovarajućeg ekstrakcionog sredstva. Ukoliko je ekstrakcija ponavljana, nakon centrifugiranja i dekantovanja supernatanta, nova količina ekstrakcionog sredstva je dodavana i postupak ekstrakcije ponovljen. Sve ekstrakcije su vršene na sobnoj temperaturi i centrifugiranja su bila na 3000 rpm u trajanju od 10 min.

3.5. Sadržaj vlage u uzorcima

U cilju uniformnog prikazivanja rezultata, tj. preračunavanja sadržaja ispitivanih fitohemikalija po suvoj masi zrna, jedan deo svežeg zrna i ujedno jedan deo zrna osušenog na 35 °C, sušen je na temperaturi od 105 °C u vremenskom periodu od 6 h i 3 h, respektivno. Uzorci lista su sušeni za spektrofotometrijske analize (Odeljak 3.7.) i na osnovu dobijene suve mase izvršeno je preračunavanje sadržaja fitohemikalija. U Tabeli 4. prikazan je sadržaj vlage (%) u uzorcima lista i zrna.

3.6. Metode za ekstrakciju fitohemikalija za hromatografske analize

3.6.1. Ekstrakcija karotenoida iz svežeg lista i zrna

U cilju ekstrahovanja karotenoida iz svežeg lista u fazi I i II nakon primenjenih tretmana, korišćen je postupak ekstrakcije koji je opisan u radu Safawo i saradnika (2010). Odmereno je približno 1 g svežeg lista i kao ekstrakciono sredstvo korišćen je hladan aceton (čuvan u frižideru 2 h pre analiza). Postupak ekstrakcije na vertikalnom šejkeru u trajanju od 30 minuta, ponovljen je dva puta (2×25 mL) nakon čega su obe frakcije istog uzorka spojene.

Ekstrakcija karotenoida iz svežeg zrna kukuruza šećerca izvedena je po postupku koji su opisali Rivera i saradnici (2012). Odmereno je približno 5 g svežeg zrna, a smeša MeOH/EtOAc (6:4, v/v) korišćena je kao ekstrakciono sredstvo. Nakon ekstrakcije (2×25 mL) u ultrazvučnom kupatilu (30 min), obe frakcije istog uzorka su spojene, centrifugirane i uparene do suva u struji azota. Ostatak nakon uparavanja rastvoren je u mobilnoj fazi (2 mL).

3.6.2. Ekstrakcija vitamina E iz svežeg zrna

Metodu koja je korišćena za ekstrahovanje tokoferola i tokotrienola iz svežeg zrna su opisali Gliszczyńska-Swigło i Sikorska (2004). Odmereno je približno 3 g svežeg zrna i dodato 30 mL *i*PrOH koji je upotrebljen kao ekstrakciono sredstvo. Nakon ekstrakcije u ultrazvučnom kupatilu (45 min), ekstrakt je centrifugiran.

3.6.3. Ekstrakcija slobodnih fenolnih kiselina iz svežeg lista i zrna

Postupak koji su opisali Dewanto i saradnici (2002) korišćen je za ekstrakciju slobodnih fenolnih kiselina iz svežeg lista i zrna. Nakon odmeravanja približno 2 g uzorka svežeg lista iz faze I i II ekstrakcija je vršena smešom MeOH/H₂O (8:2, v/v). Postupak ekstrakcije je ponovljen dva puta (2×10 mL) u ultrazvučnom kupatilu u trajanju od 45 min. Nakon spajanja, frakcije istog uzorka su centrifugirane. Za ekstrakciju slobodnih kiselina iz zrna odmereno je približno 10 g svežeg zrna i ekstrakcija je vršena istom smešom rastvarača. Postupak ekstrakcije je ponovljen dva puta (2×25 mL) u ultrazvučnom kupatilu u trajanju od 45 min. Obe frakcije istog uzorka su spojene, centrifugirane i uparene skoro do suva u struji azota. Ostatak nakon uparavanja je rastvoren u mobilnoj fazi (2 mL).

3.6.4. Ekstrakcija šećera iz svežeg zrna

Metoda za ekstrahovanje šećera iz zrna kukuruza bila je identična onoj koju su predložili Schmitzer i saradnici (2011). Odmereno je približno 5 g svežeg zrna i dodato je 50 mL ultračiste vode koja je upotrebljena kao ekstrakciono sredstvo. Postupak ekstrakcije, u ultrazvučnom kupatilu, trajao je 1 h. Nakon centrifugiranja, 1 mL supernatanta razblažen je deset puta ultračistom vodom.

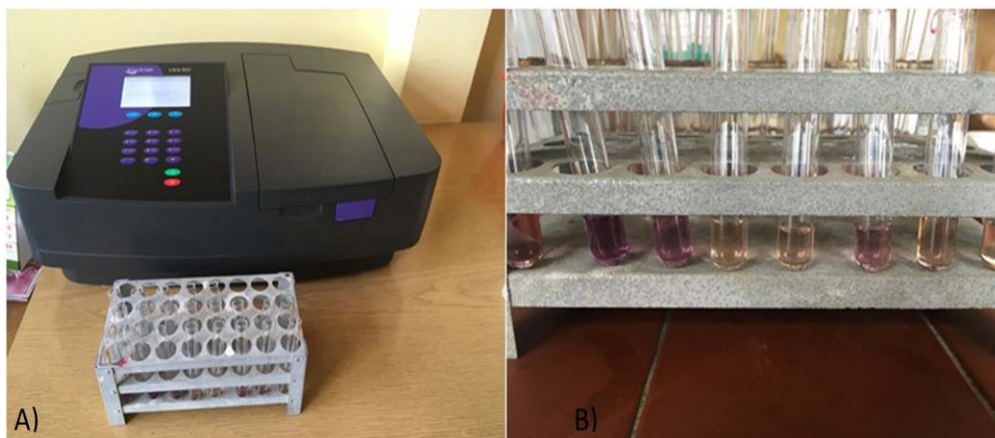
Tabela 4. Sadržaj vlage u uzorcima lista i zrna na različitim temperaturama.

		% Vlaga									
		K		M		Zrno N		M + FĐ		N + FĐ	
		2016	2017	2016	2017	2016	2017	2016	2017	2016	2017
ZP504 _{su}	sveže -105 °C	66,58	64,70	62,71	62,02	61,16	60,71	63,34	61,68	65,13	63,54
	35 °C -105 °C	8,74	7,73	6,79	7,65	6,15	7,67	6,08	7,96	8,25	8,36
ZP355 _{su}	sveže -105 °C	70,48	67,05	68,06	63,19	60,44	66,64	65,89	69,39	64,13	64,48
	35 °C -105 °C	8,70	8,31	8,33	8,24	7,87	8,42	8,31	9,13	8,26	8,85
ZP553 _{su}	sveže -105 °C	62,14	62,88	69,66	64,03	68,53	63,89	67,53	61,25	62,05	56,91
	35 °C -105 °C	7,96	8,21	7,92	7,84	7,36	8,51	8,08	8,41	7,58	8,42
ZP515 _{su}	sveže -105 °C	67,28	61,26	61,54	62,40	60,75	63,14	61,08	63,55	65,81	61,76
	35 °C -105 °C	6,57	8,20	6,56	7,55	7,83	9,38	7,90	7,96	6,41	8,95

		List									
		K		M		N		M + FĐ		N + FĐ	
		2016	2017	2016	2017	2016	2017	2016	2017	2016	2017
ZP504 _{su}	I faza	9,60	12,31	11,28	12,81	10,90	12,41	10,91	11,65	11,35	12,64
	II faza	11,84	11,09	12,06	11,01	11,82	10,34	11,41	11,13	11,79	10,88
ZP355 _{su}	I faza	9,38	12,20	11,23	13,14	11,07	12,16	10,80	11,92	10,98	13,55
	II faza	11,00	11,99	11,00	11,08	10,55	11,98	11,05	11,47	10,78	12,33
ZP553 _{su}	I faza	11,33	12,53	12,12	12,95	11,49	13,94	10,34	13,20	11,62	13,76
	II faza	11,90	10,93	11,25	12,27	11,39	10,38	11,42	8,97	10,74	10,49
ZP515 _{su}	I faza	10,93	12,06	10,86	11,61	11,90	13,81	11,16	13,84	10,61	13,16
	II faza	12,66	10,89	11,37	11,01	10,49	12,99	11,61	11,19	12,44	10,54

3.7. Spektrofotometrijske analize lista i zrna

Sve analize koje se zasnivaju na merenju/praćenju apsorbancije uzoraka: određivanje sadržaja ukupnih polifenola (*Total Phenolic Content - TPC*), određivanje ukupne antioksidativne aktivnosti (*Radical Scavenging Activity - RSA*) i određivanje sadržaja ukupnog glutationa (GSH) urađene su na UV-VIS spektrofotometru Libra S22 proizvođača Biochrom (Engleska) (Slika 6). Za analize su korišćeni uzorci listova i zrna osušenih na 40 °C i 35 °C, respektivno. Sve analize su vršene u četiri ponavljanja a rezultati prikazani kao srednja vrednost \pm standardna devijacija.



Slika 6. Izgled korišćenog spektrofotometra (a) i reakcija praćenja antioksidativne aktivnosti zrna (b).

3.7.1. Određivanje sadržaja ukupnih polifenola

Određivanje sadržaja ukupnih polifenola u listu i zrnu je izvršeno po postupku koji su opisali Singleton i saradnici (1999). Približno 0,3 g uzorka lista i zrna ekstrahovano je sa 10 mL smeše aceton/voda (7:3, v/v) na vertikalnom šejkeru, u trajanju od 30 min. Nakon centrifugiranja, supernatant je dekantovan i dalje je korišćen za određivanje sadržaja ukupnih polifenola i određivanje ukupne antioksidativne aktivnosti. Alikvot supernatanta (0,2 mL) pomešan je sa 0,5 mL destilovane vode. Nakon dodavanja 0,25 mL *Folin-Ciocalteu* reagensa (2 M u odnosu na kiselinu) i 1,25 mL Na_2CO_3 (20%) kivete su snažno promućkane i ostavljene u mraku u periodu od 40 min. Nakon toga, apsorbancija plavo obojene smeše merena je na 725 nm naspram slepe probe koja je umesto uzorka sadržavala 0,2 mL destilovane vode. Za konstrukciju kalibracione krive korišćeni su standardni rastvori ferulinske kiseline u rasponu koncentracija od 1 do 10 mg/L (1; 2; 4; 6; 8; 10 mg/L). Kalibraciona kriva je dobijena u MS Excel programu predstavljanjem intenziteta apsorbancije u zavisnosti od koncentracije rastvora ferulinske kiseline. Sadržaj ukupnih fenola izražen je kao mg ekvivalenta ferulinske kiseline (EFK) po g suve mase (s.m.) uzorka lista ili zrna.

3.7.2. Određivanje ukupne antioksidativne aktivnosti

Ukupna antioksidativna aktivnost uzorka lista i zrna određena je metodom koju su primenili Abe i saradnici (1998). Alikvot supernatanta (0,3 mL) čiji je postupak dobijanja naveden u Odeljku 3.5.1. pomešan je sa 0,25 mL DPPH' reagensa (0,5 mM), i 0,5 mL acetatnog pufera (100 mM, pH = 5). Nakon stajanja smeše u trajanju od 30 min u mraku, apsorbancija je merena na 517 nm naspram slepe probe koja je umesto uzorka sadržavala 0,3 mL apsolutnog etanola. Relativna antioksidativna aktivnost (RAA) uzorka izračunata je kao procenat izreagovalog DPPH' reagensa, pomoću jednačine 2:

$$RAA(\%) = \frac{(A_{DPPH} - A_{UZORAK})}{A_{DPPH}} \times 100 \quad (2)$$

gde je A_{DPPH} apsorbanacija rastvora $DPPH^*$ (slepa proba), dok je A_{UZORAK} apsorbanacija uzorka lista ili zrna.

Za konstrukciju kalibracione krive korišćen je etanolni rastvor troloksa u rasponu koncentracija od 1 do 40 $\mu\text{mol/L}$ (1; 5; 10; 20; 30; 40 $\mu\text{mol/L}$). Kalibraciona kriva je dobijena u MS Excel programu predstavljanjem RAA (%) u zavisnosti od koncentracije rastvora troloksa. Relativna antioksidativna aktivnost izražena je kao μmol ekvivalenta troloksa (ET) po g suve mase uzorka lista ili zrna.

3.7.3. Određivanje sadržaja ukupnog glutaciona

Postupak za određivanje sadržaja ukupnog glutaciona (GSH) iz uzoraka lista i zrna opisali su u svom radu Sari-Gorla i saradnici (1993). Približno 0,3 g uzorka lista i zrna ekstrahovano je sa 8 mL destilovane vode i 8 mL rastvora TCA (5%), respektivno, na vertikalnom šejkeru u trajanju od 30 min. Nakon centrifugiranja, alikvot odgovarajućeg supernatanta (0,5 mL) pomešan je sa 0,5 mL destilovane vode. Zatim je dodat 1 mL reagensa koji sadrži 0,1 M TRIS (pH = 7) i 1,5 mM DTNB. Nakon centrifugiranja smeše, apsorbanacija je očitana na 412 nm naspram slepe probe koja je umesto uzorka sadržavala 0,5 mL destilovane vode, odnosno 5% TCA. Sadržaj ukupnog glutaciona je izračunat na osnovu izmerenih vrednosti apsorbanacija uzoraka i molarog apsorpcionog koeficijenta $1,36 \times 10^4 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ na 412 nm (Anderson i Ng, 2000) i izražen je kao nmol/g s.m. uzorka.

3.8. Analiza fitohemikalija primenom tečne hromatografije

Visoko-efikasna tečna hromatografija primenom sistema *Dionex Ultimate 3000* (Thermo Scientific) je korišćena za identifikaciju i kvantifikaciju jedinjenja od interesa (Slika 7). Sistem za tečnu hromatografiju je bio opremljen kvaternarnom pumpom (LPG-3400), autosemplerom (WPS-300SL), DAD i FLD detektorom. Sveže dobijeni ekstrakti su pre injektovanja u hromatografski sistem profiltrirani kroz 0,45 μm filter direktno u HPLC vialu (Slika 7). Sve analize su vršene u tri ponavljanja i rezultat je prikazan kao srednja vrednost \pm standardna devijacija. Sadržaj svih fitohemikalija je preračunat na suhu masu radi lakšeg i uniformnog tumačenja rezultata.

3.8.1. Kvantifikacija karotenoida

Hromatografsko razdvajanje karotenoida (lutein, zeaksantin i β -karoten) u ekstraktu lista i zrna izvršeno je na Hypersil GOLD[®] C18 koloni, dimenzija 150 \times 4,6 mm, veličine čestica 3 μm (Thermo Fisher Scientific). Smeša acetonitrila i metanola (8:2, v/v) u izokratskom programu pri protoku od 0,7 mL/min, korišćena je kao mobilna faza za razdvajanje karotenoida u ekstraktu zrna. Smeša acetonitrila i metanola (6:4, v/v) u izokratskom programu pri protoku od 0,6 mL/min, korišćena je kao mobilna faza za razdvajanje karotenoida u ekstraktu lista. Analiza je trajala 20 min, a kolona je termostatirana na 25 °C. Injekciona zapremina ekstrakta lista i zrna iznosila je 50 μL i 100 μL , respektivno, dok su talasne dužine na DAD detektoru bile podešene na 450 nm i 472 nm.

Početne koncentracije standardnih rastvora luteina i zeaksantina bile su 100 mg/L, a β -karotena 1000 mg/L. Serija od sedam standardnih rastvora dobijena je razblaživanjem standardnih rastvora do krajnje koncentracije od 0,10 do 10,00 mg/L, za lutein i zeaksantin (0,10; 0,50; 1,00; 3,00; 5,00; 7,00; 10,00 mg/L) i koncentracije od 0,01 do 0,50 mg/L za β -karoten (0,01; 0,02; 0,05; 0,07; 0,10; 0,20; 0,50 mg/L).

Druga serija od sedam standardnih rastvora dobijena je razblaživanjem standardnih rastvora do krajnje koncentracije od 10,0 – 70,0 mg/L za ispitivane karotenoide (10,0; 20,0; 30,0; 40,0; 50,0; 60,0 i 70,0 mg/L). Svi pripremljeni rastvori čuvani su u zamrzivaču, na temperaturi od -21 °C. Kalibracione krive konstruisane su kao zavisnost površine pika (odgovor detektora) prema datoj koncentraciji standarda.

3.8.2. Kvantifikacija tokoferola i tokotrienola

Hromatografsko razdvajanje tokoferola i tokotrienola (α -T, β + γ -T, δ -T, α -T3, β + γ -T3 i δ -T3) u ekstraktu zrna izvršeno je na Hypersil GOLD aQ[®] C18 koloni, dimenzija 150 × 3 mm, veličine čestica 3 μ m (Thermo Fisher Scientific). Kao mobilna faza korišćena je smeša metanola i 10 mM amonijum-acetata (97:3, v/v) u izokratskom programu pri protoku od 0,4 mL/min. Analiza je trajala 15 min na koloni termostatiranoj na 30 °C. Injekciona zapremina ekstrakta bila je 5 μ L. U cilju detekcije tokoferola i tokotrienola na fluorescentnom detektoru talasne dužine za ekscitaciju (λ_{em}) i emisiju (λ_{ex}) bile su podešene su na 290 nm i 325 nm, redom.

Početne koncentracije standardnih rastvora α -T, δ -T, α -T3, i δ -T3 bile su 1000 mg/L, dok su koncentracije standardnih rastvora γ -T i γ -T3 bile 500 mg/L. Serija od sedam standardnih rastvora dobijena je razblaživanjem standardnih rastvora do krajnje koncentracije od 0,01 do 1,00 mg/L, za α -T, δ -T, α -T3, i δ -T3 (0,01; 0,02; 0,05; 0,10; 0,20; 0,50; 1,00 mg/L) i koncentracije od 0, 10 do 10,00 mg/L za γ -T i γ -T3 (0,10; 0,20; 0,50; 1,00; 2,00; 5,00; 10,00 mg/L). Svi pripremljeni rastvori čuvani su u zamrzivaču na temperaturi od -21 °C. Kalibracione krive konstruisane su kao zavisnost površine pika (odgovor detektora) prema datoj koncentraciji standarda.

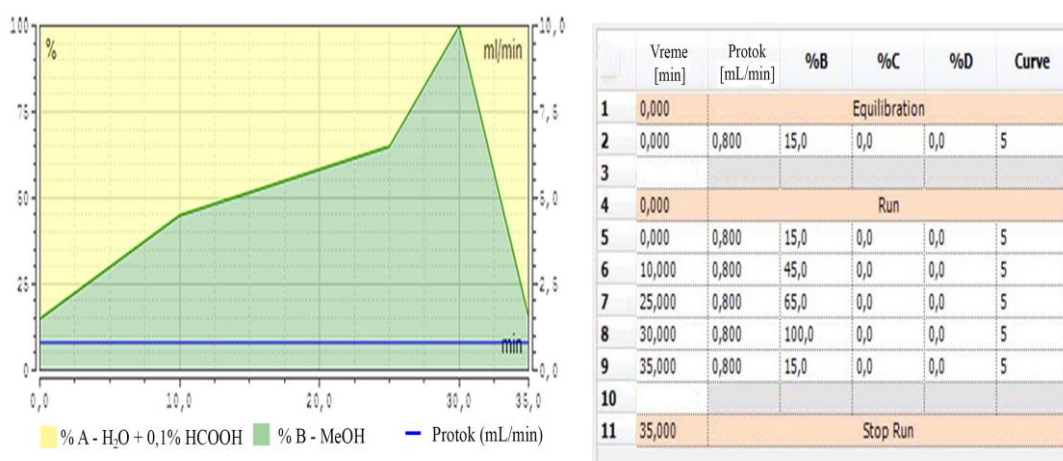


Slika 7. Izgled korišćenog HPLC aparata (a), autosemplera (b), filtriranje uzoraka (c) i pripremljeni filtrati lista i zrna (d).

3.8.3. Kvantifikacija fenolnih kiselina

Hromatografsko razdvajanje slobodnih fenolnih kiselina izvršeno je na Acclaim PolarAdvantage II[®] C18 koloni, dimenzija 150 × 4,6 mm, veličine čestica 3 μm (Thermo Fisher Scientific). Kao mobilna faza (protok 0,8 mL/min) korišćena je smeša vode + 0,1 % HCOOH (A) i metanola (B) u gradijentnom programu koncentracija: 0,0 – 10,0 min, 15 – 45% B; 10,0 – 25,0 min, 45 – 65% B; 25,0 – 30,0 min, 65 – 100% B 30,0 - 35,0 min, 100 – 15% B (Slika 8). Kolona je termostatirana na 25 °C. Injekciona zapremina za ekstrakt lista i zrna bila je 5 μL i 10 μL, respektivno. U cilju detekcije fenolnih kiselina talasne dužine na DAD detektoru su podešene na 278, 260, 290 i 320 nm.

Početne koncentracije standardnih rastvora fenolnih kiselina bile su 100 mg/L. Serija od sedam standardnih rastvora dobijena je razblaživanjem standardnih rastvora do krajnje koncentracije od 0,01 do 5,00 mg/L za ispitivane kiseline (0;01; 0,05; 0,10; 0,50; 1,00; 2,50; 5,00 mg/L). Svi pripremljeni rastvori čuvani su u zamrzivaču, na temperaturi od -21 °C. Kalibracione krive konstruisane su kao zavisnost površine pika (odgovor detektora) prema datoj koncentraciji standarda.



Slika 8. Grafički i tabelarni prikazi gradijentnog programa mobilnih faza korišćenih za eluiranje slobodnih fenolnih kiselina u uzorcima.

3.8.4. Parametri validacije primenjenih HPLC metoda

Tokom hromatografskih analiza za kontrolu rada samog instrumenta, prikupljanje kao i analizu podataka korišćen je softverski paket Chromeleon (verzija 7.2). Identifikacija je vršena poređenjem retencinog vremena (t_R) analizirane komponente sa t_R odgovarajućeg standarda, a za kvantitativna preračunavanja su korišćene konstruisane kalibracione krive.

Granica detekcije - GD (Limit of detection - LOD) i granica kvantifikacije - GK (limit of quantification – LOQ) za svaku primenjenu metodu izračunate su pomoću jednačina 3 i 4:

$$GD = 3 \frac{SD}{b} \quad (3)$$

$$GK = 10 \frac{SD}{b} \quad (4)$$

gde je b nagib kalibracione prave dobijen linearnom regresijom, dok je SD standardna devijacija kalibracionog modela.

U cilju određivanja efikasnosti primenjene metode (*recovery* - R) (jednačina 5) nasumično odabranom uzorku dodat je rastvor odgovarajućeg standarda tačno poznate koncentracije (0,01 mg/L (nivo 1); 0,1 mg/L (nivo2) i 1 mg/L (nivo 3)), u tri ponavljanja.

$$R(\%) = \frac{F}{F_0 + A} \times 100 \quad (5)$$

gde, F predstavlja koncentraciju jedinjenja od interesa u uzorku nakon dodavanja standarda, F_0 je koncentracija jedinjenja od interesa u uzorku pre dodavanja standarda i A je koncentracija dodatog standarda.

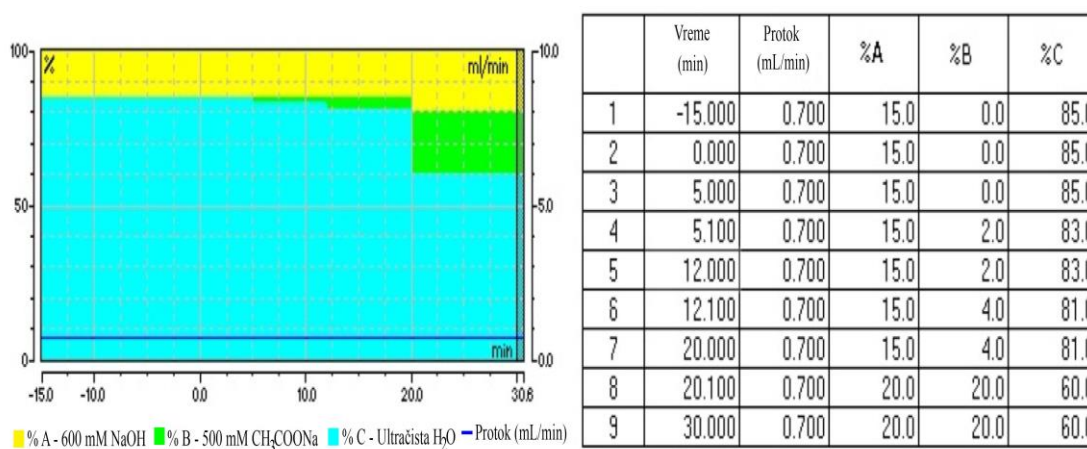
Regresioni parametri, koeficijent determinacije (R^2), granica detekcije i kvantifikacije i efikasnost metoda prikazani su u Tabeli 5.

Tabela 5. Regresioni parametri, koeficijent determinacije (R^2), retenciono vreme, granica detekcije i kvantifikacije i efikasnost primenjenih metoda

Vitamin E	t_R	a	b	R^2	GD (ng/mL)	GK (ng/mL)	Nivo 1	R, % Nivo 2	Nivo 3
δ -T3	3,94	-4,78	888,98	0,9998	39,72	132,38	102,13	92,09	110,13
$\beta+\gamma$ -T3	4,34	-12,55	708,16	0,9998	38,53	128,44	100,86	107,62	102,09
α -T3	4,76	-4,02	260,20	0,9998	36,97	123,22	102,56	99,51	111,98
δ -T	5,52	0,13	414,00	0,9997	21,66	72,21	96,57	105,93	101,25
$\beta+\gamma$ -T	6,23	1,01	538,75	0,9999	25,84	86,12	99,28	97,10	105,24
α -T	7,02	-0,63	421,42	0,9992	33,93	113,11	110,61	95,84	101,80
Karotenoidi		$y = a + bx (\times 10^2)$							
L+ Z zrno	4,45	-23,02	1936,91	0,9990	49,32	164,39	116,56	102,04	104,01
β -Karoten zrno	17,02	0,30	388,67	0,9979	55,06	183,53	98,94	108,07	105,92
L+ Z list	4,65	12,66	929,68	0,9985	78,41	261,36	100,12	111,32	102,93
β -Karoten list	17,63	1,80	388,60	0,9953	65,20	217,32	94,91	97,66	108,32
Fenolne kiseline		$y = a + bx (\times 10^2)$							
Protokatehinska	9,96	0,67	60,29	0,9999	60,40	201,34	106,06	99,51	111,07
Kofeinska	12,68	-2,15	121,94	0,9993	79,84	266,14	109,90	97,50	109,81
Sinapinska	14,09	0,29	110,55	0,9999	23,07	76,88	98,94	104,08	115,66
<i>p</i> -Kumarinska	16,20	0,97	118,19	0,9995	53,54	178,47	109,86	105,90	106,88
Ferulinska	17,94	-0,29	141,60	0,9997	52,88	176,26	92,56	94,01	107,46
Cimetna	21,63	1,78	186,94	0,9998	68,86	229,54	99,69	92,93	100,73

3.9. Kvantifikacija šećera u zrnu primenom jonske hromatografije

Primenom visoko-efikasne jonoizmenjivačke hromatografije na sistemu ICS 3000 (Thermo Scientific), izvršena je identifikacija i kvantifikacija šećera u ekstraktu zrna kukuruza šećerca. Hromatografski sistem je bio opremljen kvaternarnom pumpom, autosemplerom (ICS AS-DV 50) i PAD detektorom: elektrohemijaska ćelija sa podesivim potencijalom, Au radna i Ag/AgCl referentna elektroda. Hromatografsko razdvajanje šećera u ekstraktu zrna izvršeno je na CarboPac PA100[®] koloni, dimenzija 250 × 4 mm, veličine čestica 8,5 μm (Thermo Fisher Scientific). Kao mobilna faza (protok 0,7 mL/min) korišćena je smeša 600 mM NaOH (A), 500 mM CH₃COONa Ac (B) i ultračista voda (C) u sledećem gradijentnom programu koncentracija: 0,0 – 5,0 min, 15 % A, 85 % C; 5,0 – 5,1 min, 15 % A, 2 % B, 83 % C; 5,1 – 12,0 min, 15 % A, 2 % B, 83 % C; 12,0 – 12,1 min, 15 % A, 4 % B, 81 % C; 12,1 – 20,0 min 15 % A, 4 % B, 81 % C; 20,0 – 20,1 min 20 % A, 20 % B, 60 % C; 20,1–35,0 min 20 % A, 20 % B, 60 % C (Slika 9).



Slika 9. Grafički i tabelarni prikaz gradijentnog programa mobilnih faza korišćenih za eluiranje šećera u uzorcima.

Početne koncentracije standardnih rastvora glukoze, fruktoze i saharoze bile su 1000 mg/L, a ostalih testiranih šećera i sorbitola iznosile su 100 mg/L. Serija od sedam standardnih rastvora dobijena je razblaživanjem standardnih rastvora na krajnje koncentracije od 1,00 do 25 mg/L za glukozu, fruktozu, saharozu (1,00; 2,00; 5,00; 10,00; 15,00; 20,00; 25,00 mg/L) i koncentracije od 0,05 do 5,00 mg/L za ostale šećere i sorbitol (0,05; 0,10; 0, 25; 0,50; 1,00; 2,50; 5,00 mg/L). Svi pripremljeni rastvori čuvani su u zamrzivaču na temperaturi od -21 °C.

Kalibracione krive konstruisane su kao zavisnost površine pika (odgovor detektora) prema datoj koncentraciji standarda. Regresioni parametri, koeficijent determinacije (R^2), granica detekcije i kvantifikacije i efikasnost metode prikazani su u Tabeli 6.

Tabela 6. Koeficijent determinacije (R^2), retenciono vreme, granica detekcije i kvantifikacije i efikasnost primenjene metode za određivanje šećera.

	t_R	GD (ng/mL)	GK (ng/mL)	R^2	R, %		
					Nivo 1	Nivo 2	Nivo3
Sorbitol	2,88	189,20	567,16	0,9983	102,21	109,87	95,68
Trehaloza	3,51	108,20	325,79	0,9981	97,49	102,83	93,27
Arabinoza	4,22	193,23	579,12	0,9974	98,51	96,91	101,23
Glukoza	5,62	56,77	168,55	0,9990	103,55	110,74	97,50
Fruktoza	6,97	78,68	238,45	0,9997	104,32	106,42	103,33
Saharoza	10,07	85,24	255,88	0,9981	99,25	89,37	110,25
Turanoza	13,00	41,15	135,35	0,9987	97,41	108,25	87,71
Izomaltoza	8,22	116,98	348,54	0,9967	106,14	99,13	93,23
Izomaltotrioza	16,54	213,10	702,92	0,9969	94,98	97,89	93,21
Maltoza	17,34	99,85	297,35	0,9979	110,07	101,58	94,23
Maltotrioza	26,77	144,75	478,47	0,9981	96,15	98,66	94,76
Gentiobioza	12,28	48,79	158,47	0,9986	97,66	102,85	93,59
Panoza	20,37	83,46	249,56	0,9982	96,16	105,49	87,95
Rafinoza	19,56	144,28	432,45	0,9993	98,94	102,01	106,20

3.10. Statistička obrada podataka

Dobijene vrednosti prinosa i sadržaja fitohemikalija u zrnu nakon odgovarajućih tretmana tokom dve godine, obrađeni su primenom trofaktorske analize varijanse (*Analysis of Variance – ANOVA*) prema planu slučajnog blok sistema korišćenjem softverskog paketa M-STAT-C (Michigan State University, 1989). Slično, za dobijene podatke iz lista kukuruza primenjena je četvorofaktorska analiza varijanse prema planu slučajnog blok sistema. U cilju definisanja statistički značajne razlike između testiranih hibrida, primenjenih tretmana, kao i njihovih interakcija tokom dve godine, za uzorke zrna izračunata je najmanja značajna razlika (Fisher's least significant difference (LSD)) pri nivou poverenja od 0,95 ($p \leq 0,05$). Za utvrđivanje statistički značajne razlike između testiranih hibrida, primenjenih tretmana, kao i njihovih interakcija tokom dve godine, u listu, korišćena je značajna razlika (Tukey honestly significant difference – HSD) pri nivou pouzdanosti od 0,95 ($p \leq 0,05$). Za određivanje koeficijenta korelacije između određenih ispitivanih parametara korišćen je MS Excel (Microsoft Office 2007 Profesional). Prikazani su Pearson-ovi koeficijenti korelacije pri nivou poverenja od 0,95 ($p \leq 0,05$).

Analiza glavnih komponentata je izvedena pomoću PLS Toolbox paketa (demo verzija 5,7; Eigenvectors, Inc.) koji je sastavni deo statističkog programa MATLAB (verzija 7.4.0.287; R2007a; MathWorks, Inc., USA). Pre bilo kakve statističke obrade rezultata svi parametri su autoskalirani (centrirani i skalirani na jediničnu vrednost standardne devijacije). Ovim postupkom ispitivani parametri postaju uporedivi jer se sprečava preovladavanje komponentata prisutnih u većim količinama nad komponentama prisutnim u znatno manjim količinama. Klusterska analiza je izvedena kao dodatak PCA metodi u cilju jednostavnijeg načina prikaza i kao pomoć u tumačenju rezultata dobijenih PCA metodom.

4. Rezultati

4.1. Fitohemikalije u listu kukuruza

Analiza varijanse pokazala je da su hibrid (H), godina (G), faza (F) i tretman (T) kao i njihove interakcije ($G \times H$; $G \times F$; $H \times F$; $G \times H \times F$; $G \times T$; $H \times T$; $G \times H \times T$; $F \times T$; $G \times F \times T$; $H \times F \times T$; $G \times H \times F \times T$) imale statistički značajan uticaj ($p \leq 0,05$) na promene u sadržaju ispitivanih fitohemikalija (karotenoidi, slobodne fenolne kiseline, TPC, GSH i DPPH') tokom obe faze u listu četiri hibrida zrna kukuruza šećerca (Prilog 1). Sadržaj ispitivanih fitohemikalija u obe faze u listu varirao je u zavisnosti kako od primenjenog tretmana tako i od vegetacione sezone. Shodno tome, radi bolje preglednosti rezultata, prokomentarisani će biti samo oni hibridi kod kojih je tokom obe godine zabeležen isti statistički značajan trend (povećanje ili smanjenje sadržaja fitohemikalija) nakon primenjenog tretmana u poređenju sa kontrolom ili u poređenju sa čistim herbicidom (kada se posmatra kombinacija herbicida i folijarnog đubriva). Takođe, radi jasnijeg prikazivanja rezultata u tabelama, u ovom odeljku, prikazan je samo sadržaj ispitivanih fitohemikalija bez Tukey HSD značajne razlike. Tabele sa sadržajem fitohemikalijama i značajnom razlikom (Tukey HSD) pri nivou pouzdanosti od 0,95 ($p \leq 0,05$) između posmatranih parametara za interakciju $G \times H \times F \times T$ nalazi se u Prilogu 2.

4.1.1. Sadržaj karotenoida

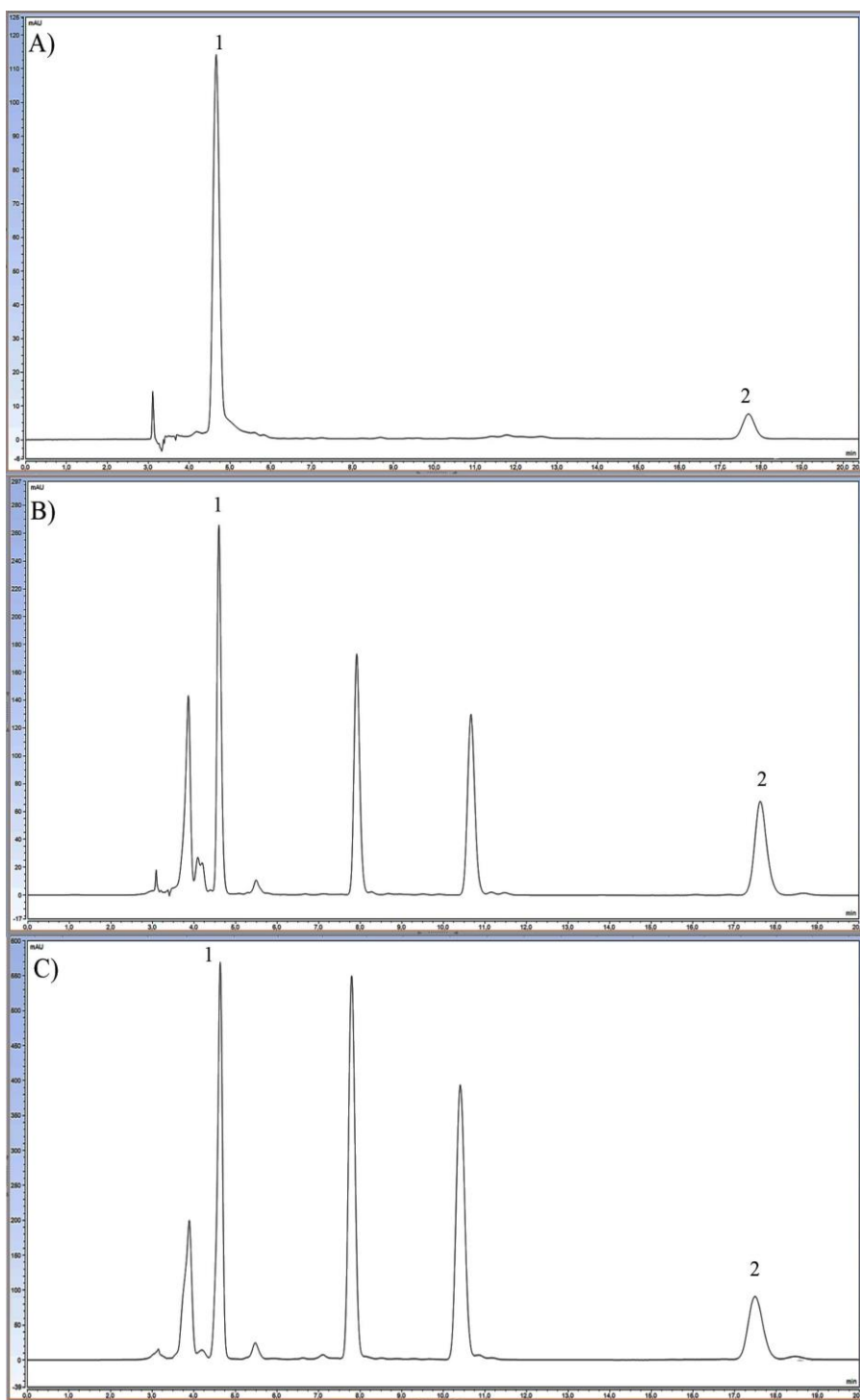
Sadržaj ispitivanih karotenoida nakon svih primenjenih tretmana u toku obe godine prikazan je u Tabeli 7, a hromatogram na Slici 10. Sadržaj ispitivanih karotenoida u kontrolnim uzorcima u obe faze, bio je uglavnom veći u 2017. u poređenju sa 2016. godinom. Najveći sadržaj luteina i zeaksantina (L + Z) u kontrolnim uzorcima, u fazi I zabeležen je kod hibrida ZP355su (1,70 mg/100 g s.m. i 2,10 mg/100 g s.m., redom). U fazi II najveći sadržaj L + Z zabeležen je kod hibrida ZP504su (1,85 mg/100 g s.m. i 3,13 mg/100 g s.m.). U fazi I najveći sadržaj β -karotena zabeležen je kod ZP515su (0,37 mg/100 g s.m.) u 2016. i kod ZP355su (0,63 mg/100 g s.m.) u 2017. Slično, u fazi II najveći sadržaj β -karotena zabeležen je kod ZP504su (0,70 mg/100 g s.m.) u 2016. i kod ZP553su (0,69 mg/100g s.m.) tokom 2017. godine.

4.1.1.1. Sadržaj karotenoida nakon primene herbicida

Mezotrion je ispoljio značajno pozitivan efekat na povećanje sadržaja L + Z kod ZP515su u fazi II, dok je nikosulfuron značajno smanjio sadržaj L + Z kod ZP504su u fazi I (Tabela 7). Interesantno je istaći da primenjeni herbicidi u obe faze nisu imali značajan uticaj na sadržaj β -karotena u listu testiranih hibrida kukuruza šećerca u toku obe godine i analiziranim fazama (Tabela 7).

4.1.1.2. Sadržaj karotenoida nakon primene folijarnog đubriva i herbicida

Tretmani M + FĐ i N + FĐ doveli su do značajnog povećanja sadržaja L + Z kod hibrida ZP355su i ZP515su, respektivno u fazi I u poređenju sa tretmanima kad su herbicidi primenjeni sami (Tabela 7). Tretmani M + FĐ i N + FĐ nisu pokazali uticaj na sadržaj β -karotena u fazi I u poređenju sa kontrolom. Nakon tretmana M + FĐ u fazi II zabeleženo je značajno povećanje sadržaja L + Z kod hibrida ZP515su, suprotno od ZP504su u poređenju sa kontrolom. U istoj fazi kod ZP504su nakon primene N + FĐ zabeležen je značajno veći sadržaj β -karotena u poređenju sa nikosulfuronom (Tabela 7).



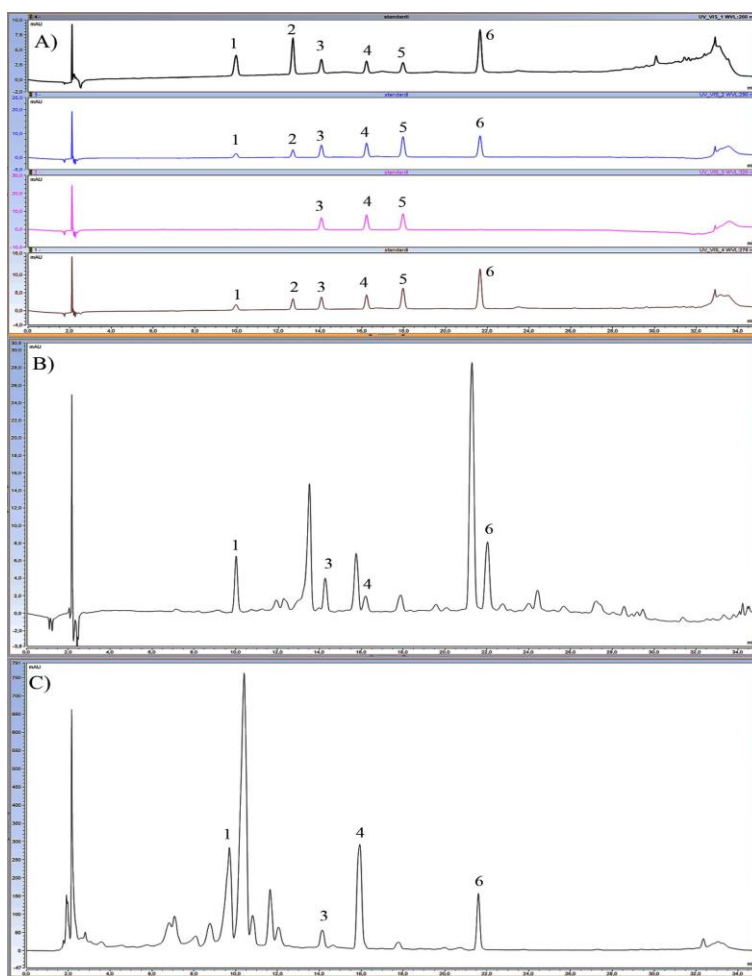
Slika 10. Hromatogram ispitivanih standarda karotenoida (a) i profil karotenoida u listu u fazi I (b) i fazi II (c) na talasnoj dužini od 450 nm. Pik 1 - Lutein + zeaksantin, pik 2 – β -Karoten.

Tabela 7. Sadržaj karotenoida (mg/100 g s.m.) nakon primenjenih tretmana u obe faze lista.

	Tretman	ZP504 _{su}		ZP355 _{su}		ZP553 _{su}		ZP515 _{su}		
		2016	2017	2016	2017	2016	2017	2016	2017	
Lutein + Zeaksantin										
I faza	K	1,5±0,1	1,60±0,01	1,70±0,08	2,10±0,02	1,61±0,03	1,87±0,09	1,60±0,03	1,32±0,01	
	M	1,6±0,1	1,8±0,1	1,14±0,06	1,96±0,05	1,32±0,07	2,04±0,02	1,58±0,04	2,25±0,04	
	N	1,27±0,02	1,2±0,1	1,41±0,01	2,15±0,01	1,37±0,04	2,05±0,01	1,29±0,07	1,44±0,06	
	M + FĐ	1,41±0,04	1,78±0,01	1,58±0,02	2,23±0,08	2,10±0,07	1,55±0,03	1,99±0,05	1,36±0,04	
	N + FĐ	1,36±0,04	1,2±0,1	1,54±0,01	1,53±0,01	1,60±0,06	1,47±0,09	1,59±0,07	1,81±0,06	
II faza	K	1,9±0,1	3,1±0,1	1,77±0,05	2,63±0,02	1,72±0,09	2,43±0,07	1,57±0,03	2,39±0,05	
	M	1,7±0,1	3,2±0,1	2,00±0,09	2,70±0,01	1,92±0,05	3,03±0,01	1,95±0,01	2,82±0,04	
	N	0,86±0,04	2,22±0,04	1,96±0,04	1,69±0,09	1,71±0,08	2,94±0,07	1,95±0,01	2,44±0,02	
	M + FĐ	1,72±0,03	2,4±0,1	1,44±0,01	2,56±0,04	1,77±0,02	3,09±0,01	1,83±0,02	1,96±0,03	
	N + FĐ	1,32±0,04	2,63±0,01	1,70±0,06	3,37±0,02	1,90±0,04	2,99±0,03b	1,96±0,09	3,02±0,01	
<i>β</i> -karoten										
I faza	K	0,22±0,02	0,48±0,03	0,35±0,02	0,63±0,06	0,31±0,04	0,53±0,01	0,367±0,004	0,376±0,003	
	M	0,33±0,02	0,49±0,03	0,25±0,02	0,56±0,08	0,28±0,02	0,62±0,05	0,43±0,04	0,67±0,06	
	N	0,25±0,05	0,43±0,04	0,34±0,05	0,56±0,03	0,32±0,02	0,59±0,06	0,18±0,00	0,42±0,03	
	M + FĐ	0,27±0,01	0,65±0,06	0,33±0,03	0,69±0,05	0,42±0,04	0,56±0,01	0,49±0,04	0,45±0,02	
	N + FĐ	0,21±0,01	0,48±0,01	0,28±0,01	0,48±0,04	0,26±0,01	0,46±0,01	0,34±0,01	0,52±0,03	
II faza	K	0,70±0,01	0,67±0,01	0,66±0,05	0,61±0,03	0,60±0,05	0,69±0,09	0,48±0,05	0,64±0,08	
	M	0,60±0,06	0,68±0,03	0,76±0,05	0,62±0,04	0,70±0,01	0,66±0,07	0,75±0,02	0,73±0,06	
	N	0,53±0,02	0,60±0,02	0,71±0,06	0,48±0,06	0,67±0,01	0,74±0,01	0,64±0,07 ^j	0,61±0,07	
	M + FĐ	0,66±0,04	0,61±0,01	0,48±0,01	0,62±0,03	0,54±0,01	0,75±0,07	0,57±0,04	0,50±0,05	
	N + FĐ	0,44±0,06	0,63±0,02	0,66±0,02	0,62±0,09	0,67±0,05	0,78±0,05	0,70±0,05	0,72±0,03	

4.1.2. Sadržaj slobodnih fenolnih kiselina

Sadržaj slobodnih i ukupnih fenolnih kiselina, nakon svih primenjenih tretmana u toku obe godine, prikazan je u Tabeli 8, dok je hromatogram fenolnih kiselina prikazan na Slici 11. Najveći sadržaj protokatehinske, *p*-kumarinske i cimetine kiseline u kontrolnim uzorcima, u fazi I, u 2016. godini imali su hibridi ZP355su (32,54, $\mu\text{g/g}$ s.m.), ZP553su (12,24 $\mu\text{g/g}$ s.m.) i ZP504su (25,35 $\mu\text{g/g}$ s.m), respektivno. Najveći sadržaj protokatehinske, *p*-kumarinske i cimetine kiseline u kontrolnim uzorcima, u istoj fazi, u toku 2017. godine zabeležen je kod hibrida ZP515su (35,13, 20,37 i 13,24 $\mu\text{g/g}$ s.m., respektivno). U kontrolnim uzorcima, hibrid ZP355su u fazi I je imao najveći sadržaj sinapinske kiseline (23,88 i 23,08 $\mu\text{g/g}$ s.m., respektivno) u toku 2016. i 2017. godine. Najveći sadržaj protokatehinske i sinapinske kiseline u listovima kontrolnih uzoraka, u II fazi, zabeležen je kod ZP504su (42,54 i 42,90 $\mu\text{g/g}$ s.m., respektivno) u 2016. godini i ZP553su (76,88 i 55,31 $\mu\text{g/g}$ s.m., respektivno) u 2017. godini. Najveći sadržaj *p*-kumarinske kiseline, u istoj fazi, zabeležen je kod ZP335su (94,93 i 41,71 $\mu\text{g/g}$ s.m) u toku obe godine. Hibrid ZP553su imao je najveći sadržaj cimetine kiseline (54,88 i 29,16 $\mu\text{g/g}$ s.m.) u toku obe vegetacione sezone.



Slika 11. Hromatogram standarda ispitivanih fenolnih kiselina pri različitim talasnim dužinama (a) i njihov profil u listu u fazi I (b) i fazi II (c) na talasnoj dužini od 260 nm. Pik 1 – Protokatehinska kiselina; pik 2 – Kofeinska kiselina; pik 3 – Sinapinska kiselina; pik 4 – *p*-Kumarinska kiselina; pik 5 – Ferulinska kiselina i pik 6 – Cimetna kiselina.

Tabela 8. Sadržaj fenolnih kiselina ($\mu\text{g/g s.m.}$) nakon primenjenih tretmana u obe faze lista.

Tretman		ZP504 _{su}		ZP355 _{su}		ZP553 _{su}		ZP515 _{su}	
		2016	2017	2016	2017	2016	2017	2016	2017
Protokatehinska kiselina									
I faza	K	18,9±0,2	24,7±0,9	32,5±0,4	13,4±0,1	20,9±0,3	31,6±0,8	17,3±0,3	35,1±0,4
	M	11,7±0,1	16,3±0,7	39,6±0,2	15,2±0,1	18,1±0,3	28,3±0,8	13,7±0,2	27,5±0,8
	N	29,7±0,5	12,1±0,1	43,4±0,3	18,6±0,3	53,2±0,8	27,0±0,9	41,1±0,3	83,6±1,9
	M + FĐ	15,3±0,1	25,9±0,4	17,7±0,1	16,1±0,1	8,1±0,1	45,1±1,0	18,3±0,08	40,6±1,0
	N + FĐ	30,2±0,4	15,9±0,2	45,7±0,4	22,0±0,8	31,9±0,3	25,2±0,5	36,8±0,3	28,5±0,8
II faza	K	42,3±0,4	37,1±0,6	15,2±0,1	50,7±1,7 ^j	37,7±0,6	76,9±1,6	36,8±0,8	75,0±2,1
	M	34,0±0,9	50,1±1,7 ^j	4,7±0,02	59,1±1,3	32,8±0,9	48,0±1,8	16,1±0,08	61,3±1,7
	N	24,7±0,6	26,6±0,4	2,0±0,6	59,1±1,6	29,6±0,1	28,8±0,7	27,9±0,5	87,8±1,61
	M + FĐ	20,9±0,5	95,8±1,4	31,9±0,4	64,8±1,3	27,4±0,8	13,4±0,2	10,7±0,01	56,5±0,9
	N + FĐ	6,4±0,01	66,7±1,2	17,5±0,6	77,9±1,7	23,7±0,1	46,1±1,5	18,3±0,7	59,5±1,9
<i>p</i> -Kumarinska kiselina									
I faza	K	8,97±0,04	17,7±0,1	8,48±0,06	13,6±0,4	12,2±0,4	14,2±0,1	10,61±0,09	20,4±0,5
	M	10,30±0,09	31,6±1,0	10,58±0,08	16,9±0,1	10,8±0,08	25,1±0,1	7,71±0,05	19,4±0,8
	N	10,4±0,1	26,4±0,1	10,44±0,04	35,7±0,2	8,6±0,02	17,3±0,1	10,86±0,07	13,1±0,3
	M + FĐ	8,05±0,04	7,64±0,03	12,35±0,1	35,1±1,0	13,3±0,1 ^e	27,2±0,1	6,47±0,05	15,7±0,1
	N + FĐ	8,20±0,02	13,5±0,3	15,43±0,1	14,5±0,2	15,5±0,04	30,7±0,2	6,18±0,04	18,0±0,4
II faza	K	39,4±1,0	20,6±0,3	94,9±1,7	41,1±0,4	56,5±1,3	25,4±0,2	60,4±1,4	39,6±0,2
	M	55,3±1,3	40,4±0,7	88,9±1,3	15,8±0,2	39,3±0,6	51,3±0,5	87,78±2,0	76,0±1,2
	N	60,7±1,6	33,6±0,6	50,8±0,7	29,7±0,3	151,8±2,7	121,7±1,95	120,1±3,7	65,7±0,4
	M + FĐ	78,5±2,5	55,8±0,6	123,6±2,6	51,1±0,7	81,6±2,1	71,6±0,9	80,2±1,6	26,5±0,4
	N + FĐ	63,7±1,0	42,3±0,8	76,3±1,6	44,9±0,7	180,7±2,3	51,3±0,5	110,6±2,0	41,9±0,5

Tabela 8. Nastavak

		ZP504 _{su}		ZP355 _{su}		ZP553 _{su}		ZP515 _{su}	
		2016	2017	2016	2017	2016	2017	2016	2017
		Cimetna kiselina							
I faza	K	25,4±0,4	9,54±0,06	24,9±0,2	10,5±0,1	16,1±0,3	5,39±0,02	16,4±0,2	13,2±0,2
	M	24,4±0,4	6,58±0,08	32,0±0,2	19,3±0,3	14,6±0,7	4,51±0,06	19,3±0,2	6,48±0,04
	N	12,1±0,1	6,68±0,06	25,8±0,4	10,4±0,08	25,3±0,2	8,51±0,03	19,0±0,2	7,12±0,05
	M + FĐ	23,4±0,3	7,52±0,07	31,0±0,3	9,11±0,05	35,3±0,3	8,22±0,02	23,3±0,5	9,99±0,02
	N + FĐ	26,7±0,3	6,98±0,02	41,9±0,3	9,16±0,09	31,1±0,3	13,0±0,2	35,1±0,3	7,99±0,06
II faza	K	42,3±0,5	20,9±1,0	32,3±0,4	15,8±0,3	54,9±0,7	29,2±1,4	54,0±0,5	22,2±0,7
	M	60,2±0,4	41,1±1,3	50,1±0,7	14,3±0,2	60,6±1,0	29,5±1,5	66,9±0,4	29,1±0,8
	N	96,1±1,5	30,7±1,3	111,5±1,4	12,5±0,1	54,8±0,7	17,0±0,2	133,2±2,0	31,2±1,4
	M + FĐ	65,4±0,7	48,8±1,5	60,7±1,0	34,6±1,1	90,1±1,4	52,1±2,5 ⁱ	101,5±1,1	19,9±0,7
	N + FĐ	38,0±0,4	25,5±0,5	126,7±1,5	36,2±1,1	43,5±0,2	24,0±1,0	125,3±1,3	33,8±1,5
		Sinapinska kiselina							
I faza	K	15,1±0,2	13,1±0,3	23,88±0,2	23,1±0,6	18,4±0,3	16,3±0,1	18,3±0,5	12,1±0,4
	M	23,8±0,9	23,8±0,2 ^f	21,0±0,4	16,2±0,3	25,0±0,4	17,8±0,1	32,0±0,2	20,8±0,1
	N	17,5±0,2	27,0±0,4	8,05±0,1	17,2±0,2	25,±0,3	15,3±0,2	14,6±0,1	20,8±0,4
	M + FĐ	21,0±0,7	13,9±0,1	17,9±0,2	6,8±0,1	45,3±0,4	14,7±0,1	33,5±0,3	15,0±0,1
	N + FĐ	19,1±0,4	13,5±0,7	13,3±0,2	10,8±0,2	20,7±0,2	12,1±0,2	12,2±0,2	18,7±0,5
II faza	K	42,9±1,4	40,1±0,6	22,3±1,1	27,9±0,2	40,1±0,5	55,3±0,8	40,5±0,9	42,4±0,5
	M	120,1±2,3	43,8±0,7	10,2±0,3	56,1±0,4	70,3±1,4	87,7±1,3	36,9±0,3	49,4±0,3
	N	74,2±1,7	15,6±0,2	8,43±0,06	10,8±0,1	107,1±1,1	17,5±0,2	22,0±1,0	27,4±0,3
	M + FĐ	100,0±2,5	51,0±0,7	13,1±0,3	84,4±1,2	69,0±1,5	34,2±0,3	15,2±0,1	43,4±0,4
	N + FĐ	57,0±0,9	70,3±0,8	28,0±0,4	13,8±0,2	151,3±3,6	28,6±0,2	48,5±0,1	27,4±0,3

4.1.2.1. Sadržaj slobodnih fenolnih kiselina nakon primene herbicida

Smanjenje sadržaja protokatehinske kiseline u fazi I zabeleženo je nakon primene mezotriona kod ZP504su (Tabela 8). Suprotno, značajno povećanje u sadržaju iste kiseline primećeno je kod ZP355su nakon tretmana niskosulfuronom. Mezotrion je doveo do značajnog smanjenja sadržaja protokatehinske kiseline, suprotno od nikosulfurona kod ZP515su. Nikosulfuron je doveo do značajnog smanjenja sadržaja sinapinske kiseline kod ZP355su.

U fazi II nakon primene mezotriona i nikosulfurona došlo je do značajnog smanjenja sadržaja *p*-kumarinske i povećanja protokatehinske kiseline kod hibrida ZP355su (Tabela 8). Slično, oba herbicida dovela su do značajnog smanjenja sadržaja protokatehinske kiseline kod hibrida ZP553su. Nakon primene nikosulfurona zabeleženo je značajno smanjenje sadržaja povećanje sinapinske kiseline i ujedno povećanje cimetine i *p*-kumarinske kiseline kod ZP515su. Isti tretman doveo je i do značajnog smanjenja sadržaja sinapinske kiseline kod hibrida ZP355su. Značajno, odnosno smanjenje sadržaja *p*-kumarinske kiseline zabeleženo je kod hibrida ZP504su i ZP355su, respektivno, nakon primene mezotriona. Isti tretman doveo je do značajnog smanjenja sadržaja protokatehinske i povećanja *p*-kumarinske kiseline kod hibrida ZP515su (Tabela 8).

4.1.2.2. Sadržaj fenolnih kiselina nakon primene herbicida i folijarnog đubriva

Sadržaj protokatehinske kiseline značajno je povećan nakon primene N + FĐ kod hibrida ZP355su u fazi I u poređenju sa kontrolom, a kod hibrida ZP355su zabeleženo je značajno smanjenje sadržaja sinapinske kiseline nakon tretmana M + FĐ i N + FĐ (Tabela 8). Kombinacija M + FĐ dovela je do značajnog povećanja sadržaja protokatehinske kiseline u fazi I kod hibrida ZP504su i ZP515su u poređenju sa mezotrionom. Kod hibrida ZP515su nakon primene N + FĐ zabeleženo je značajno smanjenje sadržaja iste kiseline u poređenju sa nikosulfuronom. Sadržaj *p*-kumarinske kiseline nakon primene N + FĐ u fazi I bio je značajno veći u poređenju sa nikosulfuronom kod ZP553su. Značajan porast sadržaja cimetine kiseline zabeležen je kod hibrida ZP553su nakon primene M + FĐ i N + FĐ u poređenju sa mezotrionom i nikosulfuronom, respektivno. Kombinacija M + FĐ dovela je do značajnog smanjenja sadržaja sinapinske kiseline kod ZP504su u fazi I u poređenju sa mezotrionom.

U fazi II nakon primene tretmana M + FĐ i N + FĐ sadržaj protokatehinske kiseline bio je značajano smanjen, dok je sadržaj *p*-kumarinske značajno povećan kod ZP553su, u poređenju sa kontrolom. Isti tretmani doveli su do značajnog povećanja sadržaja *p*-kumarinske i sinapinske kiseline u ZP504su (Tabela 8). Pomenuti tretmani doveli su do značajnog smanjenja sadržaja protokatehinske kiseline u fazi II kod ZP515su. Kod hibrida ZP355su zabeležen je značajan porast sadržaja cimetine kiseline nakon M + FĐ i N + FĐ u poređenju sa kontrolom. Značajan porast iste kiseline zabeležen je i nakon M + FĐ kod hibrida ZP504su i ZP553su, u poređenju sa kontrolom. Značajno povećanje sadržaja protokatehinske i *p*-kumarinske kiseline u fazi II zabeleženo je kod hibrida ZP504su i ZP355su, nakon M + FĐ u poređenju sa kontrolom (Tabela 8).

Kombinacija N + FĐ dovela je do značajnog smanjenja sadržaja cimetine kiseline kod ZP553su, odnosno povećanja kod ZP515su u poređenju sa kontrolom. Sadržaj protokatehinske i *p*-kumarinske kiseline u hibridu ZP515su u fazi II bio je značajno smanjen nakon primene M + FĐ i N + FĐ u poređenju sa mezotrionom i nikosulfuronom, respektivno. Kod ZP355su tretmani M + FĐ i N + FĐ pokazali su značajno povećanje sadržaja *p*-kumarinske i cimetine kiseline u poređenju sa mezotrionom i nikosulfuronom, respektivno. Tretman M + FĐ izazvao je značajno povećanje sadržaja protokatehinske kiseline u fazi II kod hibrida ZP355su, u poređenju sa mezotrionom.

Slično, kombinacija M + FĐ dovela je do značajnog povećanja sadržaja *p*-kumarinske i cimetne kiseline kod ZP504*su* i ZP553*su* u poređenju sa mezotrionom. U fazi II, nakon tretmana N + FĐ zabeleženo je značajno povećanje sadržaja sinapinske i smanjenje cimetne kiseline u hibridima ZP553*su* i ZP504*su*, respektivno, u poređenju sa nikosulfuronom (Tabela 8).

4.1.3. Sadržaj ukupnih fenola, glutaciona i antioksidativna aktivnost lista

Sadržaj TPC, GSH i DPPH' nakon svih primenjenih tretmana u toku obe godine, prikazan je u Tabeli 9. Najveća antioksidativna aktivnost u fazi I zabeležena je kod hibrida ZP355*su* (0,75 µmol ET/g s.m.) i ZP504*su* (0,90 µmol ET/g s.m.), tokom 2016. i 2017. godine, respektivno. U kontrolnim uzorcima u fazi I najveći sadržaj ukupnog GSH tokom 2016. i 2017. godine primećen je kod hibrida ZP515*su* (321,31 nmol/g s.m.) i ZP504*su* (436,76 nmol/g s.m.), respektivno. Hibrid ZP504*su* u istoj fazi imao je najveći sadržaj TPC (24,26 mg EFK/g s.m. i 19,13 mg EFK/g s.m., respektivno) u kontrolnim uzorcima. Isti hibrid i u fazi II imao je najveći sadržaj TPC (42,58 mg EFK/g s.m. i 27,38 mg EFK/g s.m.) tokom obe godine. Tokom obe godine u fazi II u kontrolnim uzorcima zabeležena je najveća antioksidativna aktivnost kod hibrida ZP515*su* (1,74 µmol ET/g s.m. i 1,87 µmol ET/g s.m., respektivno). Najveći sadržaj GSH u fazi II primećen je kod ZP504*su* (827,23 nmol/g s.m.) i ZP515*su* (881,13) tokom 2016. i 2017. godine, respektivno.

4.1.3.1. Sadržaj ukupnih fenola, glutaciona i antioksidativna aktivnost lista nakon primene herbicida

Nakon primene nikosulfurona kod ZP515*su* zabeleženo je značajno povećanje TPC u fazi I, kao i u fazi II kod hibrida ZP355*su*. Sadržaj GSH nakon primene oba herbicida bio je značajno smanjen u fazi II u ZP504*su* (Tabela 9). Kod hibrida ZP355*su* mezotrion je izazvao povećanje, a nikosulfuron smanjenje GSH. Nakon primene niksoulfurona kod ZP355*su* i ZP515*su* u fazi II zabeleženo je značajno smanjenje GSH (Tabela 9).

4.1.3.2. Sadržaj ukupnih fenola, glutaciona i antioksidativna aktivnost lista nakon primene herbicida i folijarnog đubriva

Kombinacije M + FĐ i N + FĐ su kod ZP553*su* dovele do značajnog porasta TPC u fazi I u poređenju sa kontrolom (Tabela 9). Nakon primene M + FĐ i N + FĐ kod hibrida ZP504*su* u fazi II zabeleženo je značajno smanjenje GSH u poređenju sa kontrolom. Suprotan trend je zabeležen kod ZP553*su* i ZP355*su*. Tretman N + FĐ u fazi II doveo je do značajnog povećanja GSH kod svih hibrida, sem kod ZP515*su* u poređenju sa nikosulfuronom (Tabela 9).

Tabela 9. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja (TPC), glutationa (GSH) i antioksidativna aktivnost (DPPH) lista u obe faze.

		ZP504su		ZP355su		ZP553su		ZP515su	
		2016	2017	2016	2017	2016	2017	2016	2017
		DPPH* (μmol ET/g s.m.)							
I faza	K	0,60±0,02	0,90±0,01	0,75±0,02	0,74±0,04	0,69±0,01	0,77±0,03	0,69±0,01	0,78±0,01
	M	0,79±0,01	0,80±0,03	0,63±0,03	0,71±0,07	0,71±0,03	0,81±0,02	0,73±0,02	0,85±0,01
	N	0,73±0,01	0,80±0,02	0,73±0,02	0,90±0,01	0,69±0,02	0,80±0,09	0,73±0,01	1,01±0,01
	M + FĐ	0,72±0,02	0,87±0,03	0,73±0,01	0,66±0,02	0,72±0,04	0,73±0,02	0,72±0,02	0,87±0,02
	N + FĐ	0,72±0,01	0,72±0,02	0,74±0,03	0,75±0,02	0,76±0,02	0,80±0,01	0,72±0,01	0,84±0,01
II faza	K	1,73±0,02	1,80±0,0 ^l	1,68±0,01	1,82±0,06	1,65±0,04	1,83±0,07	1,74±0,05	1,87±0,09
	M	1,75±0,03	1,84±0,05	1,65±0,04	1,98±0,05	1,74±0,03	1,84±0,05	1,60±0,09	1,85±0,05
	N	1,72±0,04	2,13±0,07	1,66±0,04	2,09±0,07	1,64±0,05	1,78±0,07	1,68±0,05 ^j	1,93±0,09
	M + FĐ	1,68±0,07	1,79±0,05 ^d	1,70±0,04	1,86±0,05	1,67±0,03	1,88±0,06	1,77±0,05	1,90±0,04
	N + FĐ	1,53±0,02	1,76±0,09	1,74±0,05	1,94±0,06	1,72±0,04	1,79±0,05	1,70±0,06	1,87±0,05
		TPC (mg EFK/g s.m.)							
I faza	K	24,3±1,3	19,1±0,4 ^l	21,5±0,5	18,0±0,5	23,0±2,1	16,8±0,6	19,0±1,2	18,9±0,7 ^l
	M	28,4±2,2	19,8±0,2	15,2±0,1	17,8±0,1	30,3±1,3	21,0±1,0	28,0±1,1	21,7±0,9
	N	28,7±0,7	17,9±0,7	17,5±0,7	26,7±1,3	29,5±2,5	24,1±1,0	33,1±2,0	27,4±0,1
	M + FĐ	26,0±2,3	25,5±0,9	18,3±0,1	11,2±0,5	38,8±1,0	24,3±1,4	27,8±2,3	25,1±1,6 ⁴
	N + FĐ	26,1±0,6	25,2±1,8	21,1±1,0 ^l	15,2±0,6 ^d	38,3±0,9	24,1±0,7	34,3±2,0	19,0±0,5
II faza	K	42,6±0,4	27,4±0,9	28,7±1,4	20,4±0,5	37,1±0,7 ^j	26,2±0,4	36,7±0,8 ^j	22,7±0,4
	M	43,1±1,3	29,7±0,4	40,8±0,5	24,2±0,3	48,9±1,8	27,5±1,0	37,5±0,5	33,2±0,1
	N	42,3±0,7	27,0±1,9	34,8±0,1	28,4±0,3	44,3±0,5	24,6±0,9	40,2±1,1	24,2±0,3
	M + FĐ	40,4±0,8	28,6±0,5	41,8±0,8	27,9±1,9	37,4±0,6	27,0±0,4	42,7±2,0	30,5±1,7 ^o
	N + FĐ	36,6±0,8	27,5±0,2	35,5±0,6	26,3±1,7	36,5±2,6 ^j	27,3±1,1	44,5±1,1	20,4±0,5 ^l

Tabela 9. Nastavak

		ZP504 _{su}		ZP355 _{su}		ZP553 _{su}		ZP515 _{su}	
		2016	2017	2016	2017	2016	2017	2016	2017
		GSH (nmol/g s.m.)							
I faza	K	221,3±19,5	436,8±15,6	178,6±24,8	297,9±11,6	224,2±14,6	323,7±9,0	321,3±18,1	319,6±14,5
	M	177,8±7,5	352,9±13,0	523,0±10,9	282,0±8,7	323,3±22,0	325,7±14,2	238,3±24,0	275,9±13,2
	N	203,4±8,6 ^f	365,4±8,7	538,2±14,0	313,1±14,5	136,5±17,5	294,8±5,8	478,6±7,9	314,9±5,1
	M + FĐ	415,5±19,2	337,1±4,3	439,2±35,5	311,2±9,6	269,5±29,2	272,6±7,7	587,4±9,9	337,4±3,1
	N + FĐ	669,1±43,4	346,6±9,6	361,3±15,7	314,5±14,4	160,6±5,9	321,6±7,3	535,4±19,0	288,6±11,2
II faza	K	827,2±5,1	878,5±25,1	470,3±25,4	606,9±6,9	350,1±12,3	537,7±8,8	371,1±27,9	881,1±14,4
	M	383,2±10,7	745,6±21,7	675,3±22,3	859,2±24,6	249,4±4,5	685,0±15,0	526,2±15,3	776,7±9,7
	N	366,1±28,2	557,3±32,0	178,8±24,3	522,2±13,2	308,1±20,9 ^x	421,5±37,0	297,4±10,2	750,9±20,4
	M + FĐ	536,9±4,5	785,3±32,0	170,6±27,9	978,7±18,8	696,7±12,4	602,3±6,0	497,6±11,5	736,3±2,2
	N + FĐ	638,8±19,7	661,4±23,1	285,8±14,1	780,0±12,6	587,6±13,5	603,6±29,2	461,1±12,4	767,7±9,1

4.2. Sadržaj fitohemikalija u zrnu

Analiza varijanse pokazala je da su hibrid (H), godina (G) i tretman (T) kao i njihove interakcije ($G \times H$; $G \times T$; $H \times T$; $G \times H \times T$) imale statistički značajan uticaj ($p \leq 0,05$) na promene u sadržaju ispitivanih fitohemikalija (karotenoidi, slobodne fenolne kiseline, vitamin E, šećeri, TPC, GSH i DPPH) u zrnu četiri hibrida zrna kukuruza šećerca (Prilog 3). Sadržaj ispitivanih fitohemikalija u obe faze u listu varirao je u zavisnosti kako od primenjenog tretmana tako i od vegetacione sezone. Shodno tome, radi bolje preglednosti rezultata, prokomentarisani će biti samo oni hibridi kod kojih je tokom obe godine zabeležen isti statistički značajan trend (povećanje ili smanjenje sadržaja fitohemikalija) nakon primenjenog tretmana u poređenju sa kontrolom ili u poređenju sa čistim herbicidom (kada se posmatra kombinacija herbicida i folijarnog đubriva).

4.2.1. Sadržaj karotenoida

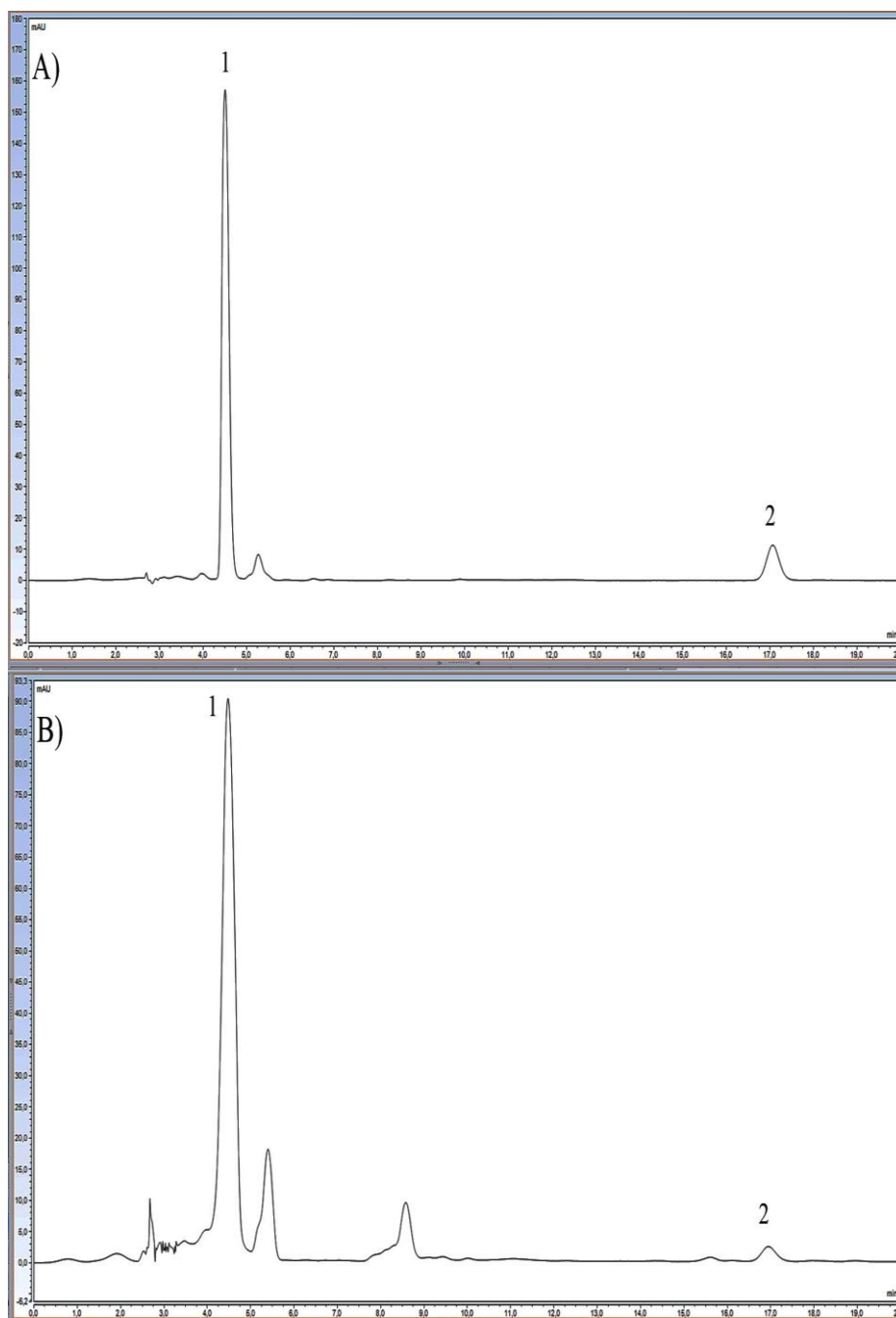
Sadržaj ispitivanih karotenoida nakon svih primenjenih tretmana u toku obe godine prikazan je u Tabeli 10, a hromatogram na Slici 12. Sadržaj karotenoida u kontrolnim uzorcima pretežno je bio manji u 2017. godini u poređenju sa 2016. godinom. Najveći sadržaj L + Z tokom obe godine ispitivanja u kontrolnom tretmanu zabeležen je kod hibrida ZP515su (37,53 $\mu\text{g/g}$ s.m. i 29,47 $\mu\text{g/g}$ s.m.), dok je sadržaj β -karotena varirao po hibridima i sezonama. U kontrolnom tretmanu, u toku 2016. godine ZP504su je pokazao najveći sadržaj β -karotena (0,92 $\mu\text{g/g}$ s.m.) a u toku 2017. godine hibrid ZP553su (1,01 $\mu\text{g/g}$ s.m.).

4.2.1.1. Sadržaj karotenoida nakon primene herbicida

Sadržaj L + Z bio je značajno povećan nakon primene mezotriona kod ZP504su i ZP553su, (Tabela 10). Nakon primene nikosulfurona, sadržaj L + Z bio je značajno veći kod hibrida ZP355su, obrnuto od hibrida ZP515su. Nakon primene oba herbicida došlo je do značajnog povećanja sadržaja β -karotena kod hibrida ZP504su i ZP355su, dok je kod hibrida ZP515su zabeležen suprotan trend (Tabela 10).

4.2.1.2. Sadržaj karotenoida nakon primene herbicida i folijarnog đubriva

Kombinacija M + FĐ dovela je do značajnog povećanja sadržaja L + Z kod svih hibrida u poređenju sa kontrolom (Tabela 10). Izuzetak je hibrid ZP355su, kod kojeg primenjeni tretman nije imao značajan uticaj. Tretman M + FĐ uticao je na značajno povećanje sadržaja β -karotena kod hibrida ZP504su i ZP553su u poređenju sa kontrolom. Nakon primene tretmana N + FĐ, značajno povećanje sadržaja L + Z zabeleženo je kod hibrida ZP504su u poređenju sa kontrolom, suprotno od hibrida ZP515su. Tretman N + FĐ pokazao je značajan uticaj na povećanje sadržaja β -karotena kod hibrida ZP504su, obrnuto od hibrida ZP553su u poređenju sa kontrolom (Tabela 10). Kombinacija M + FĐ povećala je sadržaj L + Z kod ZP504su i ZP515su u poređenju sa mezotrionom. Primenjeni tretman M + FĐ značajno je povećao sadržaj β -karotena kod hibrida ZP553su i ZP515su u poređenju sa mezotrionom. Kombinacija N + FĐ dovela je do povećanja sadržaja L + Z kod ZP553su u poređenju sa nikosulfuronom. Suprotan trend zabeležen je kod hibrida ZP355su. Kombinacija N + FĐ značajno je povećala sadržaj β -karotena kod hibrida ZP504su, suprotno od hibrida ZP355su, u poređenju sa nikosulfuronom (Tabela 10).



Slika 12. Hromatogram ispitivanih standarda karotenoida (a) i profil karotenoida u zrnu (b) na talasnoj dužini od 450 nm. Pik 1 - Lutein + zeaksantin, pik 2 – β -Karoten.

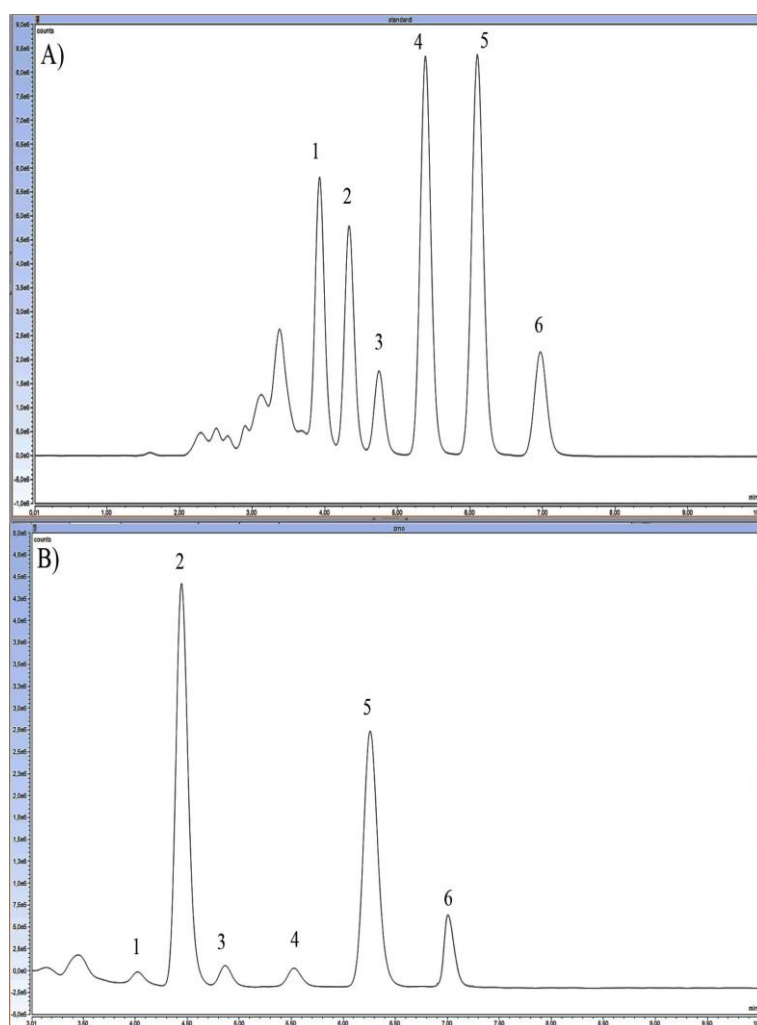
Tabela 10. Sadržaj karotenoida ($\mu\text{g/g}$ s.m.) nakon primenjenih tretmana u zrnu četiri testirana hibrida.

Tretman	ZP504 $_{su}$		ZP355 $_{su}$		ZP553 $_{su}$		ZP515 $_{su}$	
	2016	2017	2016	2017	2016	2017	2016	2017
Lutein + Zeaksantin								
K	24,2 \pm 0,7 ^m	26,2 \pm 0,4 ^k	17,9 \pm 0,2 ^s	11,1 \pm 0,4 ^u	24,7 \pm 1,0 ^m	19,2 \pm 0,8 ^{pq}	37,5 \pm 0,6 ^d	29,5 \pm 0,3 ^{ij}
M	38,6 \pm 0,9 ^{cd}	35,3 \pm 0,8 ^e	17,4 \pm 0,8 ^s	6,9 \pm 0,1 ^v	30,8 \pm 1,2 ^{gh}	24,7 \pm 0,4 ^m	32,8 \pm 0,3 ^f	31,9 \pm 0,3 ^{fg}
N	22,4 \pm 0,8 ⁿ	30,8 \pm 0,5 ^{gh}	28,9 \pm 0,4 ^j	20,1 \pm 0,4 ^{op}	20,5 \pm 0,5 ^o	15,9 \pm 0,9 ^t	24,9 \pm 0,3 ^{lm}	23,9 \pm 0,1 ^m
M + FĐ	42,4 \pm 0,9 ^b	39,3 \pm 1,2 ^c	18,0 \pm 0,6 ^{rs}	10,7 \pm 0,4 ^u	28,6 \pm 1,0	26,0 \pm 0,3 ^{kl}	43,96 \pm 0,6 ^a	35,1 \pm 0,4 ^e
N + FĐ	39,3 \pm 0,4 ^c	28,6 \pm 0,9 ^j	18,8 \pm 0,1 ^{qr}	15,6 \pm 0,4 ^t	39,4 \pm 0,7 ^c	19,9 \pm 0,9 ^{opq}	30,1 \pm 0,4 ^{hi}	20,6 \pm 0,2 ^o
β-karoten								
K	0,53 \pm 0,03 ^{rs}	0,92 \pm 0,04 ^j	0,52 \pm 0,01 st	0,45 \pm 0,02 ^u	0,91 \pm 0,01 ^{jkl}	1,01 \pm 0,04 ⁱ	0,52 \pm 0,06 st	0,32 \pm 0,01 ^{vw}
M	1,27 \pm 0,02 ^{fg}	2,35 \pm 0,06 ^b	0,60 \pm 0,04 ^{pq}	0,76 \pm 0,03 ⁿ	0,91 \pm 0,00 ^{jk}	1,43 \pm 0,05 ^e	0,36 \pm 0,01 ^v	0,23 \pm 0,02 ^x
N	0,69 \pm 0,02 ^o	1,23 \pm 0,02 ^g	0,77 \pm 0,01 ⁿ	1,02 \pm 0,06 ⁱ	0,85 \pm 0,02 ^{lm}	0,65 \pm 0,08 ^{op}	0,23 \pm 0,01 ^x	0,28 \pm 0,00 ^{wx}
M + FĐ	1,30 \pm 0,03 ^f	2,83 \pm 0,06 ^a	0,30 \pm 0,01 ^{vw}	0,59 \pm 0,01 ^{pqr}	1,16 \pm 0,02 ^h	1,69 \pm 0,01 ^d	0,47 \pm 0,03 ^{tu}	0,54 \pm 0,03 ^{qrs}
N + FĐ	0,86 \pm 0,05 ^{klm}	1,87 \pm 0,05 ^c	0,55 \pm 0,01 ^{qrs}	0,84 \pm 0,03 ^m	0,65 \pm 0,03 ^{op}	0,71 \pm 0,07 ^{no}	0,58 \pm 0,05 ^{qr}	0,23 \pm 0,01 ^x
Σ karotenoidi								
K	24,8 \pm 0,8 ^{mn}	27,1 \pm 0,4 ^{jk}	18,4 \pm 0,2 ^{rs}	11,5 \pm 0,45	25,7 \pm 1,0	20,3 \pm 0,9 ^{pq}	38,0 \pm 0,7 ^d	29,8 \pm 0,3 ⁱ
M	39,8 \pm 0,9 ^c	37,7 \pm 0,9 ^d	18,0 \pm 0,8 ^s	7,63 \pm 0,1 ^v	31,7 \pm 1,2 ^{gh}	26,2 \pm 0,4 ^{kl}	33,2 \pm 0,3 ^f	32,1 \pm 0,3 ^{fg}
N	23,1 \pm 0,8 ^o	32,0 \pm 0,5 ^{fg}	29,6 \pm 0,5 ⁱ	21,1 \pm 0,4 ^p	21,4 \pm 0,6 ^p	16,6 \pm 0,8 ^t	25,2 \pm 0,3 ^{lmn}	24,2 \pm 0,1 ^{no}
M + FĐ	43,7 \pm 0,9 ^a	42,1 \pm 1,3 ^b	18,3 \pm 0,7 ^{rs}	11,3 \pm 0,4 ^u	29,8 \pm 1,0 ⁱ	27,7 \pm 0,3 ^j	44,4 \pm 0,6 ^a	35,64 \pm 0,4 ^e
N + FĐ	40,2 \pm 0,3 ^c	30,5 \pm 0,9 ^{hi}	19,3 \pm 0,2 ^{qr}	16,4 \pm 0,4 ^t	40,0 \pm 0,7 ^c	20,6 \pm 1,0 ^p	30,7 \pm 0,4 ^{hi}	20,8 \pm 0,2 ^p

Različita slova označavaju postojanje statistički značajne razlike (Fisher's LSD) pri nivou pouzdanosti od 0,95 ($p \leq 0,05$) između posmatranih parametara za interakciju $G \times H \times T$.

4.2.2. Sadržaj tokoferola i tokotrienola

Sadržaj ispitivanih tokotrienola, tokoferola i ukupnog vitamina E, nakon svih primenjenih tretmana u toku obe godine, prikazan je u Tabeli 11, dok je hromatogram tokotrienola i tokoferola prikazan na Slici 13. Najveći sadržaj tokotrienola: δ -T3, $\beta+\gamma$ -T3 i α -T3, u kontrolnim uzorcima imali su ZP504su (0,45 $\mu\text{g/g}$ s.m.), ZP553su (25,96 $\mu\text{g/g}$ s.m.) i ZP355su (6,76 $\mu\text{g/g}$ s.m.), respektivno, u toku 2016. godine. Tokom 2017. godine najveći sadržaj δ -T3, $\beta+\gamma$ -T3 i α -T3 u kontrolnim uzorcima, zabeležen je kod hibrida ZP553su (0,97 $\mu\text{g/g}$ s.m.), ZP504su (11,68 $\mu\text{g/g}$ s.m.) i ZP515su (3,77 $\mu\text{g/g}$ s.m.). Tokom 2016. godine, u kontrolnim uzorcima, najveći sadržaj δ -T zabeležen je kod ZP553su (0,83 $\mu\text{g/g}$ s.m.), dok je najveći sadržaj $\beta+\gamma$ -T i α -T imao hibrid ZP355su (20,06 $\mu\text{g/g}$ s.m. i 9,48 $\mu\text{g/g}$ s.m., respektivno). Najveći sadržaj δ -T, $\beta+\gamma$ -T, i α -T u kontrolnim uzorcima tokom 2017. zabeležen je kod ZP355su (0,74 $\mu\text{g/g}$ s.m.), ZP515su (11,51 $\mu\text{g/g}$ s.m.) i ZP553su (3,15 $\mu\text{g/g}$ s.m.). Najveći ukupan sadržaj vitamina E (tokotrienoli + tokoferoli) u kontrolnim uzorcima tokom 2016. i 2017. godine zabeležen je kod ZP355su (59,79 $\mu\text{g/g}$ s.m.) i ZP515su (30,09 $\mu\text{g/g}$ s.m.), respektivno.



Slika 13. Hromatogram standarda ispitivanih tokoferola i tokotrienola (a) i njihov profil u zrnu (b). Pik 1 – δ -Tokotrienol; pik 2 – $\beta + \gamma$ -Tokotrienol; pik 3 – α -Tokotrienol; pik 4 – δ -Tokoferol; pik 5 – $\beta + \gamma$ -Tokoferol i pik 6 – α -Tokoferol.

Tabela 11. Sadržaj tokoferola i tokotrienola ($\mu\text{g/g}$ s.m.) nakon primenjenih tretmana u zrnju četiri testirana hibrida.

Tretman	ZP504su		ZP355su		ZP553su		ZP515su	
	2016	2017	2016	2017	2016	2017	2016	2017
δ -Tokotrienol (δ -T3)								
K	0,45±0,04 ^p	1,0±0,1 ^{de}	0,27±0,04 ^{rs}	0,87±0,07 ^{ghi}	0,37±0,02 ^q	0,97±0,08 ^d	0,18±0,03 ^{tu}	0,93±0,06 ^{def}
M	1,1±0,1 ^b	1,03±0,09 ^c	0,89±0,04 ^{efgh}	0,59±0,06 ^{mn}	0,25±0,05 ^s	0,88±0,03 ^{fghi}	0,15±0,02 ^{uv}	0,62±0,05 ^{lmn}
N	0,56±0,04 ^{no}	0,32±0,02 ^{qr}	0,65±0,07 ^{kl}	0,49±0,02 ^p	0,14±0,01 ^{uvw}	0,86±0,03 ^{hi}	0,13±0,01 ^{uvw}	0,70±0,04 ^{jk}
M + FĐ	0,64±0,07 ^{lm}	0,75±0,04 ^j	1,54±0,02 ^a	0,93±0,03 ^{defg}	0,23±0,03 st	0,89±0,04 ^{efghi}	0,16±0,02 ^{tu}	0,65±0,07 ^{kl}
N + FĐ	0,16±0,02 ^u	1,04±0,07 ^{bc}	0,74±0,01 ^j	0,47±0,03 ^p	0,45±0,02 ^p	0,83±0,08 ⁱ	0,14±0,02 ^{uvw}	0,51±0,05 ^{op}
β + γ -Tokofotrienol (β + γ -T3)								
K	20,7±0,1 ^l	11,7±0,1 ^x	22,5±0,1 ⁱ	9,87±0,04 ^d	26,0±0,1 ^c	10,6±0,1 ^f	20,1±0,1 ⁿ	11,5±0,1 ^z
M	20,5±0,1 ^m	8,85±0,05 ^a	21,3±0,1 ^k	8,7±0,1 ⁱ	24,0±0,1 ^g	17,93±0,02 ^r	17,9±0,1 ^r	8,3±0,1 ^{k'}
N	19,6±0,1 ^o	14,9±0,1 ^v	22,4±0,1 ^j	12,8±0,1 ^w	26,5±0,1 ^b	16,41±0,06 ^s	15,6±0,1 ^t	9,16±0,05 ^{h'}
M + FĐ	22,8±0,1 ^h	10,65±0,05 ^b	15,4±0,1 ^u	8,4±0,1 ⁱ	24,7±0,1 ^e	11,58±0,05 ^y	18,5±0,1 ^q	11,44±0,03 ^z
N + FĐ	19,4±0,1 ^p	9,8±0,1 ^{c'}	24,1±0,1 ^f	11,1±0,1 ^{e'}	24,9±0,1 ^d	10,3±0,1 ^{g'}	44,0±0,1 ^a	8,7±0,9 ^{i'}
α -Tokotrienol (α -T3)								
K	3,46±0,03 ^p	2,17±0,02 ^{wx}	6,8±0,1 ^d	3,55±0,03 ^o	3,78±0,02 ⁿ	2,85±0,02 ^s	6,4±0,1 ^f	3,77±0,04 ⁿ
M	5,6±0,1 ⁱ	2,09±0,02 ^y	5,4±0,1 ^j	3,16±0,03 ^q	6,58±0,09 ^e	4,76±0,05 ^k	2,45±0,02 ^v	5,97±0,05 ^g
N	7,7±0,1 ^b	2,03±0,01 ^z	5,7±0,1 ^h	3,48±0,02 ^p	4,7±0,1 ^l	2,58±0,01 ^u	2,20±0,02 ^w	4,33±0,03 ^m
M + FĐ	5,6±0,1 ^h	2,45±0,01 ^v	12,5±0,1 ^a	2,73±0,04 ^t	4,7±0,1 ^{kl}	1,95±0,01 ^{a'}	3,05±0,04 ^r	5,29±0,06 ^j
N + FĐ	6,0±0,1 ^g	2,11±0,01 ^{xy}	7,59±0,03 ^c	3,60±0,02 ^o	5,97±0,03 ^g	3,15±0,03 ^q	5,56±0,07 ⁱ	4,39±0,04 ^m

Različita slova označavaju postojanje statistički značajne razlike (Fisher's LSD) pri nivou pouzdanosti od 0,95 ($p \leq 0,05$) između posmatranih parametara za interakciju $G \times H \times T$.

Tabela 11. Nastavak

Tretman	ZP504 _{su}		ZP355 _{su}		ZP553 _{su}		ZP515 _{su}	
	2016	2017	2016	2017	2016	2017	2016	2017
<i>δ</i> -Tokoferol (<i>δ</i> -T)								
K	0,15±0,04 ^r	0,36±0,01 ^{op}	0,75±0,03 ^{ghi}	0,74±0,04 ^{hij}	0,83±0,02 ^f	0,69±0,01 ^{jk}	0,81±0,02 ^{fg}	0,72±0,08 ^{ij}
M	0,34±0,03 ^{op}	0,84±0,02 ^f	0,72±0,03 ^{ij}	0,53±0,03 ^l	0,79±0,05 ^{fgh}	0,71±0,01 ^{ij}	0,26±0,03 ^q	0,63±0,05 ^k
N	0,35±0,01 ^{op}	0,43±0,02 ^{mn}	0,80±0,06 ^{fgh}	0,94±0,02 ^{de}	0,39±0,09 ^{no}	0,50±0,04 ^l	1,27±0,08 ^b	0,90±0,05 ^e
M + FĐ	0,51±0,08 ^l	0,96±0,02 ^d	0,76±0,02 ^{ghi}	0,48±0,03 ^{lm}	1,33±0,02 ^a	0,98±0,04 ^d	1,11±0,04 ^c	0,93±0,04 ^{d^e}
N + FĐ	0,30±0,00 ^{pq}	0,54±0,04 ^l	0,79±0,02 ^{fgh}	1,23±0,03 ^b	0,54±0,05 ^l	0,40±0,01 ^{no}	0,98±0,03 ^d	1,29±0,07 ^{ab}
<i>β</i> + <i>γ</i> -Tokoferol (<i>β</i> + <i>γ</i> -T)								
K	8,2±0,1 ^a	7,97±0,05 ^c	20,1±0,1 ^d	6,98±0,03 ^e	10,00±0,05 ^t	6,2±0,1 ^h	12,7±0,1 ^m	11,51±0,04 ^p
M	13,4±0,1 ^l	11,0±0,1 ^q	19,7±0,1 ^e	4,5±0,1 ⁱ	9,1±0,1 ^w	7,4±0,1 ^f	7,6±0,1 ^b	2,97±0,03 ^j
N	10,4±0,1 ^r	6,5±0,1 ^{gr}	23,5±0,1 ^b	9,0±0,1 ^x	15,3±0,1 ⁱ	23,0±0,1 ^c	10,2±0,1 ^s	8,6±0,1 ^z
M + FĐ	16,10±0,02 ^h	13,63±0,05 ^k	17,30±0,05 ^g	7,0±0,1 ^e	11,91±0,04 ^o	8,82±0,05 ^y	9,43±0,05 ^v	11,39±0,03 ^p
N + FĐ	9,6±0,1 ^u	7,8±0,1 ^d	29,30±0,05 ^a	12,5±0,1 ⁿ	14,2±0,1 ^j	18,2±0,1 ^f	13,38±0,03 ^l	8,7±0,1 ^z
<i>α</i> -Tokoferol (<i>α</i> -T)								
K	2,06±0,09 ^p	1,53±0,01 st	9,48±0,07 ^c	2,15±0,00 ^o	3,89±0,01 ^g	3,15±0,03 ^k	2,48±0,04 ⁿ	1,70±0,02 ^r
M	3,28±0,04 ^j	2,41±0,01 ⁿ	5,16±0,07 ^f	2,10±0,07 ^{op}	3,51±0,10 ⁱ	2,98±0,08 ^l	1,21±0,01 ^w	1,52±0,01 st
N	1,79±0,04 ^q	1,03±0,01 ^x	12,65±0,01 ^b	2,98±0,02 ^l	1,38±0,03 ^v	1,21±0,01 ^w	2,90±0,03 ^l	1,42±0,01 ^{uv}
M + FĐ	3,58±0,07 ⁱ	2,70±0,02 ^m	6,46±0,02 ^d	1,60±0,03 ^s	3,76±0,05 ^h	2,63±0,06 ^m	1,52±0,02 st	3,94±0,04 ^g
N + FĐ	2,06±0,03 ^p	1,02±0,07 ^x	15,74±0,03 ^a	3,68±0,08 ^h	2,40±0,06 ⁿ	1,49±0,06 ^{tu}	3,51±0,05 ⁱ	5,38±0,05 ^e
Vitamin E								
K	35,0±0,3 ^o	24,7±0,1 ^b	59,8±0,4 ^d	24,2±0,2 ^c	44,8±0,2 ^j	24,5±0,1 ^b	42,7±0,4 ^l	30,1±0,3 ^v
M	44,2±0,2 ^k	26,3±0,84 ^z	53,2±0,4 ^f	19,5±0,2 ^{gr}	44,2±0,5 ^k	34,7±0,5 ^p	29,6±0,2 ^w	20,0±0,3 ^r
N	40,4±0,3 ^m	25,2±0,9 ^a	65,57±0,2 ^c	29,7±0,2 ^w	48,5±0,4 ^h	44,6±0,5 ^j	32,3±0,3 ^t	25,1±0,2 ^a
M + FĐ	49,3±0,4 ^g	31,2±0,2 ^u	54,0±0,3 ^e	21,2±0,1 ^e	46,6±0,3 ⁱ	26,9±0,8 ^y	33,8±0,21 ^r	33,6±0,3 ^r
N + FĐ	37,4±0,3 ⁿ	22,3±0,2 ^d	78,3±0,1 ^a	32,6±0,5 ^s	48,5±0,3 ^h	34,4±0,6 ^q	67,5±0,27 ^b	28,9±0,4 ^x

Različita slova označavaju postojanje statistički značajne razlike (Fisher's LSD) pri nivou pouzdanosti od 0,95 ($p \leq 0,05$) između posmatranih parametara za interakciju $G \times H \times T$.

4.2.2.1. Sadržaj tokoferola i tokotrienola nakon primene herbicida

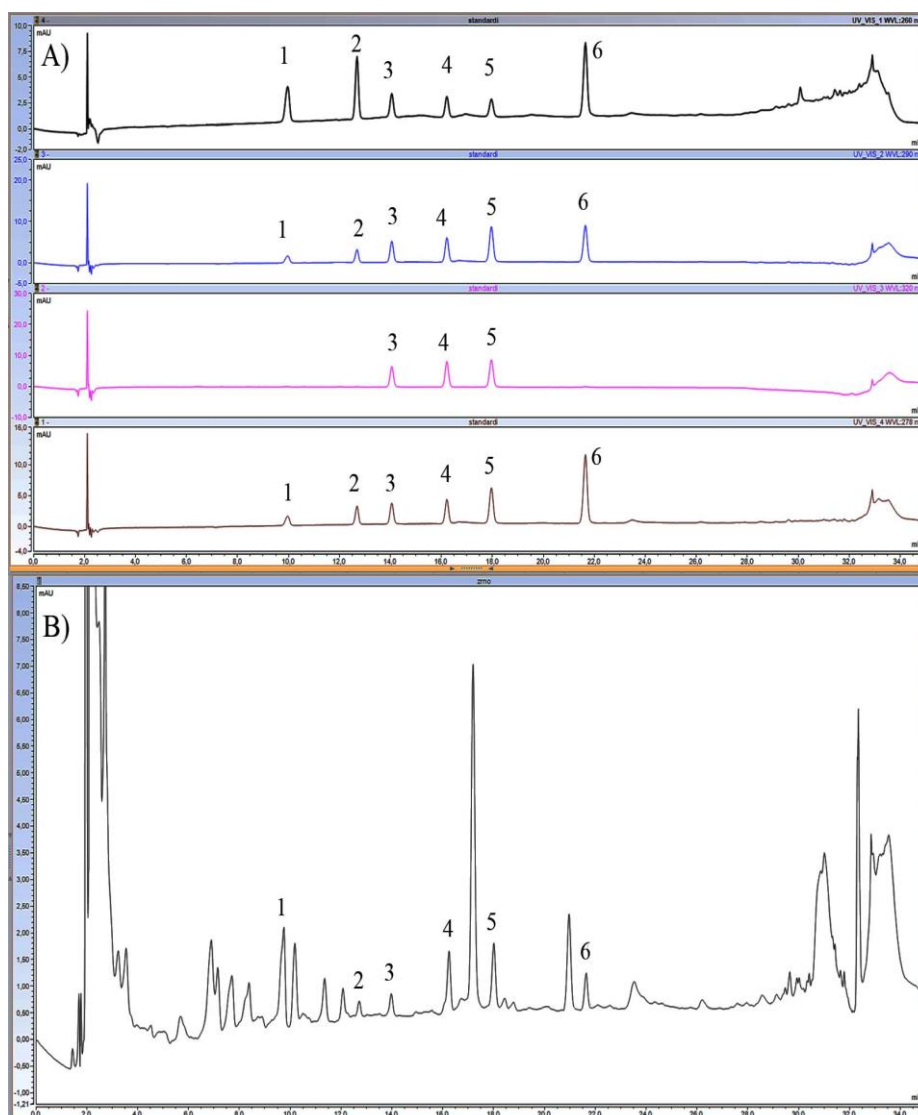
Nakon primene mezotriona i nikosulfurona došlo je do značajnog smanjenja sadržaja δ -T3 i α -T kod hibrida ZP553su (Tabela 11). Oba herbicida dovela su do značajnog smanjenja δ -T3, $\beta+\gamma$ -T3 i $\beta+\gamma$ -T kod ZP515su. Mezotrion je doveo do značajnog povećanja sadržaja svih tokoferola i δ -T3, kod hibrida ZP504su. Kod istog hibrida, nikosulfuron doveo je do značajnog povećanja sadržaja δ -T i značajnog smanjenja α -T. Nikosulfuron je doveo do značajnog povećanja sadržaja $\beta+\gamma$ -T i α -T kod hibrida ZP355su i smanjenja odnosno povećanja sadržaja δ -T i $\beta+\gamma$ -T kod hibrida ZP553su (Tabela 11).

4.2.2.2. Sadržaj tokoferola i tokotrienola nakon primene herbicida i folijarnog đubriva

Tretman M + FĐ kod hibrida ZP504su je doveo do značajnog porasta sadržaja α -T3 i svih tokoferola u poređenju sa kontrolom (Tabela 11). Isti tretman kada se uporedi sa mezotrionom, takođe je značajno uticao na povećanje sadržaja pomenutih fitohemikalija. Tretman M + FĐ kod ZP355su doveo je do značajnog smanjenja sadržaja α -T i $\beta+\gamma$ -T3 u poređenju sa kontrolom. Kada se isti tretman uporedi sa mezotrionom beleži se značajan porast α -T (Tabela 11). Tretman N + FĐ pokazao je povećanje sadržaja α -T3, $\beta+\gamma$ -T i smanjenje sadržaja $\beta+\gamma$ -T3, δ -T, α -T, kod hibrida ZP553su u poređenju sa kontrolom. Kada se isti tretman uporedi sa nikosulfuronom kod istog hibrida beleži se značajno povećanje sadržaja α -T. Nakon primene N + FĐ kod hibrida ZP515su primećen je značajno veći sadržaj α -T i δ -T u poređenju sa kontrolom. U poređenju istog tretmana i nikosulfurona kod istog hibrida, zabeležen je značajan porast sadržaja α -T (Tabela 11).

4.2.3. Sadržaj slobodnih fenolnih kiselina

Sadržaj slobodnih i ukupan sadržaj fenolnih kiselina, nakon svih primenjenih tretmana u toku obe godine, prikazan je u Tabeli 12, dok je hromatogram fenolnih kiselina prikazan na Slici 14. Najveći ukupan sadržaj fenolnih kiselina tokom 2016. i 2017. godine u kontrolnim uzorcima, zabeležen je kod hibrida ZP553su (73,94 i 80,86 $\mu\text{g/g}$ s.m., redom). Najveći sadržaj protokatehinske kiseline u kontrolnim uzorcima pokazao je ZP553su (29,73 $\mu\text{g/g}$ s.m.) u 2016. godini i ZP504su (36,69 $\mu\text{g/g}$ s.m.) u 2017. godini. Hibridi ZP355su (1,46 $\mu\text{g/g}$ s.m.) i ZP553su (1,50 $\mu\text{g/g}$ s.m.) imali su najveći sadržaj kofeinske kiseline u toku 2016. i 2017. godine, respektivno. U kontrolnim uzorcima najveći sadržaj *p*-kumarinske kiseline zabeležen je kod ZP515su (9,21 $\mu\text{g/g}$ s.m.) i ZP553su (23,76 $\mu\text{g/g}$ s.m.) u 2016. i 2017. godini, respektivno. Najveći sadržaj cimetine kiseline zabeležen je kod ZP515su (3,72 $\mu\text{g/g}$ s.m.) i ZP355su (5,67 $\mu\text{g/g}$ s.m.) tokom 2016. i 2017. godine, respektivno (Tabela 12). Najveći sadržaj ferulinske kiseline tokom obe godine u kontrolnim uzorcima pokazao je ZP515su (26,67 i 23,28 $\mu\text{g/g}$ s.m.). Slično, tokom obe godine hibrid ZP553su imao je najveći sadržaj sinapinske kiseline (22,71 i 5,64 $\mu\text{g/g}$ s.m.).



Slika 14. Hromatogram standarda ispitivanih fenolnih kiselina pri različitim talasnim dužinama (a) i njihov profil u zrnu (b) na talasnoj dužini od 260 nm. Pik 1 – protokatehinska kiselina; pik 2 – kofeinska kiselina; pik 3 – sinapinska kiselina; pik 4 – *p*-kumarinska kiselina; pik 5 – ferulinska kiselina i pik 6 – cimetna kiselina.

4.2.3.1. Sadržaj slobodnih fenolnih kiselina nakon primene herbicida

Nikosulfuron je doveo do značajnog povećanja sadržaja protokatehinske i sinapinske kiseline kod hibrida ZP515su (Tabela 12). Povećanje sadržaja kofeinske, *p*-kumarinske i cimetne kiseline nakon primene mezotriona primećeno je kod ZP504su. Mezotrion je u hibridu ZP355su doveo samo do značajnog povećanja sadržaja protokatehinske kiseline, u odnosu na ostale ispitivane fenolne kiseline (Tabela 12). U istom hibridu nikosulfuron je doveo do značajnog povećanja sadržaja kofeinske, *p*-kumarinske, ferulinske i cimetne kiseline. Kod hibrida ZP553su nakon primene mezotriona zabeležen je značajno veći sadržaj protokatehinske kiseline i ujedno smanjenje sadržaja *p*-kumarinske i sinapinske kiseline. Nikosulfuron je kod hibrida ZP553su doveo do povećanja sadržaja kofeinske i smanjenja *p*-kumarinske kiseline. Mezotrion kod ZP515su značajno je povećao sadržaj protokatehinske, kofeinske i ferulinske kiseline. U istom hibridu, nikosulfuron doveo je do značajnog porasta sadržaja samo protokatehinske kiseline. (Tabela 12).

4.2.3.2. Sadržaj slobodnih fenolnih kiselina nakon primene herbicida i folijarnog đubriva

Kombinacija M + FĐ dovela je do značajnog povećanja u sadržaju svih ispitivanih fenolnih kiselina u hibridu ZP504su u poređenju sa kontrolom (Tabela 12). Kod hibrida ZP355su kombinacije M + FĐ i N + FĐ dovele su do povećanja sadržaja kofeinske i sinapinske kiseline. Kod istog hibrida nakon primene M + FĐ zabeležen je porast sadržaja protokatehinske i *p*-kumarinske kiseline, dok je kombinacija N + FĐ dovela do smanjenja sadržaja protokatehinske i porasta sadržaja ferulinske kiseline (Tabela 12). Porast protokatehinske i ferulinske i ujedno smanjenje sadržaja cimetine i sinapinske kiseline nakon tretmana M + FĐ zabeleženo je kod ZP553su. Kombinacija N + FĐ kod istog hibrida dovela je do značajnog povećanja sadržaja ferulinske i cimetine kiseline i do smanjenja sadržaja kofeinske i *p*-kumarinske kiseline, u poređenju sa kontrolom. Kod hibrida ZP515su zabeleženo je značajno povećanje u sadržaju svih ispitivanih fenolnih kiselina, sem sinapinske i to nakon primene tretmana N + FĐ (Tabela 12).

Kombinacija M + FĐ dovela je do značajnog povećanja sadržaja ferulinske i cimetine kiseline u poređenju sa mezotrionom kod ZP504su (Tabela 12). Kod istog hibrida, kombinacija N + FĐ kada se upoređi sa nikosulfuronom, dovela je do značajnog povećanja sadržaja cimetine i ujedno do smanjenja sadržaja sinapinske i kofeinske kiseline. Značajno veći sadržaj *p*-kumarinske i sinapinske kiseline nakon primene M + FĐ u poređenju sa mezotrionom, zabeležen je kod hibrida ZP355su. Tretman N + FĐ kod ZP355su pokazao je značajno povećanje sadržaja ferulinske i sinapinske kiseline i značajno smanjenje u sadržaju protokatehinske kiseline u poređenju sa nikosulfuronom (Tabela 12). Nakon primene M + FĐ kod hibrida ZP553su, zabeležen je veći sadržaj protokatehinske, *p*-kumarinske i ferulinske kiseline kao i smanjenje sadržaja cimetine kiseline u poređenju sa mezotrionom. Kombinacija N + FĐ značajno je povećala sadržaj sinapinske i smanjila sadržaj kofeinske kiseline kod ZP553su u poređenju sa nikosulfuronom (Tabela 12). Kod hibrida ZP515su zabeležen je značajan porast u sadržaju protokatehinske, ferulinske i cimetine kiseline nakon primene N + FĐ u poređenju sa nikosulfuronom. Kod istog hibrida, kombinacija M + FĐ dovela je do značajnog većeg sadržaja samo cimetine kiseline u poređenju sa mezotrionom (Tabela 12).

Tabela 12. Sadržaj slobodnih fenolnih kiselina ($\mu\text{g/g}$ s.m.) nakon primenjenih tretmana u zrnu četiri testirana hibrida

	ZP504su		ZP355su		ZP553su		ZP515su	
	2016	2017	2016	2017	2016	2017	2016	2017
Protokatehinska kiselina								
K	20,4±0,5 ^f	36,7±0,8 ^{fgh}	22,3±0,6 ^q	29,1±1,0 ^l	29,7±0,7 ^l	27,6±0,7 ^m	17,8±0,5 ^s	15,9±0,2 ^t
M	38,6±0,8 ^e	36,6±0,4 ^{gh}	26,2±0,4 ⁿ	39,8±1,0 ^d	37,2±0,8 ^{fg}	43,4±1,0 ^b	36,52±0,9 ^{gh}	27,3±0,8 ^m
N	22,3±0,5 ^q	31,2±1,1 ^k	20,2±1,6 ^r	32,7±1,3 ^j	36,0±0,8 ^h	24,6±0,6 ^o	19,8±1,1 ^r	19,8±0,3 ^r
M + FĐ	36,2±1,0 ^h	42,1±0,2 ^c	27,3±0,7 ^m	39,9±0,2 ^d	33,0±0,7 ^j	48,4±1,3 ^a	17,5±1,2 ^s	27,3±0,4 ^m
N + FĐ	22,8±0,6 ^{pq}	37,6±0,5 ^f	17,4±0,3 ^s	27,6±0,9 ^m	29,2±0,7 ^l	33,2±0,8 ^j	34,5±0,2 ⁱ	23,6±0,7 ^{op}
Kofeinska kiselina								
K	1,11±0,03 ^v	0,56±0,01 ^j	1,46±0,04 ⁿ	1,23±0,03 ^t	1,05±0,02 ^y	1,50±0,04 ^j	1,08±0,03 ^x	0,29±0,04 ^{mm}
M	1,69±0,04 ⁱ	1,04±0,02 ^z	1,89±0,05 ^e	1,20±0,03 ^u	1,02±0,02 ^{a'}	1,49±0,04 ^k	1,28±0,09 ^s	0,92±0,01 ^f
N	0,81±0,02 ^h	0,41±0,00 ^l	2,27±0,09 ^b	1,31±0,03 ^r	1,33±0,03 ^q	1,71±0,04 ^h	0,66±0,05 ⁱ	0,99±0,02 ^c
M + FĐ	1,37±0,04 ^p	1,46±0,04 ^m	1,85±0,05 ^f	1,95±0,05 ^d	0,82±0,02 ^g	1,72±0,05 ^g	1,02±0,02 ^{b'}	1,10±0,01 ^w
N + FĐ	0,95±0,02 ^d	0,81±0,02 ^{b'}	1,97±0,04 ^c	1,47±0,04 ^l	0,41±0,01 ^{k'}	1,41±0,03 ^o	2,33±0,03 ^a	0,94±0,04 ^{e'}
<i>p</i> -Kumarinska kiselina								
K	4,92±0,02 ^{g'}	9,89±0,03 ^{mn}	7,59±0,03 ^v	9,70±0,03 ^o	8,26±0,03 ^u	23,8±0,1 ^a	9,2±0,1 ^q	5,7±0,1 ^{b'}
M	10,9±0,1 ^j	11,37±0,05 ^h	4,68±0,02 ^{h'}	11,16±0,07 ⁱ	6,59±0,02 ^{a'}	11,65±0,04 ^g	8,9±0,1 ^s	7,1±0,1 ^z
N	5,68±0,02 ^{b'}	10,62±0,06 ^k	8,75±0,03 ^t	10,02±0,04 ^l	6,45±0,02 ^{b'}	19,6±0,1 ^b	5,9±0,1 ^{d'}	7,43±0,05 ^w
M + FĐ	9,0±0,1 ^r	12,00±0,08 ^f	9,52±0,04 ^p	15,51±0,08 ^c	9,84±0,03 ⁿ	12,69±0,05 ^e	6,64±0,04 ^{a'}	7,15±0,02 ^y
N + FĐ	5,80±0,02 ^{e'}	9,21±0,03 ^q	7,36±0,02 ^x	13,42±0,09 ^d	6,45±0,02 ^{b'}	19,7±0,1 ^b	9,94±0,02 ^m	6,29±0,05 ^{c'}
Ferulinska kiselina								
K	11,80±0,01 ^{qr}	19,0±0,2 ^k	11,89±0,05 ^{qr}	16,8±0,2 ⁿ	10,31±0,01 ^t	17,2±0,3 ^{mn}	26,7±0,4 ^c	23,3±1,2 ^{gh}
M	15,8±0,1	17,4±0,2 ^m	11,17±0,03 ^s	21,9±0,3 ⁱ	10,32±0,01 ^t	16,7±0,2 ⁿ	27,6±1,1 ^b	27,3±0,3 ^b
N	12,0±0,1 ^q	19,0±0,2 ^k	14,7±0,4 ^p	23,1±0,3 ^h	10,48±0,01 ^t	18,4±0,3 ^k	20,8±0,16 ^j	23,7±0,5 ^g
M + FĐ	16,67±0,02 ⁿ	21,02±0,4 ^j	12,12±0,1 ^q	20,6±0,3 ^j	11,40±0,02 ^{rs}	18,5±0,2 ^{kl}	26,0±0,4 ^d	23,5±0,7 ^{gh}
N + FĐ	10,57±0,01 ^t	18,7±0,2 ^{kl}	15,7±0,1 ^o	25,4±0,2 ^e	11,85±0,02 ^{qr}	18,2±0,2 ^l	29,5±0,3 ^a	24,8±0,4 ^f

Različita slova označavaju postojanje statistički značajne razlike (Fisher's LSD) pri nivou pouzdanosti od 0,95 ($p \leq 0,05$) između posmatranih parametara za interakciju $G \times H \times T$.

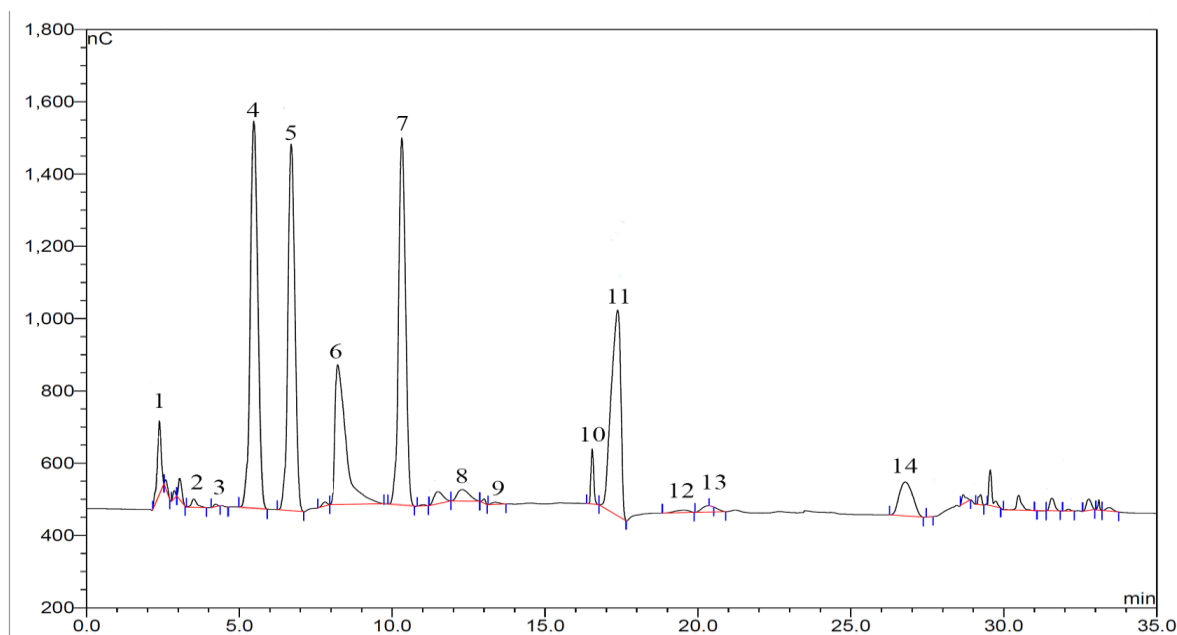
Tabela 12. Nastavak

	ZP504 _{su}		ZP355 _{su}		ZP553 _{su}		ZP515 _{su}	
	2016	2017	2016	2017	2016	2017	2016	2017
Cimetna kiselina								
K	2,18±0,05 ^w	1,81±0,04 ^{a'}	2,31±0,06 ^{uv}	5,67±0,07 ^e	1,87±0,04 ^z	5,3±0,1 ^f	3,72±0,02 ^k	0,65±0,03 ^{d'}
M	2,7±0,1 ^s	3,0±0,1 ^q	2,50±0,06 ^t	5,30±0,08 ^f	2,09±0,05 ^y	3,5±0,1 ⁿ	3,14±0,05 ^p	0,70±0,02 ^{d'}
N	2,32±0,06 ^u	0,50±0,01 ^{e'}	2,82±0,00 ^r	7,30±0,03 ^c	3,8±0,9 ^j	4,92±0,03 ^g	3,64±0,01 ^l	1,64±0,02 ^{b'}
M + FĐ	3,3±0,1 ^o	4,20±0,09 ⁱ	1,87±0,04 ^{za'}	9,78±0,09 ^a	1,23±0,03 ^{c'}	2,31±0,06 ^{uv}	3,57±0,01 ^m	2,16±0,04 ^{wx}
N + FĐ	2,10±0,05 ^{xy}	1,19±0,03 ^{c'}	1,64±0,02 ^{b'}	8,84±0,01 ^b	2,77±0,07 ^r	5,94±0,06 ^d	4,6±0,1 ^h	2,25±0,04 ^v
Sinapinska kiselina								
K	8,07±0,08 ^p	3,4±0,1 ^z	9,90±0,03 ⁿ	3,8±0,1 ^x	22,7±0,1 ^a	5,64±0,05 ^u	12,31±0,01 ^k	3,13±0,03 ^{b'}
M	21,1±0,1 ^b	2,51±0,01 ^{d'}	6,53±0,02 ^r	4,5±0,1 ^w	14,9±0,1 ^f	3,44±0,02 ^z	18,10±0,02 ^c	2,6±0,1 ^{d'}
N	14,0±0,1 ^h	3,88±0,02 ^x	4,93±0,04 ^v	5,0±0,1 ^v	13,5±0,1 ⁱ	5,63±0,04 ^u	8,6±0,1 ^o	2,35±0,02 ^{e'}
M + FĐ	17,6±0,2 ^d	5,87±0,05 ^t	12,39±0,02 ^k	6,6±0,1 ^r	14,1±0,1 ^g	3,4±0,1 ^z	12,18±0,02 ^l	3,64±0,02 ^y
N + FĐ	10,5±0,1 ^m	2,77±0,04 ^{c'}	13,24±0,1 ^j	6,1±0,1 ^s	16,4±0,1 ^e	7,2±0,1 ^q	0,63±0,02 ^f	3,31±0,03 ^{a'}
Σ fenolne kiseline								
K	48,5±0,7 ^y	71,4±1,2 ^{mno}	55,5±0,8 ^w	66,4±0,7 ^{pqr}	73,9±0,9 ^l	80,9±1,2 ^{hi}	70,8±1,1 ^{no}	48,9±1,5 ^y
M	90,7±1,2 ^c	72,0±0,7 ^m	53,0±0,5 ^x	83,8±1,6 ^{fg}	72,1±1,1 ^m	80,2±1,4 ^{ij}	95,5±2,2 ^a	65,9±1,3 ^{qrs}
N	57,1±0,8 ^v	65,6±1,4 ^s	53,7±2,1 ^x	79,4±1,7 ^j	71,6±1,0 ^{mn}	75,4±1,1 ^k	59,4±1,4 ^u	55,9±0,9 ^w
M + FĐ	84,1±1,4 ^f	86,6±0,3 ^{de}	65,0±0,9 ^s	94,4±0,3 ^b	70,4±0,9 ^o	87,1±1,8 ^d	66,9±1,7 ^{pq}	64,8±1,2 ^s
N + FĐ	52,8±0,8 ^x	70,3±0,2 ^o	57,3±0,5 ^v	82,8±1,4 ^g	67,1±0,86 ^p	85,6±1,2 ^e	81,4±0,6 ^h	61,2±1,2 ^t

Različita slova označavaju postojanje statistički značajne razlike (Fisher's LSD) pri nivou pouzdanosti od 0,95 ($p \leq 0,05$) između posmatranih parametara za interakciju $G \times H \times T$.

4.2.4. Sadržaj šećera

Sadržaj u vodi rastvorljivih šećera kao i njihov ukupan sadržaj (zbir pojedinačno određenih šećera), nakon svih primenjenih tretmana u toku obe godine, prikazan je u Tabeli 13, dok je odgovarajući hromatogram prikazan na Slici 15. Kod hibrida ZP504su u kontrolnim uzorcima zabeležen je najveći sadržaj trehaloze (2,00 mg/g s.m.), arabinoze (7,33 mg/g s.m.) i turanoze (11,56 mg/g s.m.) tokom 2016. godine. Kod istog hibrida, tokom 2017. primećen je najveći sadržaj sorbitola (2,76 mg/g s.m.), turanoze (18,88 mg/g s.m.), izomaltotrioze (0,67 mg/g s.m.) i maltoze (42,17 mg/g s.m.). Tokom 2016. godine ZP355su imao je najveći sadržaj glukoze (73,03 mg/g s.m.), fruktoze (45,97 mg/g s.m.), saharoze (91,12 mg/g s.m.), maltoze (27,61 mg/g s.m.) i panoze (2,84 mg/g s.m.), dok je u 2017. imao najveći sadržaj glukoze (56,64 mg/g s.m.), fruktoze (39,37 mg/g s.m.) i rafinoze (117,42 mg/g s.m.). Tokom 2017. u hibridu ZP553su zabeležen je najveći sadržaj panoze (0,79 mg/g s.m.) i maltotrioze (12,55 mg/g s.m.). U kontrolnim uzorcima tokom 2016. najveći sadržaj sorbitola (20,91 mg/g s.m.), gentiobioze (0,55 mg/g s.m.), rafinoze (72,50 mg/g s.m.), izomaltotrioze (1,71 mg/g s.m.) i maltotrioze (3,33 mg/g s.m.) pronađen je kod ZP515su. Kod istog hibrida u toku 2017. zabeležen je najveći sadržaj izomaltoze (18,40 mg/g s.m.), saharoze (86,49 mg/g s.m.) i gentiobioze (2,17 mg/g s.m.). Najveći ukupan sadržaj šećera u kontrolnim uzorcima zabeležen je kod ZP355su tokom obe godine (287,08 mg/g s.m., i 345,29 mg/g s.m., respektivno).



Slika 15. Šećerni profil zrna. Pik 1 - Sorbitol; pik 2 - Trehaloza; pik 3 - Arabinoza; pik 4 - Glukoza; pik 5 - Fruktoza; pik 6 - Izomaltoza; pik 7 - Saharaza; pik 8 - Gentiobioza; pik 9 - Turanoza; pik 10 - Izomaltotrioza; pik 11 - Maltoza; pik 12 - Rafinoza; pik 13 - Panoza i pik 14 - Maltotrioza.

Tabela 13. Sadržaj šećera (mg/g s.m.) nakon primenjenih tretmana u zrnu četiri testirana hibrida.

	ZP504su		ZP355su		ZP553su		ZP515su	
	2016	2017	2016	2017	2016	2017	2016	2017
	Sorbitol							
K	0,28±0,02 ^c	2,76±0,02 ^m	4,7±0,1 ^h	2,48±0,02 ^{nop}	3,20±0,02 ^k	2,16±0,02 ^t	20,9±0,1 ^a	1,72±0,02 ^v
M	1,17±0,08 ^z	1,99±0,02 ^u	3,22±0,05 ^k	2,18±0,02 ^t	3,2±0,4 ^k	3,46±0,04 ^j	11,6±0,1 ^d	2,43±0,02 ^{pq}
N	1,61±0,07 ^w	2,03±0,01 ^u	1,70±0,02 ^v	2,54±0,01 ⁿ	5,25±0,03 ^g	2,45±0,01 ^{opq}	12,2±0,1 ^b	0,74±0,03 ^{b'}
M + FĐ	1,22±0,04 ^z	3,08±0,02 ^l	3,96±0,04 ⁱ	2,15±0,03 ^t	2,33±0,03 ^r	3,17±0,01 ^k	11,08±0,04 ^e	1,33±0,01 ^y
N + FĐ	2,41±0,08 ^q	2,50±0,02 ^{no}	1,55±0,02 ^x	2,25±0,01 ^s	7,83±0,04 ^f	2,20±0,02 st	11,95±0,10 ^c	0,90±0,01 ^{a'}
	Trehaloza							
K	2,00±0,02 ^g	0,98±0,07 ^m	1,98±0,08 ^g	12,0±0,1 ^a	0,56±0,03 ^q	1,2±0,1 ^k	1,26±0,02 ^k	1,34±0,02 ^j
M	0,48±0,06 ^r	0,78±0,07 ^o	1,49±0,08 ⁱ	0,94±0,07 ^{mm}	0,45±0,08 ^{rs}	2,80±0,03 ^e	0,27±0,03 ^{tu}	2,89±0,02 ^d
N	0,40±0,03 ^s	0,45±0,02 ^{rs}	0,43±0,04 ^{rs}	0,66±0,03 ^p	1,69±0,03 ^h	2,03±0,08 ^g	0,30±0,03 ^t	2,37±0,01 ^f
M + FĐ	1,37±0,02 ^j	0,92±0,05 ⁿ	1,11±0,07 ^l	0,18±0,01 ^v	1,14±0,02 ^l	1,48±0,07 ⁱ	0,26±0,03 ^{tu}	0,13±0,04 ^v
N + FĐ	1,68±0,04 ^h	0,43±0,03 ^{rs}	1,22±0,05 ^k	0,31±0,02 ^t	2,42±0,06 ^f	5,00±0,05 ^c	0,22±0,04 ^{um}	5,35±0,05 ^b
	Arabinoza							
K	7,3±0,1 ^c	0,51±0,04 ^t	4,23±0,06 ^h	1,4±0,1 ^m	4,70±0,03 ^g	0,10±0,01 ^{xy}	0,97±0,02 ^q	1,27±0,01 ⁿ
M	3,71±0,04 ^j	0,60±0,05 ^s	2,23±0,03 ^l	0,45±0,05 ^t	4,8±0,1 ^f	1,0±0,1 ^q	0,07±0,01 ^y	0,50±0,04 ^t
N	4,84±0,03 ^f	0,74±0,04 ^r	0,30±0,03 ^u	0,70±0,03 ^r	7,6±0,1 ^b	1,10±0,04 ^p	0,12±0,01 ^{xy}	2,62±0,02 ^k
M + FĐ	15,7±0,1 ^a	0,29±0,02 ^{uv}	3,88±0,04 ⁱ	1,44±0,02 ^{mm}	6,7±0,1 ^d	1,17±0,05 ^o	0,09±0,01 ^{xy}	0,10±0,01 ^{xy}
N + FĐ	3,94±0,04 ⁱ	1,4±0,1 ^m	2,59±0,04 ^k	0,22±0,01 ^w	6,63±0,04 ^e	0,23±0,02 ^{vw}	0,09±0,01 ^{xy}	0,15±0,01 ^x
	Glukoza							
K	20,8±1,0 ^w	48,7±0,6 ^g	73,0±1,0 ^b	56,6±1,7 ^c	30,5±0,4 ^r	43,9±0,5 ^j	30,7±0,9 ^r	44,3±0,9 ^j
M	20,9±0,8 ^w	30,0±1,3 ^t	74,1±0,9 ^a	42,3±0,6 ^k	33,8±0,6 ^p	54,5±1,1 ^e	47,6±0,5 ^h	45,7±0,9 ⁱ
N	22,6±0,2 ^v	16,0±0,9 ^z	26,70±0,8 ^t	39,6±1,8 ^l	49,0±0,7 ^f	17,4±0,7 ^y	48,2±1,1 ^{gh}	43,4±1,2 ^j
M + FĐ	37,4±0,3 ⁿ	23,1±1,2 ^v	32,9±0,5 ^q	42,1±1,4 ^k	33,1±0,6 ^{pq}	24,7±1,2 ^u	18,71±0,6 ^x	17,7±1,0 ^y
N + FĐ	38,5±0,9 ^m	26,2±0,30 ^t	47,7±0,3 ^h	18,9±0,6 ^x	36,5±0,6 ^o	28,6±0,4 ^s	24,8±0,4 ^u	55,8±0,7 ^d

Različita slova označavaju postojanje statistički značajne razlike (Fisher's LSD) pri nivou pouzdanosti od 0,95 ($p \leq 0,05$) između posmatranih parametara za interakciju $G \times H \times T$.

Tabela 13. Nastavak

	ZP504 _{su}		ZP355 _{su}		ZP553 _{su}		ZP515 _{su}	
	2016	2017	2016	2017	2016	2017	2016	2017
Fruktoza								
K	19,0±0,1 ^t	30,2±0,9 ^k	46,0±0,6 ^d	39,4±1,9 ^f	28,6±0,2 ^m	34,4±1,3 ^{hu}	27,2±0,5 ^{no}	28,7±0,3 ^{lm}
M	28,1±0,5 ^{mn}	22,0±2,0	47,60±0,7 ^c	34,6±1,5 ^{hi}	27,9±0,5 ^{mn}	58,8±0,8 ^a	46,5±0,6 ^d	28,2±1,2 ^{lm}
N	29,7±0,7 ^{kl}	13,7±0,7 ^x	18,6±0,2 ^{tu}	31,8±1,5 ^j	49,7±0,8 ^b	17,7±0,7 ^{uv}	38,6±0,4 ^f	17,5±1,0 ^v
M + FĐ	33,7±0,9 ⁱ	28,7±1,5 ^{lm}	42,5±0,4 ^e	48,2±1,2 ^c	26,2±0,4 ^p	36,4±1,5 ^g	13,5±0,2 ^x	15,6±0,7 ^w
N + FĐ	35,0±1,0 ^h	11,3±0,7 ^y	24,3±0,4 ^q	14,1±0,9 ^x	23,3±0,1 ^r	26,9±1,3 ^{op}	28,4±0,4 ^m	26,2±0,9 ^p
Izomaltoza								
K	1,00±0,08 ^{qrst}	4,09±0,03 ^o	8,63±0,07 ^m	3,90±0,03 ^o	0,06±0,02 ^t	6,35±0,05 ⁿ	1,50±0,03 ^{pqr}	18,4±0,3 ^j
M	1,35±0,02 ^{qrs}	57,1±2,3 ^b	5,99±0,09 ⁿ	58,1±1,9 ^b	0,14±0,03 st	34,5±0,9 ^f	2,63±0,03 ^p	22,1±0,4 ⁱ
N	0,14±0,01 st	31,5±1,7 ^g	1,95±0,02 ^{pq}	11,5±0,5 ^l	2,09±0,04 ^{pq}	46,1±1,2 ^d	1,42±0,02 ^{pqr}	17,1±1,0 ^k
M + FĐ	1,06±0,02 ^{qrst}	40,5±0,7 ^e	1,48±0,01 ^{pqr}	68,6±0,9 ^a	0,26±0,04 ^{rst}	51,2±1,0 ^c	1,93±0,03 ^{pq}	16,4±1,5 ^k
N + FĐ	0,11±0,01 st	16,4±1,1 ^k	1,24±0,02 ^{qrst}	19,3±1,3 ^j	4,25±0,02 ^o	9,39±0,94 ^m	1,06±0,01 ^{qrst}	24,2±0,8 ^h
Saharoza								
K	66,9±0,8 ^l	48,0±1,1 ^t	91,1±1,9 ^d	55,8±0,7 ^q	82,9±1,2 ^g	35,7±0,8 ^{b'}	58,4±1,7 ^p	86,5±0,7 ^e
M	46,4±1,3 ^u	43,6±1,4 ^w	49,1±1,4 ^s	51,9±1,3 ^r	93,5±1,5 ^b	30,9±0,8 ^{c'}	42,0±1,1 ^x	68,8±1,3 ^k
N	37,9±1,0 ^z	64,3±0,7 ⁿ	52,3±1,3 ^r	72,7±0,8 ^j	83,4±0,7 ^{fg}	78,5±0,6 ^h	30,3±0,8 ^{c'}	76,3±0,6 ⁱ
M + FĐ	41,1±1,3 ^y	61,5±0,6 ^o	65,5±0,8 ^m	86,4±0,8 ^e	48,6±1,4 st	43,7±0,5 ^w	23,4±1,0 ^{e'}	146,3±1,4 ^a
N + FĐ	44,7±1,2 ^v	16,6±0,4 ^{f'}	36,6±1,3 ^{a'}	4,61±0,1 ^{g'}	56,3±1,0 ^q	83,8±1,0 ^f	28,6±1,1 ^{d'}	92,5±1,0 ^c
Gentiobioza								
K	0,38±0,03 ^q	1,16±0,02 ^e	0,37±0,05 ^q	1,14±0,01 ^e	0,45±0,00 ^p	1,25±0,02 ^d	0,55±0,09 ^{no}	2,17±0,03 ^a
M	0,45±0,05 ^p	1,34±0,00 ^c	0,34±0,05 ^q	1,76±0,03 ^b	0,52±0,09 ^o	0,85±0,02 ^{jk}	0,12±0,01 ^t	0,61±0,01 ^{mn}
N	0,36±0,03 ^q	1,28±0,02 ^{cd}	0,17±0,02 ^{rst}	1,02±0,02 ^{fg}	0,95±0,02 ^{hi}	1,22±0,02 ^d	0,80±0,09 ^{kl}	0,66±0,05 ^m
M + FĐ	0,21±0,03 ^{rs}	0,92±0,00 ⁱ	0,15±0,02 st	0,99±0,01 ^{gh}	0,45±0,07 ^p	0,79±0,02 ^l	0,19±0,03 ^{rs}	1,24±0,01 ^d
N + FĐ	0,22±0,02 ^r	0,91±0,01 ^{ij}	0,33±0,05 ^q	0,85±0,01 ^{jk}	1,33±0,07 ^c	0,94±0,03 ^{hi}	0,22±0,03 ^r	1,07±0,03 ^f

Različita slova označavaju postojanje statistički značajne razlike (Fisher's LSD) pri nivou pouzdanosti od 0,95 ($p \leq 0,05$) između posmatranih parametara za interakciju $G \times H \times T$.

Tabela 13. Nastavak

	ZP504su		ZP355su		ZP553su		ZP515su	
	2016	2017	2016	2017	2016	2017	2016	2017
Rafinoza								
K	18,3±0,2 ^{wxy}	115,2±1,6 ^c	18,4±0,2 ^{wx}	117,4±1,4 ^b	14,9±0,1 ^{a'}	101,4±0,8 ^d	72,5±0,93	72,6±0,82
M	17,5±0,2 ^{yz}	18,2±0,5 ^{wxyz}	33,0±0,5 ^o	47,4±0,5 ⁱ	4,4±0,1 ^f	28,7±0,3 ^f	45,2±0,5 ^j	119,9±1,0 ^a
N	7,6±0,1 ^{d'}	56,7±1,7 ^g	27,4±0,3 ^s	40,8±0,5 ^l	22,5±0,2 ^{uv}	36,8±0,3 ⁿ	60,1±0,7 ^f	39,3±0,9 ^m
M + FĐ	18,9±0,3 ^w	23,2±0,6 ^t	22,1±0,2 ^{uv}	31,5±0,4 ^p	5,4±0,1 ^{e'}	21,8±1,0 ^v	45,1±0,6 ^j	17,5±0,5 ^z
N + FĐ	8,78±0,02 ^{c'}	17,6±0,9 ^{xyz}	11,3±0,2 ^{b'}	41,6±0,0 ^k	22,7±0,1 ^{tu}	37,1±0,7 ⁿ	49,7±0,7 ^h	30,2±1,0 ^q
Turanoza								
K	11,6±0,1 ^r	18,9±0,1 ^h	8,56±0,07 ^t	16,0±0,1 ⁿ	4,10±0,02 ^{b'}	16,0±0,1 ⁿ	4,42±0,07 ^{a'}	15,4±0,2 ^o
M	8,98±0,06 ^s	17,0±0,2 ^l	8,31±0,05 ^u	17,3±0,2 ^k	22,96±0,02 ^c	21,3±0,2 ^d	2,53±0,02 ^{e'}	20,4±0,2 ^f
N	5,76±0,04 ^y	18,4±0,1 ⁱ	3,30±0,03 ^{d'}	16,2±0,1 ^m	14,5±0,1 ^p	18,1±0,1 ^j	3,50±0,04 ^{c'}	18,2±0,1 ^j
M + FĐ	11,93±0,04 ^q	24,6±0,1 ^b	6,21±0,06 ^x	20,3±0,3 ^f	26,5±0,1 ^a	19,9±0,1 ^g	7,16±0,09 ^v	21,2±0,2 ^d
N + FĐ	5,81±0,06 ^y	11,6±0,1 ^r	3,25±0,05 ^{d'}	8,52±0,06 ^t	20,6±0,1 ^e	7,0±0,1 ^w	4,66±0,06 ^z	8,30±0,07 ^u
Izomaltotrijoza								
K	0,16±0,01 ^{c'}	0,67±0,05 ^h	0,73±0,07 ^g	0,43±0,04 ^p	1,03±0,00 ^e	0,45±0,04 ^o	1,71±0,03 ^c	0,51±0,06 ⁿ
M	0,07±0,01 ^{i'}	0,22±0,02 ^z	0,65±0,08 ⁱ	0,64±0,07 ^j	0,63±0,07 ^k	0,56±0,06 ^m	2,53±0,02 ^b	0,35±0,03 ^q
N	0,04±0,00 ^{j'}	0,63±0,03 ^l	0,32±0,03 ^r	0,26±0,01 ^w	1,03±0,02 ^e	0,65±0,03 ^j	0,21±0,02 ^{b'}	0,26±0,02 ^v
M + FĐ	0,09±0,01 ^{g'}	0,21±0,01 ^{a'}	0,27±0,03 ^u	0,23±0,03 ^y	0,31±0,05 ^s	0,20±0,01 ^{b'}	1,04±0,01 ^d	0,14±0,02 ^{d'}
N + FĐ	0,11±0,01 ^{f'}	0,12±0,01 ^{e'}	0,08±0,01 ^{h'}	0,25±0,02 ^x	0,88±0,05 ^f	0,26±0,03 ^v	2,75±0,04 ^a	0,28±0,02 ^t
Maltoza								
K	11,1±0,1 ^{rs}	42,2±1,8 ^g	27,61±0,04 ^k	36,2±1,6 ^h	14,17±0,01 ^q	34,1±0,9 ⁱ	10,53±0,02 ^{rs}	24,4±0,7 ^l
M	6,47±0,08 ^u	45,5±1,3 ^e	24,40±0,04 ^l	43,7±1,1 ^f	18,77±0,03 ^o	54,4±1,0 ^c	17,05±0,02 ^p	31,5±1,3 ^j
N	0,70±0,00 ^w	44,3±1,0 ^{ef}	10,29±0,01 ^s	43,2±0,6 ^{fg}	11,62±0,02 ^r	51,1±0,6 ^d	1,95±0,00 ^v	21,0±0,9 ⁿ
M + FĐ	5,58±0,08 ^u	53,2±1,3 ^c	22,38±0,02 ^m	66,0±1,2 ^b	16,97±0,03 ^p	71,0±1,9 ^a	20,72±0,03 ⁿ	31,0±1,4 ^j
N + FĐ	0,80±0,01 ^{vw}	36,2±0,1 ^h	8,47±0,01 ^t	43,4±1,0 ^{fg}	24,99±0,01 ^l	33,4±1,5 ⁱ	13,14±0,02 ^q	30,5±1,0 ^j

Različita slova označavaju postojanje statistički značajne razlike (Fisher's LSD) pri nivou pouzdanosti od 0,95 ($p \leq 0,05$) između posmatranih parametara za interakciju $G \times H \times T$.

Tabela13. Nastavak

	ZP504 _{su}		ZP355 _{su}		ZP553 _{su}		ZP515 _{su}	
	2016	2017	2016	2017	2016	2017	2016	2017
Panoza								
K	1,09±0,09 ^l	0,14±0,01 ^c	2,84±0,04 ^d	0,24±0,02 ^x	0,40±0,02 ^t	0,79±0,06	0,25±0,04 ^w	0,17±0,02 ^b
M	3,41±0,04 ^b	0,03±0,00 ^h	2,39±0,04 ^f	0,046±0,005 ^h	0,79±0,01 ^p	0,02±0,00 ⁱ	0,04±0,00 ^g	0,02±0,00 ^j
N	0,30±0,02 ^v	0,01±0,00 ^j	1,70±0,02 ^g	0,44±0,02 ^s	3,34±0,06 ^c	1,12±0,04 ^k	0,12±0,01 ^d	1,07±0,06 ^m
M + FĐ	1,41±0,02 ^j	0,56±0,03 ^r	4,04±0,04 ^a	0,96±0,05 ⁿ	1,64±0,02 ^{hi}	0,34±0,02 ^u	0,14±0,02 ^c	0,20±0,02 ^z
N + FĐ	0,61±0,07 ^q	0,21±0,01 ^y	2,41±0,04 ^e	0,19±0,01 ^a	1,45±0,08 ⁱ	0,08±0,01 ^f	0,34±0,04 ^u	0,10±0,01 ^e
Maltotrioza								
K	0,89±0,07 ^d	3,58±0,03 ^g	1,30±0,02 ^y	3,43±0,03 ^h	0,44±0,03 ^f	12,55±0,08 ^a	3,33±0,06 ⁱ	8,00±0,09 ^b
M	1,33±0,02 ^x	6,79±0,06 ^c	1,08±0,02 ^c	5,02±0,05 ^e	1,22±0,03 ^z	1,36±0,01 ^w	1,11±0,01 ^b	1,66±0,01 ^t
N	0,26±0,02 ^k	6,32±0,03 ^d	0,41±0,04 ^h	2,98±0,01 ^l	0,20±0,03 ^l	2,67±0,01 ^m	1,20±0,01 ^a	2,52±0,02 ^o
M + FĐ	0,29±0,04 ^j	1,66±0,01 ^s	0,42±0,04 ^g	2,66±0,04 ⁿ	0,07±0,01 ⁿ	1,50±0,01 ^u	1,78±0,02 ^q	1,99±0,02 ^p
N + FĐ	0,33±0,04 ⁱ	1,71±0,01 ^r	0,57±0,09 ^e	3,85±0,03 ^f	0,10±0,01 ^m	3,10±0,03 ^k	1,38±0,02 ^v	3,14±0,03 ^j
Σ šećeri								
K	160,7±2,8 ^t	315,6±8,2 ^c	287,1±7,6 ^e	345,3±9,5 ^b	184,5±4,3 ^r	289,4±6,2 ^e	223,7±19,1 ⁿ	304,7±5,4 ^d
M	139,8±3,9 ^u	244,2±10,5 ^{kl}	252,3±6,3 ^j	305,1±8,9 ^d	211,4±5,3 ^o	291,4±7,8 ^e	213,4±10,8 ^o	343,8±8,1 ^b
N	111,3±3,2 ^v	255,4±8,5 ^{ij}	144,6±4,0 ^p	263,3±7,7 ^h	250,2±6,6 ^{jk}	275,7±6,0 ^{fg}	192,9±11,7 ^q	243,1±6,4 ^l
M + FĐ	169,3±4,0 ^s	260,9±8,3 ^{hi}	204,9±5,0 ^p	370,6±7,9 ^a	168,4±4,5 ^s	275,8±9,5 ^{fg}	139,5±10,5 ^u	270,3±7,7 ^g
N + FĐ	141,7±5,1 ^u	142,0±6,4 ^u	140,8±3,6 ^u	157,3±6,3	205,3±7,8 ^p	236,9±7,7 ^m	161,3±11,2 ^t	278,1±6,3 ^f

Različita slova označavaju postojanje statistički značajne razlike (Fisher's LSD) pri nivou pouzdanosti od 0,95 ($p \leq 0,05$) između posmatranih parametara za interakciju $G \times H \times T$.

4.2.4.1. Sadržaj šećera nakon primene herbicida

Kod hibrida ZP504*su* nakon primene mezotriona zabeleženo je značajno smanjenje sadržaja trehaloze, saharoze, turanoze, izomaltotrioze i povećanje nivoa maltotrioze. U ZP504*su* nikosulfuron je doveo do značajnog smanjenja sadržaja trehaloze, rafinoze, turanoze, izomaltotrioze i panoze. Značajno smanjenje u sadržaju sorbitola, trehaloze, arabinoze, saharoze i panoze nakon primene mezotriona zabeleženo je kod hibrida ZP355*su*. Nikosulfuron je kod ZP355*su* izazvao značajno smanjenje sadržaja trehaloze, arabinoze, glukoze, fruktoze, gentiobioze, izomaltotrioze i maltotrioze. Hibrid ZP553*su* je pokazao značajno povećanje sadržaja arabinoze, glukoze, turanoze i maltoze i ujedno smanjenje rafinoze nakon primene mezotriona. Kod istog hibrida uočeno je značajno povećanje sadržaja sorbitola, arabinoze, izomaltoze, turanoze, panoze i smanjenje rafinoze i maltotrioze nakon primene nikosulfurona. Mezo-trion je kod hibrida ZP515*su* doveo do značajnog smanjenja sadržaja arabinoze, saharoze, panoze, gentiobioze i maltotrioze i ujedno do povećanja glukoze i maltoze. Nakon primene nikosulfurona kod ZP515*su* zapaženo je značajno smanjenje sadržaja sorbitola, saharoze, rafinoze, izomaltotrioze, maltoze i maltotrioze.

4.2.4.2. Sadržaj šećera nakon primene herbicida i folijarnog đubriva

Hibrid ZP504*su* je nakon primene tretmana M + FĐ pokazao značajno smanjenje sadržaja trehaloze, gentiobioze, izomaltotrioze i maltotrioze i povećanja sorbitola, turanoze i panoze u poređenju sa kontrolom (Tabela 13). Kod ZP504*su* N + FĐ doveo je do značajnog smanjenja sadržaja trehaloze, gentiobioze, izomaltotrioze i maltotrioze, turanoze, rafinoze i maltoze, kao i povećanja sorbitola. Nakon primene M + FĐ kod ZP355*su* zapaženo je značajno smanjenje sadržaja sorbitola, trehaloze, glukoze, gentiobioze, maltotrioze i izomaltotrioze i povećanje panoze u poređenju sa kontrolom (Tabela 13). Kombinacija N + FĐ dovela je kod ZP355*su* do značajnog smanjenja sadržaja sorbitola, trehaloze, arabinoze, fruktoze, glukoze, saharoze, rafinoze, turanoze, izomaltotrioze i panoze. Isti tretman je kod hibrida ZP553*su* doveo do značajnog povećanja sadržaja trehaloze, arabinoze, izomaltoze, i smanjenja fruktoze, izomaltotrioze i maltotrioze u poređenju sa kontrolom (Tabela 13). Kod ZP553*su* kombinacija M + FĐ izazvala je značajno smanjenje sadržaja rafinoze, maltotrioze i izomaltotrioze i povećanje trehaloze, arabinoze, turanoze i maltoze u poređenju sa kontrolom. Kod ZP515*su* nakon primene M + FĐ zabeleženo je značajno smanjenje sadržaja sorbitola, trehaloze, arabinoze, glukoze, fruktoze, gentiobioze, rafinoze, izomaltotrioze i maltotrioze kao i povećanje maltoze i turanoze u poređenju sa kontrolom. Isti hibrid je nakon primene N + FĐ pokazao značajno smanjenje sadržaja sorbitola, trehaloze, arabinoze, gentiobioze, rafinoze i maltotrioze i povećanja maltoze (Tabela 13).

Kombinacija M + FĐ dovela je do značajnog povećanja sadržaja trehaloze, fruktoze, rafinoze, turanoze i smanjenja gentiobioze i maltotrioze kod hibrida ZP504*su* u poređenju sa mezotrionom. U istom hibridu tretman N + FĐ doveo je do značajnog povećanja sadržaja sorbitola, glukoze i panoze i smanjenja gentiobioze u poređenju sa nikosulfuronom (Tabela 13). Kod ZP355*su* nakon M + FĐ zabeleženo je značajno povećanje sadržaja arabinoze, saharoze i panoze i smanjenje rafinoze, gentiobioze, izomaltotrioze i maltotrioze u poređenju sa mezotrionom. Kombinacija N + FĐ je kod ZP355*su* izazvala značajno smanjenje sadržaja sorbitola, saharoze, izomaltotrioze i povećanje maltotrioze u poređenju sa nikosulfuronom (Tabela 13). Hibrid ZP553*su* je nakon primene M + FĐ pokazao značajno smanjenje sadržaja sorbitola, fruktoze, gentiobioze, rafinoze i izomaltotrioze, i ujedno povećanje arabinoze i panoze, u poređenju mezotrionom.

Kod ZP553*su* nakon primene N + FĐ zabeleženo je značajno povećanje sadržaja trehaloze i smanjenje arabinoze, izomaltotrioze i panoze u poređenju sa nikosulfuronom. Tretman N + FĐ je kod hibrida ZP515*su* doveo do značajnog smanjenja sadržaja rafinoze i povećanja izomaltotrioze, maltoze i maltotrioze u poređenju sa nikosulfuronom. Kod ZP515*su* nakon M + FĐ zabeleženo je značajno povećanje sadržaja gentiobioze, turanoze i panoze, i ujedno smanjenje glukoze, fruktoze, izomaltotrioze i maltotrioze u poređenju sa nikosulfuronom (Tabela 13).

4.2.5. Sadržaj ukupnih fenola, glutaciona i antioksidativna aktivnost zrna

Sadržaj TPC, GSH, i DPPH' nakon svih primenjenih tretmana u toku obe godine, prikazan je u Tabeli 14. Najveći sadržaj TPC (1,38 mg EFK/g s.m.) i GSH (383,14 nmol/g s.m.) kao i DPPH' (4,06 μmol ET/g s.m.) zabeležen je kod hibrida ZP553*su* i ZP355*su*, respektivno tokom 2016. godine u kontrolnim uzorcima. Tokom 2017. godine najveći TPC (0,97 mg EFK/g s.m.), GSH (555,05 nmol/g s.m.) kao i DPPH' (4,26 μmol ET/g s.m.) zabeležen je kod hibrida ZP355*su*, ZP504*su* i ZP553*su*, respektivno, u kontrolnim uzorcima (Tabela 14).

4.2.5.1. Sadržaj ukupnih fenola, glutaciona i antioksidativna aktivnost zrna nakon primene herbicida

Jedino kod hibrida ZP553*su* i ZP515*su* nakon primene oba herbicida zabeležen značajan porast TPC (Ta je bela 14).

4.2.5.2. Sadržaj ukupnih fenola, glutaciona i antioksidativna aktivnost zrna nakon primene herbicida i folijarnog đubriva

Tretman M + FĐ je kod hibrida ZP504*su* doveo do značajnog povećanja GSH u poređenju sa kontrolom. Tretmani M + FĐ i N + FĐ kod hibrida ZP515*su* doveli su do značajnog povećanja GSH u poređenju sa mezotriptomom i nikosulfuronom, respektivno. Kod hibrida ZP355*su* i ZP553*su* nakon primene N + FĐ zabeleženo je značajno povećanje, odnosno smanjenje TPC, GSH i DPPH' u poređenju sa nikosulfuronom (Tabela 14).

Tabela 14. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja (TPC), glutationa (GSH) i antioksidativna aktivnost (DPPH) zrna šećerca.

	ZP504su		ZP355su		ZP553su		ZP515su	
	2016	2017	2016	2017	2016	2017	2016	2017
	DPPH ($\mu\text{mol ET/g s.m.}$)							
K	3,91±0,07 ^{pqrst}	3,74±0,01 ^u	4,06±0,08 ^{mno}	4,17±0,051 ^m	4,05±0,03 ^{mno}	4,26±0,01 ^{kl}	3,94±0,22 ^{opqrs}	4,05±0,03 ^{no}
M	4,01±0,02 ^{op}	4,48±0,02 ^{hi}	3,96±0,03 ^{opqr}	4,65±0,05 ^{fg}	4,02±0,18 ^{op}	4,43±0,05 ^{ij}	3,99±0,03 ^{opq}	5,01±0,05 ^{ab}
N	3,79±0,08 ^{tu}	4,34±0,03 ^{jk}	3,86±0,03 ^{rstu}	4,54±0,01 ^{ghi}	3,89±0,09 ^{pqrst}	4,86±0,04 ^{cd}	3,86±0,04 ^{rsty}	2,91±0,04 ^x
M + FĐ	3,80±0,05 ^{tu}	4,67±0,05 ^{ef}	3,87±0,06 ^{qrst}	4,56±0,03 ^{fgh}	3,99±0,01 ^{opq}	4,63±0,03 ^{fg}	3,82±0,01 ^{stu}	4,92±0,01 ^{bc}
N + FĐ	3,82±0,03 ^{stu}	3,29±0,05 ^w	4,00±0,06 ^{op}	3,99±0,01 ^{opq}	5,06±0,05 ^a	4,17±0,051 ^{mn}	4,78±0,01 ^{de}	3,53±0,01 ^v
	TPC (mg EFK/g s.m.)							
K	1,17±0,05 ^{lmn}	0,96±0,03 ^{rs}	1,56±0,05 ^e	0,97±0,04 ^{qr}	1,38±0,02 ^g	0,88±0,06 ^t	1,15±0,00 ^{mno}	0,72±0,02 ^v
M	1,57±0,03 ^e	1,31±0,01 ^{hij}	1,36±0,05 ^{gh}	1,13±0,04 ^{no}	1,73±0,02 ^c	1,22±0,02 ^{kl}	1,39±0,02 ^g	0,86±0,03 ^t
N	1,11±0,03 ^{no}	1,29±0,03 ^{ij}	1,39±0,01 ^{fg}	1,33±0,01 ^{ghi}	1,63±0,04 ^d	1,21±0,03 ^{klm}	1,26±0,05 ^{jk}	0,80±0,05 ^u
M + FĐ	1,45±0,02 ^f	1,03±0,04 ^{pq}	1,34±0,04 ^{ghi}	1,03±0,02 ^q	1,76±0,03 ^c	1,02±0,02 ^{qr}	1,35±0,06 ^{ghi}	1,54±0,01 ^e
N + FĐ	1,09±0,03 ^{op}	0,66±0,04 ^v	1,86±0,02 ^b	0,91±0,02 st	2,01±0,06 ^a	0,88±0,05 ^t	1,53±0,01 ^e	0,66±0,03 ^v
	GSH (nmol/g s.m.)							
K	276,9±6,1 ^x	555,1±20,5 ^h	358,3±11,4 st	504,8±3,1 ^{kl}	383,2±11,3 ^{pqr}	541,6±11,7 ^{hi}	278,5±3,0 ^{wx}	529,5±20,1 ^{ij}
M	366,1±1,2 ^{qrst}	722,8±15,7 ^d	309,6±8,6 ^v	656,1±19,5 ^f	324,01±12,0 ^{uv}	819,3±6,8 ^b	316,9±10,3 ^v	452,3±12,5 ^m
N	344,9±2,4 ^{tu}	528,4±9,0 ^{ijk}	302,0±6,1 ^{vw}	697,6±3,7 ^e	386,9±1,8 ^{pq}	832,3±10,5 ^b	360,7±8,6 ^{rst}	313,3±18,0 ^v
M + FĐ	372,7±1,2 ^{pqrst}	961,3±24,1 ^a	312,2±1,2 ^v	540,8±4,4 ^{hi}	391,2±2,5 ^{op}	592,5±3,1 ^g	411,8±19,0 ^{no}	658,5±15,7 ^f
N + FĐ	394,6±6,2 ^{op}	523,5±23,0 ^{ijk}	354,6±1,2 st	508,2±14,8 ^{kl}	485,9±19,2 ^l	760,2±16,3 ^c	432,9±1,2 ^{mn}	506,5±13,3 ^{kl}

Različita slova označavaju postojanje statistički značajne razlike (Fisher's LSD) pri nivou pouzdanosti od 0,95 ($p \leq 0,05$) između posmatranih parametara za interakciju $G \times H \times T$.

4.3. Prinos svežeg zrna kukuruza šećerca

Nakon analize varijanse utvrđeno je da su godina i genotip pokazali značajan uticaj ($p \leq 0,05$) na prinos svežeg zrna, što nije bio slučaj sa primenjenim tretmanima (Prilog 4). Iako primenjeni tretmani nisu imali uticaj na prinos zrna, iz Tabele 15 se vidi da je najveći prinos klipa (8,91 t/ha), u 2016. godini, zabeležen u tretmanu sa herbicidom mezotrionom, kod hibrida ZP355su. Slično, u 2017. godini, najveći prinos klipa (5,57 t/ha) pokazao je isti hibrid, ali u tretmanu sa nikosulfuronom. Najviši prosečni prinos klipa, tokom obe godine ispitivanja, zabeležen je kod hibrida ZP355su. Suprotno, najniži prosečni prinos klipa, tokom obe godine ispitivanja, pokazao je hibrid ZP504su. Nakon primene tretmana M + FĐ i N + FĐ zabeleženo je neznačajno smanjenje prinosa zrna kod hibrida ZP504su u poređenju sa kontrolom tokom obe godine, suprotno od hibrida ZP515su (Tabela 15).

Tabela 15. Prinos svežeg zrna (t/ha) četiri hibrida šećerca tokom 2016. i 2017. godine nakon primenjenih tretmana.

Tretman	ZP504su		ZP355su		ZP553su		ZP515su	
	2016	2017	2016	2017	2016	2017	2016	2017
K	5,8±0,6	3,9±0,6	8,8±0,7	3,88±0,8	6,2±0,9	3,7±0,7	6,1 ±0,3	3,0±0,3
M	4,5±0,5	2,5±0,3	8,9±0,5	3,43±0,9	5,0±0,8	3,9±0,9	5,7±0,2	3,9±0,6
N	4,8±0,3	4,2±0,7	7,6±0,5	5,57±0,6	6,3±0,2	3,8 ±0,7	6,5±0,5	3,7±0,5
M + FĐ	5,7±0,6	3,7±0,3	8,4±0,3	4,42±0,7	7,1±0,7	3,6±0,5	7,1±0,4	4,1±0,2
N + FĐ	4,6±0,1	3,4±0,9	8,10±0,7	4,6 ±0,6	7,0±0,8	3,9±0,3	6,7±0,2	3,5±0,2
Prosek	5,1±0,6 ^c	3,5±0,7 ^e	8,4±0,5 ^a	4,4±0,8 ^{cd}	6,3±0,8 ^b	3,8±0,1 ^{de}	6,4±0,5 ^b	3,6±0,4 ^e

Različita slova označavaju postojanje statistički značajne razlike (Fisher's LSD) pri nivou pouzdanosti od 0,95 ($p \leq 0,05$) između ispitivanih hibrida i dobijenih vrednosti prinosa.

4.3.1. Zavisnost prinosa i sadržaja fitohemikalija u listu

Regresiona analiza je korišćena u cilju utvrđivanja linearne zavisnosti između prinosa i prosečnog sadržaja sekundarnih metabolita u listu tokom obe godine istraživanja, u fazama I i II (Tabele 16 i 17).

U fazi I (Tabela 16), kod hibrida ZP504su uočena je negativna korelacija između prinosa i sadržaja β -karotena ($r = -0,77$; $P \leq 0,05$) kao i sadržaja p -kumarinske kiseline ($r = -0,64$; $P \leq 0,05$). Ipak, pozitivna korelacija u istom hibridu zabeležena je između prinosa i sadržaja cimetine kiseline ($r = 0,77$; $P \leq 0,05$). Negativne korelacije između prinosa i sadržaja L + Z ($r = -0,72$; $P \leq 0,05$) i protokatehinske kiseline ($r = -0,91$; $P \leq 0,001$) i istovremeno pozitivna korelacija sa cimetenom kiselinom ($r = 0,80$; $P \leq 0,05$) primećene su kod ZP355su. U hibridu ZP553su zabeležena je negativna korelacija između β -karotena ($r = -0,77$; $P \leq 0,05$), p -kumarinske kiseline ($r = -0,63$; $P \leq 0,05$) i GSH ($r = -0,73$; $P \leq 0,05$) i prinosa (Tabela 16).

S druge strane, u istom hibridu je primećena pozitivna korelacija između sadržaja cimetne kiseline ($r = 0,94$; $P \leq 0,001$) i TPC ($r = 0,82$; $P \leq 0,01$). Negativne korelacije između prinosa i sadržaja *p*-kumarinske kiseline ($r = -0,91$; $P \leq 0,001$) i DPPH* ($r = -0,73$; $P \leq 0,05$) uočene su kod ZP515su (Tabela 16). U istom hibridu, takođe primećene su i pozitivne korelacije između prinosa i sadržaja cimetne kiseline ($r = 0,82$; $P \leq 0,01$), TPC ($r = 0,65$; $P \leq 0,05$) i GSH ($r = 0,71$; $P \leq 0,05$).

Tabela 16. Vrednost koeficijenta korelacije zavisnosti sadržaja fitohemikalija i prinosa u fazi I lista.

Fitohemikalije	ZP504su	ZP355su	ZP553su	ZP515su
L + Z	-0,37	-0,72*	-0,12	0,05
β -karoten	-0,77*	-0,91***	-0,77*	-0,45
Protokatehinska kiselina	0,03	0,74*	-0,21	-0,39
<i>p</i> -Kumarinska kiselina	-0,64*	-0,48	-0,63*	-0,91***
Cimetna kiselina	0,77*	0,80*	0,94***	0,82**
Sinapinska kiselina	-0,01	0,25	0,71*	0,32
DPPH*	-0,61	-0,14	-0,61	-0,73*
TPC	0,43	0,22	0,82**	0,65*
GSH	-0,10	0,43	-0,73*	0,71*

*, **, ***Značajno na nivou poverenja od 0,05; 0,01; 0,001 respektivno.

U fazi II (Tabela 17), kod hibrida ZP504su uočena je negativna korelacija između prinosa i sadržaja L + Z ($r = -0,71$; $P \leq 0,05$) kao i TPC ($r = -0,76$; $P \leq 0,05$). Negativne korelacije između prinosa i sadržaja L + Z ($r = -0,76$; $P \leq 0,05$), protokatehinske kiseline ($r = -0,89$; $P \leq 0,001$) i DPPH* ($r = -0,78$; $P \leq 0,05$), i GSH ($r = -0,69$; $P \leq 0,05$) zabeležene su kod ZP355su. U istom hibridu uočene su i pozitivne korelacije između prinosa i sadržaja *p*-kumarinske kiseline ($r = 0,83$; $P \leq 0,01$) kao i TPC ($r = 0,83$; $P \leq 0,01$). U hibridu ZP553su zabeležena je negativna korelacija između prinosa i sadržaja β -karotena ($r = -0,88$; $P \leq 0,01$), L + Z ($r = -0,75$; $P \leq 0,05$), DPPH* ($r = -0,88$; $P \leq 0,01$) kao i pozitivna korelacija sa sadržajem cimetne kiseline ($r = 0,71$; $P \leq 0,05$) i TPC ($r = 0,69$; $P \leq 0,05$). Negativne korelacije između prinosa i sadržaja L + Z ($r = -0,76$; $P \leq 0,05$), protokatehinske kiseline ($r = -0,92$; $P \leq 0,001$), DPPH* ($r = -0,79$; $P \leq 0,05$) i GSH ($r = 0,92$; $P \leq 0,001$) kao i pozitivne korelacije sa sadržajem cimetne kiseline ($r = 0,88$; $P \leq 0,01$) i TPC ($r = 0,94$; $P \leq 0,001$) uočene su kod ZP515su (Tabela 17).

Tabela 17. Vrednost koeficijenta korelacije zavisnosti sadržaja fitohemikalija i prinosa u fazi II lista.

Fitohemikalije	ZP504su	ZP355su	ZP553su	ZP515su
L + Z	-0,71*	-0,76*	-0,88**	-0,76*
β -karoten	-0,08	0,29	-0,75*	-0,15
Protokatehinska kiselina	-0,52	-0,89**	-0,38	-0,92***
<i>p</i> -Kumarinska kiselina	0,46	0,83**	0,54	0,73*
Cimetna kiselina	0,42	0,59	0,71*	0,88**
Sinapinska kiselina	0,31	-0,55	0,62	-0,29
DPPH*	-0,33	-0,78*	-0,88**	-0,79*
TPC	0,76*	0,83**	0,69*	0,94***
GSH	-0,29	-0,69*	-0,12	-0,92***

*, **, ***Značajno na nivou poverenja od 0,05; 0,01; 0,001 respektivno.

4.3.2. Zavisnost prinosa i sadržaja fitohemikalija u zrnu

Linearna regresiona analiza je korišćena u cilju utvrđivanja korelacija između prinosa i sadržaja fitohemikalija u zrnu šećerca. Sadržaj je izražen kao prosek obe godine ispitivanja. Radi preglednosti prikazan je ukupan sadržaj fitohemikalija (zbir pojedinačnih jedinjenja iz iste grupe), tj. vitamina E, karotenoida, fenolnih kiselina i šećera, kao i pojedinačne fitohemikalije kao što su: β -karoten, ferulinska kiselina, α -tokoferol, glukoza fruktoza i saharoza (Tabela 18). Razlog za izdvajanje ovih fitohemikalija su njihove biološke funkcije u organizmu čoveka, dok tri navedena šećera utiču na senzorne karakteristike zrna šećerca.

Tabela 18. Vrednost koeficijenta korelacije zavisnosti sadržaja fitohemikalija i prinosa u zrnu.

Fitohemikalije	ZP504su	ZP355su	ZP553su	ZP515su
Σ karotenoidi	-0,10	0,65*	0,58	0,51
Σ fenolne kiseline	-0,25	-0,82**	-0,85**	0,72*
Σ vitamin E	0,73*	0,89**	0,80**	0,58
Σ šećeri	-0,46	-0,49	-0,83**	-0,89**
DPPH [*]	-0,30	-0,71*	-0,21	0,09
TPC	0,35	0,78*	0,87**	0,74*
GSH	-0,74*	-0,83**	-0,71*	-0,48
Ferulinska kiselina	-0,57	-0,82**	-0,87**	0,32
α -Tokoferol	0,32	0,71*	0,28	-0,11
β -Karoten	-0,71*	-0,36	-0,30	0,49
Glukoza	-0,04	0,37	0,15	-0,46
Fruktoza	0,33	0,16	-0,16	0,18
Saharoza	0,29	0,16	0,21	-0,77*

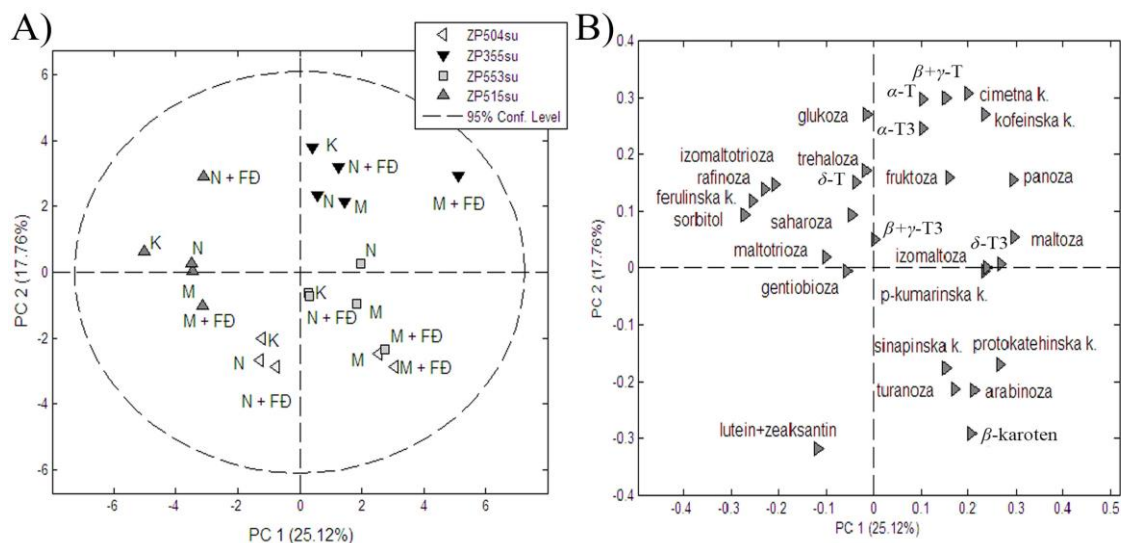
*, **, ***Značajno na nivou poverenja od 0,05; 0,01; 0,001 respektivno.

Kod hibrida ZP504su uočena je pozitivna korelacija između prinosa i ukupnog sadržaja vitamina E ($r = 0,73$; $P \leq 0,05$), kao i negativna korelacija sa sadržajem β -karotena ($r = -0,71$; $P \leq 0,05$) i GSH ($r = -0,74$; $P \leq 0,05$) (Tabela 18). Pozitivne korelacije između prinosa i sadržaja ukupnih karotenoida ($r = 0,65$; $P \leq 0,05$), ukupnog vitamina E ($r = 0,89$; $P \leq 0,01$), TPC ($r = 0,87$; $P \leq 0,05$) i α -tokoferola ($r = 0,71$; $P \leq 0,05$) uočene su kod ZP355su. U istom hibridu primećene su i negativne korelacije između prinosa i sadržaja ukupnih fenolnih kiselina ($r = -0,82$; $P \leq 0,01$), DPPH^{*} ($r = -0,71$; $P \leq 0,05$), GSH ($r = -0,83$; $P \leq 0,01$) i ferulinske kiseline ($r = -0,82$; $P \leq 0,01$). Negativna korelacija između prinosa i sadržaja ukupnih fenolnih kiselina ($r = -0,85$; $P \leq 0,01$), ukupnih šećera ($r = -0,83$; $P \leq 0,01$), GSH ($r = -0,71$; $P \leq 0,05$) i ferulinske kiseline ($r = -0,87$; $P \leq 0,01$) kao i pozitivna korelacija sa sadržajem vitamina E ($r = 0,82$; $P \leq 0,01$) i TPC ($r = 0,87$; $P \leq 0,01$) zabeležena je u hibridu ZP553su (Tabela 18). U hibridu ZP515su uočena je pozitivna korelacija između prinosa i sadržaja ukupnih fenolnih kiselina ($r = 0,72$; $P \leq 0,05$) i TPC ($r = 0,74$; $P \leq 0,05$) i ujedno negativna korelacija sa sadržajem ukupnih šećera ($r = -0,89$; $P \leq 0,01$) i saharozom ($r = 0,77$; $P \leq 0,05$) (Tabela 18).

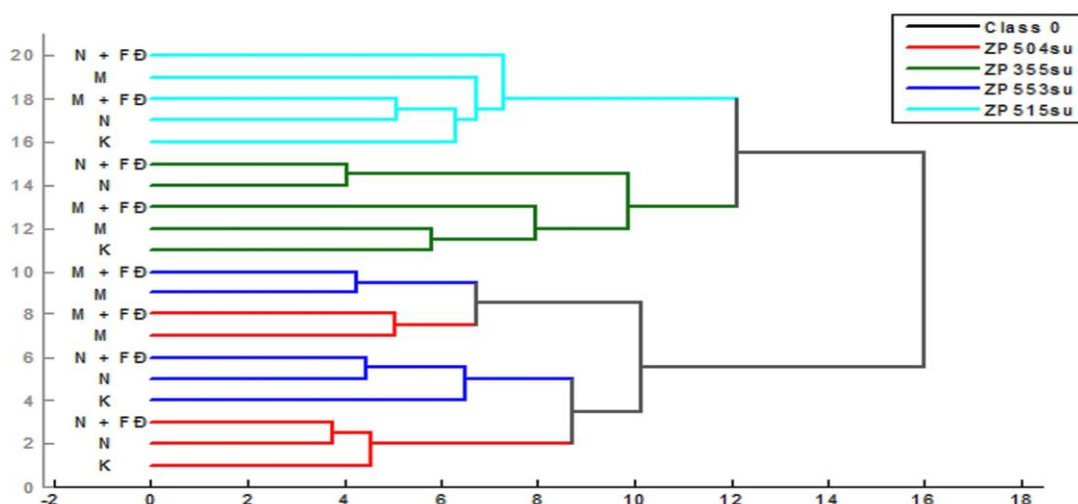
4.4. Multivarijantna analiza

Analiza glavnih komponenta primenjena je u cilju pronalazjenja karakterističnog odgovora genotipa u pogledu fitohemijskog profila nakon primenjenih tretmana.

S obzirom da se traži jedinstven odgovor genotipa a da su ispitivanja sprovedena tokom dve godine ispitivanja i da sadržaj fitohemikalija ne zavisi samo od genotipa već i od agroekoloških uslova, analiza glavnih komponenata primenjena je na prosečan sadržaj fitohemikalija tokom obe godine ispitivanja u zrnu kukuruza šećerca (Slika 16). PCA analize za svaku godinu posebno date su u Prilogu 5. Primenjena PCA rezultovala je u četvorokomponentnom modelu, pomoću kojeg je objašnjeno 63,65% ukupnog varijabiliteta podataka. Prva komponenta (PC1) opisuje 25,12% dok druga komponenta (PC2) opisuje 17,76 % ukupnog varijabiliteta. Klusterska analiza je izvedena kao dodatak PCA metodi u cilju potvrde grupisanja uzoraka prema PCA i takođe je primenjena na prosečan sadržaj fitohemikalija tokom obe godine ispitivanja. Prema klusterskoj analizi pri nivou sličnosti od 13% uočavaju se tri klastera, dok se pri nivou sličnosti od 11% prvi klaster deli na dva subklastera (Slika 17).



Slika 16. PCA analiza primenjena na prosečan sadržaj fitohemikalija nakon primenjenih tretmana tokom obe godine ispitivanja u zrnu četiri hibrida šećerca: grafik skorova (a) i grafik varijabli (b).



Slika 17. Klusterska analiza primenjena na prosečan sadržaj fitohemikalija nakon primenjenih tretmana tokom obe godine ispitivanja u zrnu četiri hibrida šećerca.

5. Diskusija

5.1. Performanse primenjenih postupaka ekstrakcija i HPLC metoda

5.1.1. Ekstrakcija i hromatografija karotenoida

Ekstrakcija karotenoida iz lista vršena je pomoću hladnog acetona (Odeljak 3.6.1.) prvenstveno zbog njegovog lakog prolaska kroz biljno tkivo. U poređenju sa metodom koju su opisali Safawo i saradnici (2010), u ovoj disertaciji korišćena je manja masa biljnog materijala kao i manja zapremina ekstrakcionog sredstva. Ekstrakcija karotenoida iz zrna vršena je pomoću smeše MeOH/EtOAc (6:4, v/v) (Odeljak 3.6.1.) jer se ona pokazala kao najbolje ekstrakciono sredstvo za ekstrahovanje karotenoida iz endosperma kukuruza (Rivera i saradnici, 2012). Proces saponifikacije prilikom ekstrahovanja karotenoida iz kukuruza u ovoj disertaciji nije primenjen jer se oni ne nalaze u esterifikovanom obliku (Howe i saradnici, 2006), a i zbog toga što je nekoliko studija ukazalo na gubitak karotenoida nakon saponifikacije (Divya i saradnici, 2012; Muzhingi i saradnici, 2008). Na ovaj način, primenjenim postupkom ekstrakcije smanjeno je vreme ekstrahovanja karotenoida, a zbog jednostavne pripreme ekstrakt se nakon filtriranja i uparavanja može direktno injektovati u HPLC sistem.

Primenjena hromatografska metoda za kvantifikaciju karotenoida u listu i zrnu obuhvatila je razdvajanje karotenoida sa dobrom rezolucijom i ukupnim trajanjem analize od 20 min (Slike 10 i 12) što je skoro dvostruko kraće nego u HPLC metodi koju su primenili Petry i Mercadante (2018). Za razdvajanje karotenoida primenjena je C18 kolona, što je značajno skratilo vreme potrebno za analizu uz sličan izgled hromatograma kao sa C30 kolonom (Daood i saradnici, 2014; Petry i Mercadante, 2018). Dobijene vrednosti koeficijenta determinacije – R^2 nisu bile manje od 0,9953 ukazujući na dobru linearnost primenjene metode za kvantifikaciju karotenoida. Efikasnost metode primenjene u ovoj disertaciji bila je u opsegu od 98,94% do 116,56% za zrno, odnosno 94,91% do 111,32% za list (Tabela 5) što ukazuje na visoku tačnost primenjene metode. Utvrđene vrednosti za GD za L + Z i β -karotena iznosile su 49,32 ng/mL i 55,06 ng/mL u zrnu, a u listu 78,41 ng/mL i 65,20 ng/mL, respektivno. Petry i Mercadante (2018) su u svojoj metodi prikazali veće vrednosti GD za lutein, zeaksantin i β -karoten. Ovakav podatak ukazuje da je optimizovana i primenjena metoda za kvantifikaciju karotenoida u listu i zrnu šećerca visoko osetljiva i brza.

5.1.2. Ekstrakcija i hromatografija tokotrienola i tokoferola

Postupak ekstrakcije tokola u ovoj disertaciji obuhvatio je primenu 2-propanola kao ekstrakcionog sredstva (Odeljak 3.6.2.) bez postupka saponifikacije, jer je veći broj autora ukazao na gubitak tokola nakon procesa saponifikacije usled degradacije (Lim i saradnici, 2007; Stinco i saradnici, 2014). Na ovaj način, primenjen proces ekstrakcije smanjuje vreme ekstrahovanja tokola iz biljnog materijala, a zbog jednostavne pripreme ekstrakt se nakon filtriranja može direktno injektovati u HPLC sistem. Primenjena hromatografska metoda za kvantifikaciju tokotrienola i tokoferola obuhvatila je razdvajanje tokotrienola i tokoferola sa dobrom rezolucijom i ukupnim trajanjem analize od 15 min (Slika 13). Za hromatografsko razdvajanje tokotrienola i tokoferola je korišćena C18 kolona, s obzirom da u kukuruza razdvajanje β i γ tokoferola i tokotrienola nije od ključne važnosti kao i zbog bolje reproduktivnosti same kolone u poređenju sa NP kolonama (Abidi, 2000).

Dobijene R^2 nisu bile manje od 0,9992 što ukazuje na dobru linearnost u ovoj disertaciji primenjene metode za kvantifikaciju tokotrienola i tokoferola u zrnu šećerca. Efikasnost primenjene metode bila je u opsegu od 95,84% do 111,98% (Tabela 5) što potvrđuje veliku tačnost primenjene metode.

Dobijene vrednosti retencionih vremena nakon primenjene metode za identifikaciju ispitivanih tokoferola (Tabela 5) bila su manja nego kod autora Gliszczyńska-Swigło i Sikorska (2004). Vrednosti za GD ispitivanih tokoferola u primenjenoj metodi bile su u opsegu od 21,66 ng/mL do 33,93 ng/mL (Tabela 5), dok je kod Gliszczyńska-Swigło i Sikorska (2004) zabeležen opseg od 8 ng/mL do 28 ng/mL. Ovakav podatak ukazuje da je metoda primenjena u ovoj disertaciji dovoljno osetljiva i sa kraćim trajanjem analize. Injekciona zapremina filtrata bila je manja nego u navedenoj metodi kao i manji protok mobilne faze u odnosu na metodu koju su opisali Gliszczyńska-Swigło i Sikorska (2004), što obezbeđuje trošenje manjih količina organskih rastvarača. Isti autori su koristili kao mobilnu fazu acetonitril koji je štetniji po okolinu u poređenju sa metanolom koji je korišćen u metodi optimizovanoj u ovoj disertaciji.

5.1.3. Ekstrakcija i hromatografija slobodnih fenolnih kiselina

Ekstrakcija slobodnih fenolnih kiselina iz lista i zrna šećerca vršena je pomoću smeše MeOH/H₂O (8:2, v/v), (Odeljak 3.6.3.). U poređenju sa metodom koju su opisali Dewanto i saradnici (2002) u ovoj disertaciji je korišćena manja masa biljnog materijala kao i zapremina ekstrakcionog sredstva. Osim toga, izbegnuto je uparavanje ekstrakcionog sredstva, već je ekstrakt nakon filtriranja direktno injektovan u HPLC sistem. Na ovaj način primenjenim postupkom ekstrakcije skraćeno je vreme pripreme uzoraka za ekstrahovanje slobodnih fenolnih kiselina.

Primenjena hromatografska metoda za kvantifikaciju slobodnih fenolnih kiselina u listu i zrnu obuhvatila je razdvajanje slobodnih fenolnih kiselina sa dobrom rezolucijom i ukupnim trajanjem analize od 35 min (Slike 11 i 14) što je skoro dvostruko kraće u poređenju sa HPLC metodom koju su pimenili Nour i saradnici (2013). Dobijene R² nisu bile manje od 0,9993 što potvrđuje dobru linearnost primenjene metode za kvantifikaciju slobodnih fenolnih kiselina u listu i zrnu šećerca. Efikasnost primenjene metode bila je u opsegu od 92,56% do 111,07% (Tabela 5) što ukazuje na veliku tačnost primenjene metode. Dobijene vrednosti za GD ispitivanih slobodnih fenolnih kiselina u primenjenoj metodi bile su u opsegu od 23,07 ng/mL do 79,84 ng/mL (Tabela 5), dok je u metodi koji su primenili Nour i saradnici (2013) zabeležen opseg od 33 ng/mL do 95 ng/mL. Ovakav podatak ukazuje da je metoda primenjena u ovoj disertaciji osetljivija i vremenski efikasnija. Istovremeno, metoda je optimizovana u skladu sa principima zelene analitičke hemije jer je primenom manjeg protoka mobilne faze u odnosu na metodu koju su opisali Nour i saradnici (2013) smanjena upotreba organskih rastvarača.

5.2. Uticaj primenjenog tretmana na sadržaj fitohemikalija u listu

5.2.1. Uticaj herbicida na sadržaj karotenoida

Dobijene vrednosti za sadržaj luteina, zeaksantina i β -karotena u ispitivanim kontrolnim uzorcima bile su skoro dvostruko veće u fazi II nego u fazi I. Sadržaj ispitivanih karotenoida u kontrolnim listovima testiranih hibrida bio je u saglasnosti sa rezultatima Kopsell-a i saradnika (2011). Dobijeni rezultati u ovoj disertaciji pokazali su da primenjeni herbicidi nisu imali statistički značajan uticaj na sadržaj β -karotena u toku obe godine i analiziranim fazama (Tabela 7). Mogući razlog za ovakav trend je to što biljka još uvek nije prevazišla stres izazvan herbicidima (Kopsell i saradnici, 2009), naročito u fazi I kada je prošlo samo 48 h od tretmana, jer neposredno nakon primene herbicida biljka aktivira mehanizme u cilju detoksikacije molekula herbicida (de Carvalho i saradnici, 2009). Još jedno moguće obrazloženje za uticaj herbicida na sadržaj β -karotena, koji u ovoj disertaciji nije bio statistički značajan, je i različita lokalizacija β -karotena i ksantofila u fotosintetičkom aparatu (Telfer, 2005). β -Karoten se nalazi u samom reaktivnom centru i zadužen je za neutralisanje singletnog kiseonika (¹O₂) te se i više troši u stresnim uslovima za razliku od ksantofila koji su orijentisani više ka kompleksu antena pigmentata hlorofila.

Suprotno od rezultata dobijenih u ovoj disertaciji, Rivera-Madrid i saradnici (2013) su ukazali na povećanje sadržaja β -karotena nakon primene norflurazona (isti mehanizam delovanja kao mezotrion) u kontrolisanim uslovima. Možda je upravo to razlog za neusaglašenost sa rezultatima u ovoj disertaciji, jer u lošijim agroekološkim uslovima biljka je izložena sinergičnom uticaju različitih stresnih faktora. Iz rezultata u ovoj disertaciji se vidi i da je nikosulfuron, koji pokazuje drugačiji mehanizam delovanja od mezotriona, doveo do statistički značajnog smanjenja sadržaja L + Z, u fazi I, kod hibrida ZP504su tokom 2017. godine što se verovatno može pripisati uticaju abiotičkog stresa koji herbicidi mogu da izazovu (Gill i Tuteja, 2010) u kombinaciji sa sušom koja je bila prisutna u testiranoj godini.

U fazi II sadržaj testiranih karotenoida u kontrolnim uzorcima bio je veći nego u fazi I, što je i očekivano jer se biljka razvija te se samim tim i sadržaj pojedinih fitohemikalija menja. Trebalo bi da u fazi II biljka uglavnom bude oporavljena od stresa i da pokazuje veći sadržaj karotenoida nakon primenjenih tretmana. Međutim, takva situacija zabeležena je samo kod hibrida ZP515su, u odnosu na sve testirane hibride, nakon primene mezotriona tokom obe godine ispitivanja. Možda je razlog za ovakav rezultat taj što stariji listovi više pate od stresa nego mlađi listovi (Mibei i saradnici, 2016). Isti autori sugerišu na povećanje sadržaja luteina i zeksantina kao i smanjenje sadržaja β -karotena u listu plavog patlidžana u sušnom periodu, što je donekle u skladu sa rezultatima dobijenim u kontrolnim uzorcima tokom 2017. gde je zabeleženo povećanje sadržaja L + Z sem ZP515su i sadržaja β -karotena u svim hibridima u poređenju sa 2016. (Tabela 7).

5.2.2. Uticaj folijarnog đubriva i herbicida na sadržaj karotenoida

Dobijeni rezultati u ovoj disertaciji pokazali su da folijarna đubriva menjaju antioksidativni status lista kukuruza u pogledu sadržaja karotenoida nakon primene herbicida, što je u saglasnosti i sa rezultatima Brankova i saradnika (2017). Zabeležena neuniformna variranja, koja uglavnom nisu bila statistički značajna, u sadržaju karotenoida nakon primene folijarnog đubriva u ovoj disertaciji možda se mogu pripisati različitim meteorološkim uslovima koji su bili prisutni u toku 2016. i 2017. godine (Tabela 3). Nedostatak vode, tj. suša značajno umanjuje apsorpciju folijarnog đubriva (Oosterhuis, 2009), jer dolazi do povećanja debljine sloja kutikule (Bi i saradnici, 2017) kroz koju folijarno đubrivo mora da prodre kako bi se resorbovalo sa površine lista. Smanjenje sadržaja L + Z koje je pronađeno kod hibrida ZP504su (Tabela 7) može ukazivati i na nekompatibilnost primenjenog herbicida i folijarnog đubriva (Delchev i saradnici, 2015).

5.2.3. Uticaj herbicida na sadržaj slobodnih fenolnih kiselina

Najzastupljenije slobodne fenolne kiseline u kontrolnim uzorcima bile su protokatehinska i *p*-kumarinska kiselina kako u fazi I tako i u fazi II (Tabela 8). Sadržaj svih ispitivanih fenolnih kiselina u kontrolnim uzorcima uglavnom je bio dvostruko veći u fazi II u poređenju sa fazom I. Prema literaturnim podacima, veći broj studija je objavljen na temu uticaja herbicida na promene sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja i to uglavnom u listu različitih kultura, dok je mali broj studija rađen na pojedinačnim fenolnim kiselinama u listu. Dobijeni rezultati pokazali su da nakon primene nikosulfurona dolazi do značajnog porasta u sadržaju protokatehinske kiseline u hibridu ZP515su u fazi I (Tabela 8) što nije u saglasnosti sa rezultatima Orca-ray-a i saradnika (2010).

Zabeležen značajno veći sadržaj *p*-kumarinske kiseline u svim kontrolnim uzorcima svih hibrida u toku 2017. u poređenju sa 2016. (Tabela 8), ukazuje najverovatnije na značajnu ulogu *p*-kumarinske kiseline u uslovima stresa u ranijim razvojnim fazama, kao što je faza I. Slično našim rezultatima, visoka akumulacija *p*-kumarinske zabeležena je tokom sušnog perioda u listu *Moringa oleifera* od strane Nouman-a i saradnika (2018). Takođe uočena variranja u uticaju herbicida na sadržaj *p*-kumarinske kiseline (Tabela 8) mogu se pripisati i različitim meteorološkim uslovima u toku obe godine ispitivanja.

Kod hibrida ZP504_{su} i ZP515_{su} zabeleženo je statistički značajno povećanje sadržaja *p*-kumarinske kiseline nakon primene oba herbicida. Mogući razlog bi se mogao naći u uticaju herbicida, odnosno abiotičkog stresa na šikimatni put kao što je opisano u Odeljku 5.3.5.

5.2.4. Uticaj folijarnog đubriva i herbicida na sadržaj slobodnih fenolnih kiselina

Prema literaturnim podacima, srazmerno je mali broj studija na temu uticaja folijarnog đubriva, a pogotovo sinergističkog uticaja herbicida i folijarnih đubriva na sadržaj pojedinačnih fenolnih kiselina u listu. Nakon primene N + FĐ kod hibrida ZP553_{su} zabeležen je značajan porast sadržaja *p*-kumarinske kiseline u fazi I, kao i nakon primene M + FĐ u fazi II, u poređenju sa čistim herbicidom (Tabela 8). Ovakav rezultat može ukazivati na dobru kompatibilnost FĐ i herbicida. Suprotno od rezultata u ovoj disertaciji, Gazola i saradnici (2018) su ukazali da azot iz zemljišta nema uticaj na promene sadržaja *p*-kumarinske kiseline u listu kasave. Mogući razlog zašto primenjeno FĐ u ovoj disertaciji dovodi do povećanja *p*-kumarinske je taj što azot koji je prisutan u FĐ (Tabela 2) može uticati na aktivnost PAL enzima koji je, kao što je već rečeno, ključni enzim u sintezi fenolnih jedinjenja (Odeljak 5.3.5.).

5.2.5. Uticaj herbicida na sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja, ukupnog glutaciona i antioksidativne aktivnosti

Zabeležena neuniformna variranja koja uglavnom nisu bila statistički značajna u sadržaju TPC, GSH i DPPH^{*} (Tabela 9) u listu u obe faze nakon primene herbicida mogu se pripisati različitim meteorološkim uslovima tokom dve godine ispitivanja. Povećanje sadržaja GSH nakon primene mezotriona u toku 2016. godine zabeleženo je samo kod hibrida ZP355_{su} u obe faze (Tabela 9). Kod hibrida ZP553_{su} u toku obe faze zabeležen je statistički značajan porast TPC nakon primene oba herbicida i to samo u toku 2016. godine. Isti trend zabeležen je kod hibrida ZP504_{su} i ZP515_{su}, u fazi I tokom 2016. godine, nakon primene nikosulfurona (Tabela 9). Suprotno rezultatima iz ove disertacije, povećanje TPC u linijama kukuruza nakon primene herbicida zabeleženo je od strane Brankov-a i saradnika (2017). Ovakvi podaci mogu ukazivati na moguću tolerantnost hibrida TPC jer usled oksidativnog stresa koji herbicid izaziva biljka reaguje i aktivira antioksidativni sistem odbrane, što se ispoljava u povećanoj proizvodnji neenzimskih antioksidanasa kao što su fenolna jedinjenja i tioli (Michalowicz i Duda, 2009; Nemat Alla i saradnici, 2008). Međutim tolerantnost genotipa ne može se definisati samo na osnovu sadržaja TPC ili GSH već se moraju sagledati i ostali parametri kao što su sadržaj pojedinih antioksidanasa (karotenoidi i vitamin E) kao i prinos.

5.2.6. Uticaj folijarnog đubriva i herbicida na sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja, ukupnog glutaciona i antioksidativne aktivnosti

Kod hibrida ZP553_{su} u fazi I zabeleženo je statistički značajno povećanje, a u fazi II smanjenje sadržaja TPC tokom 2016. godine, nakon primene oba herbicida u kombinaciji sa FĐ u poređenju sa odgovarajućim herbicidom (Tabela 9). Slično rezultatima dobijenim u ovoj disertaciji, nakon primene folijarnog đubriva primećeno je smanjenje TPC u listu masline (Tekaya i saradnici, 2016). Suprotno našim rezultatima Brankov i saradnici (2017) su pokazali da je nakon dva dana od primene herbicida + FĐ zabeleženo smanjenje, a nakon dve do tri nedelje povećanje TPC u poređenju sa tretmanom sa čistim herbicidom. Razlog za različita variranja u sadržaju TPC i ukupnog sadržaja GSH nakon primene tretmana herbicid + FĐ u toku 2016. i 2017. godine (Tabela 9) možda se može pripisati sinergističkom uticaju i drugih vrsta abiotičkog stresa, kao što je suša. Upravo, Perveen i saradnici (2016) su ukazali na različite promene u sadržaju fenolnih jedinjenja u optimalnim i sušnim uslovima što je pokazano i u ovoj disertaciji.

5.3. Uticaj primenjenih tretmana na sadržaj fitohemikalija u zrnu

5.3.1. Uticaj herbicida na sadržaj karotenoida

Sadržaj luteina, zeaksantina i β -karotena u kontrolnim uzorcima ispitivanih hibrida bio je u saglasnosti sa rezultatima Kurilich-a i saradnika (1999), kao i Ibrahim-a i Juvik-a (2009). Međutim, sadržaj karotenoida je varirao u zavisnosti od genotipa, kao i vegetacione sezone. Slično rezultatima dobijenim u ovoj disertaciji, Kopsell i saradnici (2009) su utvrdili da dolazi do porasta sadržaja luteina i zeaksantina u zrnu umereno osetljivog genotipa kukuruza šećerca nakon primene mezotriona. Statistički značajno povećanje sadržaja karotenoida koje je zabeleženo u ovoj disertaciji nakon primene mezotriona kod hibrida ZP504 su i ZP553 su (Tabela 10) moguće je objasniti njihovom bioakumulacijom. Mezotrion inhibira dejstvo HPPD enzima, ključnog enzima u biohemijskom putu prevođenja tirozina u plastohinon i α -tokoferol. Plastohinon je kofaktor fitoen desaturaze (FDS) i intermedijerni nosač elektrona između desaturaze i fotosintetičkog elektron transportnog lanca. FDS je važan enzim u biosintezi karotenoida jer katalizuje reakciju prevođenja fitoena u fitofluen (Kopsell i saradnici, 2009). Usled njegove inhibicije biosinteza karotenoida se zaustavlja, što dalje rezultuje u bioakumulaciji fitoena. Navedena akumulacija može trajati sve dok biljka odgovarajućim biohemijskim mehanizmima ne prevede molekul herbicida u nereaktivni oblik, nakon čega se enzim HPPD ponovo aktivira. Kada ponovo započne biosinteza plastohinona, FDS katalizuje reakciju prevođenja fitoena (povećana koncentracija usled akumulacije), što dalje dovodi do pojačane biosinteze karotenoida. U slučaju da biljka nije u stanju da metabolizuje molekul mezotriona, biosinteza karotenoida biće zaustavljena, odnosno sadržaj karotenoida biće manji.

S obzirom da nikosulfuron ima drugačiji mehanizam delovanja, postavlja se pitanje koji se slični biohemijski putevi odigravaju, tako da primena nikosulfurona ima uticaj na promene u sadržaju karotenoida (Cutulle i saradnici, 2018). Statistički značajno smanjenje karotenoida nakon primene nikosulfurona kod hibrida ZP515 su (Tabela 10) može se objasniti sinergističkim uticajem abiotičkog stresa koji izazivaju herbicidi zajedno sa sušom (Gill i Tuteja, 2010). Kao posledica stresa, prvi korak je prekomerna proizvodnja reaktivnih kiseoničnih vrsta (*Reactive Oxygen Species* - ROS) koje su veoma toksične. ROS tokom propagacije iniciraju niz autooksidativnih lančanih reakcija nezasićenih masnih kiselina na membranama ćelija, proizvodeći lipidne perokside koji dalje mogu dovesti do destrukcije makromolekula i smrti ćelije. Reaktivne kiseonične vrste obuhvataju radikale: $\cdot O_2^-$, superoksidni radikal; $\cdot OH$, hidroksilni radikal; $\cdot HO_2$, hidro-peroksidni radikal; $\cdot RO_2$, peroksil radikal i $\cdot RO$, alkoksi radikal i neradikale: H_2O_2 , vodonik-peroksid; ROOH, organski peroksidi i 1O_2 , singletni kiseonik. Stoga, u cilju odbrane, biljka aktivira razne biohemijske mehanizme i *de novo* sintezu, kako enzimskih tako i neenzimskih antioksidanasa, kao što su karotenoidi (Gill i Tuteja, 2010). Karotenoidi štite fotosintetički aparat neutralisanjem slobodnih radikala, štite ćelijsku membranu od lipidne peroksidacije i stabilizuju membranski lipidni dvosloj. Kao posledica neutralisanja radikala, dolazi do oksidacije bilo koje dvogube veze u strukturi karotenoida, što za posledicu ima nastajanje laktone, aldehida, ketona i endoperooksida (Havaux, 2013). Samim tim, smanjenje sadržaja karotenoida koje je zabeleženo u navedenom hibridu ZP515 su može da ukazuje na njegovu nemogućnost da se izbori sa stresom izazvanim herbicidom, naročito u sezoni kada je izraženo dejstvo suše.

5.3.2. Uticaj folijarnog đubriva i herbicida na sadržaj karotenoida

Nakon primene M + FĐ u poređenju sa čistim herbicidom primećen je statistički značajan porast ukupnih karotenoida kod hibrida ZP504 su i ZP515 su (Tabela 10). Slično je zabeleženo i kod ZP553 su , nakon primene N + FĐ u poređenju sa nikosulfuronom. Ovakvi podaci ukazuju da se biljka pomoću FĐ oporavila od stresa koji je herbicid izazvao, što dalje ukazuje na pozitivan uticaj primenjenog FĐ.

Slično rezultatima u ovoj disertaciji povećanje sadržaja β -karotena nakon primene folijarnog đubriva zabeleženo je i od strane Lester-a i saradnika (2005). Ipak, smanjenje nakon primene N + FĐ koje je zabeleženo kod ZP355 su (Tabela 10) moglo bi ukazivati na nekompatibilnost i lošiju kombinaciju herbicida i FĐ. Razlog za smanjenje kao i za variranje u uticaju FĐ na sadržaj karotenoida može se takođe pripisati i uticaju suše koja je bila prisutna tokom 2017. godine. Nedostatak vode uslovio je povećanje debljine sloja kutikule (Bi i saradnici, 2017) usled čega dolazi do slabijeg usvajanja FĐ (Oosterhuis, 2009).

5.3.3. Uticaj herbicida na sadržaj tokoferola i tokotrienola

U zrnu kontrolnih uzoraka kukuruza šećerca, od ispitivanih tokoferola i tokotrienola, najzastupljeniji bili su $\beta+\gamma$ -T3 i $\beta+\gamma$ -T. Sadržaj tokoferola u kontrolnim uzorcima ispitivanih hibrida bio je u saglasnosti sa rezultatima Kurilich-a i saradnika (1999) kao i Ibrahim-a i Juvik-a (2009). Ibrahim i Juvik (2009) su prikazali značajne varijacije u sadržaju tokoferola između genotipova, što je u skladu sa našim rezultatima. Međutim, isti autori su pokazali da nema značajnih varijacija u sadržaju tokoferola tokom vegetacionih sezona što je u suprotnosti sa našim rezultatima. Vrednosti sadržaja vitamina E u kontrolnim uzorcima bile su statistički značajno manje tokom 2017. u poređenju sa 2016. godinom (Tabela 11).

Zabeleženo značajno povećanje ukupnog sadržaja vitamina E kod hibrida ZP504 su i ZP553 su nakon primene mezotriona tokom obe godine u poređenju sa kontrolom (Tabela 11) moglo bi se objasniti inhibicijom HPPD enzima, slično kao i kod prethodno navedenog mehanizma koji ispoljava uticaj na povećanje sadržaja karotenoida (Odeljak 5.3.1.). Prva reakcija u biosintezi tokotrienola i tokoferola je konverzija *p*-hidroksipiruvinske kiseline u homogentisinsku kiselinu (HK), koja je katalizovana HPPD enzimom. Putem raznih biohemijskih enzimskih reakcija, HK se dalje konvertuje u osam oblika tokohromanola - četiri oblika tokoferola i četiri oblika tokotrienola (DellaPenna, 2005). Zbog inhibicije HPPD enzima, usled primene mezotriona, moguće je da dolazi do akumulacije *p*-hidroksipiruvinske kiseline. Aktiviranjem različitih mehanizama detoksikacije i degradacije mezotriona (de Carvalho i saradnici, 2009) u biljci, HPPD enzim postaje ponovo aktivan. Tada, usled visoke akumulirane koncentracije *p*-hidroksipiruvinske kiseline, može doći do povećanja sadržaja tokoferola i tokotrienola. Razlog zašto se javljaju velike razlike u promeni sadržaja tokotrienola u poređenju sa tokoferolima možda leži u činjenici da oni donekle imaju različite mehanizme nastajanja (Cahoon i saradnici, 2003). HK je prekursor za nastajanje kako tokoferola tako i tokotrienola. Međutim, u toku biosinteze tokotrienola dolazi do kondenzacije HK i geranilgeranil-difosfata, dok tokoferoli nastaju kondenzacijom HK i fitil-difosfata (Cahoon i saradnici, 2003).

Povećanje ukupnog sadržaja vitamina E u svim hibridima sem kod ZP515 su tokom obe godine u poređenju sa kontrolom (Tabela 11), koje je zabeleženo nakon primene nikosulfurona, mogao bi se pripisati uticaju abiotičkog stresu i njegovom prevazilaženju koji navedeni herbicid izaziva, s obzirom da ne inhibira aktivnost HPPD enzima. Ovu tvrdnju potvrđuju i kontrolni uzorci kod kojih je sadržaj vitamina E tokom 2017. godine bio manji u poređenju sa 2016. (Tabela 11). Stresirana biljka može aktivirati tokoferole kao neenzimske antoksidanse (Gill i Tuteja, 2010) u cilju svoje zaštite jer oni poseduju veliku antioksidativnu moć usled svojstva da doniraju fenolni vodonik slobodnim radikalima nakon čega se formira tokoferoksilni radikal (Szarka i saradnici, 2012). Poznato je da biljke tolerantne na sušu uglavnom pokazuju povećanje sadržaja α -tokoferola, dok senzitivne pokazuju smanjenje što dalje može da dovede do destrukcije same ćelije (Kanayama i saradnici, 2013; Munné-Bosch, 2005). Ukoliko je stres intenzivan/ozbiljan degradacija α -tokoferola je veća u odnosu na njegovu sintezu i dolazi do smanjenja njegovog sadržaja. Suprotno od rezultata dobijenih u ovoj disertaciji, Cutulle i saradnici, (2018) su pokazali da nikosulfuron nije doveo do značajnog povećanja γ -tokoferola.

5.3.4. Uticaj folijarnog đubriva i herbicida na sadržaj tokoferola i tokotrienola

Dobijeni rezultati su pokazali da je nakon primene M + FĐ kod hibrida ZP504*su* i ZP515*su* zabeležen statistički značajan porast sadržaja α -T tokom obe godine, u poređenju sa mezotrionom (Tabela 11). Takođe, nakon primene N + FĐ uočeno je povećanje sadržaja α -T u hibridima ZP355*su* i ZP515*su* u poređenju sa čistim herbicidom (Tabela 11). Kombinacija M + FĐ se takođe pozitivno odrazila na satus vitamina E u hibridu ZP504*su*. FĐ u kombinaciji i sa mezotrionom i sa nikosulfuronom dovelo je do povećanja sadržaja ukupnog vitamina E u hibridima ZP355*su* i ZP515*su*. Ovakvi podaci ukazuju da je folijarno đubrivo pomoglo u prevazilaženju stresa u biljci nastalom usled primene herbicida. Smanjenje ukupnog sadržaja vitamina E nakon primene N + FĐ u hibridu ZP504*su*, može da ukaže na moguću nekompatibilnost nikosulfurona i folijarnog đubriva kao kombinacije za ovaj genotip (Tabela 11).

5.3.5. Uticaj herbicida na sadržaj slobodnih fenolnih kiselina

Dobijeni rezultati pokazali su da su najzastupljenije slobodne fenolne kiseline u kontrolnim uzorcima bile protokatehinska, *p*-kumarinska i ferulinska kiselina. Sadržaj slobodne ferulinske i *p*-kumarinske kiseline u zrnu ispitivanih hibrida bio je u skladu sa rezultatima Dewanto-a i saradnika (2002), kao i Zhang-a i saradnika (2017). Das i Singh (2016) su zabeležili veći sadržaj slobodne kofeinske, ferulinske i *p*-kumarinske kiseline u poređenju sa rezultatima prikazanim u disertaciji. Mogući razlog je kasnija berba u njihovoj studiji. Sadržaj slobodnih fenolnih kiselina varirao je kako od primene herbicida, tako i od vegetacione sezone. Tako se u jednoj vegetacionoj sezoni beleži statistički značajno povećanje, a u drugoj statistički značajno smanjenje sadržaja slobodnih fenolnih kiselina što je u skladu sa rezultatima Legzdiņa i saradnika (2018). Prema literaturnim podacima, do sada nije objavljena nijedna studija o uticaju herbicida na sadržaj pojedinačnih fenolnih kiselina u zrnu kukuruza šećerca, a može se primetiti da je generalno jako mali broj studija na temu uticaja herbicida na sadržaj pojedinačnih fenolnih kiselina u žitaricama koje itekako zauzimaju važno mesto u ishrani ljudi. Dosta studija je objavljeno na temu uticaja herbicida na sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja i to uglavnom u listovima različitih biljnih vrsta.

Herbicidi mogu modifikovati sekundarne metabolite tako što utiču na šikimatni put (Daniel i saradnici, 1999), s obzirom da su aromatične amino-kiseline fenilalanin, triptofan i tirozin finalni proizvodi šikimatnog puta, a u višim biljkama služe kao supstrati za biosintezu proteina i kao prekursori za biosintezu hidoksicimetne kiseline, koja je dalje prekursor za sintezu lignina i drugih derivata fenolnih kiselina. Stoga razlog za statistički značajan porast sadržaja *p*-kumarinske kiseline nakon primene nikosulfurona, koji je zabeležen u hibridu ZP553*su* (Tabela 12), može se pripisati uticaju herbicida na aktivnost enzima l-fenilalanin-amonijum-liaze (PAL) (Nemat Alla i saradnici, 1995; Rösler i saradnici, 1997). PAL je glavni enzim koji povezuje primarni (šikimatni) i sekundarni (fenilpropanoidni) metabolizam biljke i katalizuje reakciju deaminovanja fenilalanina u *trans*-cimetnu kiselinu (Orcaray i saradnici, 2011). Takođe, prevođenje cimetne u *p*-kumarinsku kiselinu katalizovano je enzimom P450 monooksigenazom. Pomenuti enzim uključen je takođe u fazu I metabolizma herbicida gde se molekul herbicida prevodi u manje toksični molekul pomoću raznih hemijskih modifikacija (de Carvalho i saradnici, 2009), što dalje potvrđuje kompleksni uticaj kako herbicida tako i spoljašnjeg faktora na sadržaj fenolnih kiselina.

S obzirom da mezotrion ima drugačiji mehanizam delovanja od nikosulfurona, njegov uticaj na promene u sadržaju fenolnih kiselina može se pripisati uticaju abiotičkog stresa koji herbicidi izazivaju (Gill i Tuteja, 2010). Zahvaljujući aktiviranju odbrambenih mehanizama, usled stresa je povećana sinteza fenolnih jedinjenja te se na ovaj način može donekle objasniti statistički značajno povećanje ukupnog sadržaja fenolnih kiselina u hibridu ZP515*su* nakon primene mezotriona (Tabela 12).

Takođe ne treba zanemariti i uticaj suše koji je bio tokom 2017. godine i gde se jasno vidi da svi kontrolni uzorci sem hibrida ZP515*su* imaju statistički značajno veći sadržaj ukupnih fenolnih kiselina i ferulinske kiseline nego u 2016. godini (Tabela 12). Slično podacima dobijenim u disertaciji, veći sadržaj ferulinske kiseline zabeležen je u genotipovima kukuruza tolerantnim prema suši (Hura i saradnici, 2008).

Važno je istaći da se sekundarni efekat oksidativnog stresa ogleda u procesu povećane lignifikacije. Lignin je komponenta ćelijskog zida i ima osnovnu ulogu u njegovom ojačavanju, gde opet važnu ulogu ima ferulinska kiselina koja pomaže u otpornosti ćelijskog zida, štiti ćeliju od napada mikroba i solarnog zračenja i na taj način čini biljku tolerantijom na abiotičke faktore (Gazola i saradnici, 2018). Ferulinska i *p*-kumarinska kiselina mogu se direktno uključiti u fenilpropanoidni put i mogu dovesti do povećanja sadržaja monomera lignina (Zanardo i saradnici, 2009; dos Santos, 2008). Slično, lignin se sintetiše iz fenilalanina (krajnji produkt šikimatnog puta) i akumulacija lignina je praćena aktiviranjem PAL enzima (Orcaray i saradnici, 2011). Shodno navedenom, statistički značajno smanjenje sadržaja *p*-kumarinske kiseline bi se moglo pripisati oksidativnom stresu i smanjenoj tolerantnosti hibrida ZP553*su* prema mezotrionu dok, sa druge strane, statistički značajno povećanje sadržaja ferulinske kiseline kod hibrida ZP515*su* može ukazivati na njegovu povećanu tolerantnost prema mezotrionu (Tabela 12).

5.3.6. Uticaj folijarnog đubriva i herbicida na sadržaj slobodnih fenolnih kiselina

Prema literaturnim podacima, jako je mali broj studija na temu uticaja folijarnog đubriva na sadržaj pojedinačnih fenolnih kiselina, a skoro da nema podataka o uticaju folijarnog đubriva u kombinaciji sa herbicidima. Rezultati dobijeni u ovoj disertaciji ukazali su na statistički značajno povećanje sadržaja *p*-kumarinske, protokatehinske i ferulinske kiseline nakon primene M + FĐ kod hibrida ZP553*su* u poređenju sa mezotrionom ukazujući na pozitivan efekat primenjenog folijarnog đubriva u ovom genotipu.

Na osnovu sadržaja ukupnih fenolnih kiselina, kombinacija N + FĐ, u poređenju sa nikosulfuronom dovela je do značajnog povećanja ukupnog sadržaja fenolnih kiselina u hibridu ZP515*su*, što ukazuje da ovakva kombinacija pogoduje povećanju odbrambenih sposobnosti pomenutog hibrida. Suprotno, isti tretman doveo je do smanjenja ukupnog sadržaja fenolnih kiselina kod hibrida ZP504*su*, ukazujući na moguću nekompatibilnost herbicida i FĐ u metaboličkom odgovoru ovog genotipa. Kod hibrida ZP355*su* oba tretmana, M + FĐ i N + FĐ, dovela su do povećanja ukupnog sadržaja fenolnih kiselina ukazujući na dobru kompatibilnost između herbicida, FĐ i genotipa (Tabela 12) kao i prevazilaženju stresa izazvanog primenom herbicida. Suprotno od rezultata dobijenih u disertaciji, Tekaya i saradnici (2014) su pokazali da folijarno đubrivo (ima znatno veću koncentraciju N i manju koncentraciju B, Mn, Zn, Cu i Fe, u poređenju sa đubrivom primenjenim u ovoj disertaciji) ne utiče na sadržaj *p*-kumarinske, kofeinske i protokatehinske kiseline u maslini. Stumpf i saradnici (2019) su pokazali da sa povećanjem nivoa zemljišno primenjenog azota opada sadržaj slobodne ferulinske kiseline u zrnju pšenice što je zabeleženo kod ZP515*su* nakon primene N + FĐ.

5.3.7. Uticaj herbicida na sadržaj šećera

Najzastupljeniji šećeri, od svih ispitivanih, u zrnju kontrolnih uzoraka kukuruza šećerca bili su saharoza, glukoza, fruktoza, rafinoza i maltoza. Visok sadržaj rafinoze ukazuje na visok fitohemijski potencijal kukuruza šećerca. Sadržaj glukoze, fruktoze i saharoze bio je u skladu sa rezultatima Wong-a i saradnika (1994). Statistički značajno smanjenje ukupnog sadržaja šećera nakon primene sulfonilurea herbicida (Magné i saradnici, 2006) zabeleženo je kod hibrida ZP504*su* i ZP355*su* u poređenju sa kontrolom (Tabela 13).

Smanjenje ukupnog sadržaja šećera zabeleženo nakon primene herbicida može se objasniti time što su rastvorljivi šećeri malih molekulskih masa i enzimi koji učestvuju u njihovom metabolizmu povezani sa oksidativnim stresom, signaliziranjem ROS-a i imaju antioksidativne funkcije u vakuolama biljaka (Van den Ende i Valluru, 2009). Veoma bitno je istaći i to da je glukoza prekursor za sintezu karotenoida (Pallett i Young 1993) i askorbinske kiseline (Smirnoff i saradnici, 2001), kao i osnovnog ugljeničnog skeleta za sintezu amino-kiselina cisteina, glutamina i glicina, a koji su gradivni blokovi glutaciona (Noctor i Foyer 1998). Sva pomenuta jedinjenja su uključena u mehanizam odbrane biljke protiv oksidativnog stresa, kroz askorbatno-glutacioni ciklus, redoks homeostazu, peroksidnu detoksifikaciju i zaštitu od singlet (atomske) kiseonika. Shodno tome, statistički značajno smanjenje sadržaja glukoze koje je zabeleženo nakon primene nikosulfurona kod svih hibrida sem kod ZP515*su* tokom 2017. godine (Tabela 13), može se pripisati povećanoj potrebi biljke za sintezom jedinjenja koja učestvuju u odbrambenim mehanizmima usled prisutnog stresa suše, koja je zabeležena u pomenutoj godini. Ovakvi podaci impliciraju da se genotip koji ima veći sadržaj glukoze kada je izložen stresnim uslovima (Guo i saradnici, 2018) može smatrati potencijalno tolerantnim, te je na osnovu ovakve pretpostavke jedino hibrid ZP515*su* tolerantan na herbicid nikosulfuron. Kao potvrda pomenutoj tezi tokom sušne 2017. godine u kontrolnim uzorcima svih hibrida sem kod ZP355*su* zabeleženo povećanje sadržaja glukoze, fruktoze kao i gentiobioze (Tabela 13) ukazuje donekle na tolerantnost ispitivanih hibrida prema suši. Sa druge strane, zabeleženo statistički značajno povećanje sadržaja rafinoze u stresnoj 2017. godini kod svih hibrida u kontrolnim uzorcima, sem kod ZP515*su*, takođe može ukazivati na njihovu eventualnu tolerantnost (Tabela 13). U prilog tome Nishizawa i saradnici (2008) su pokazali da je koncentracija rafinoze u stresnim uslovima slična koncentraciji askorbinske kiseline i glutaciona i ukazali da rafinoza može direktno da neutrališe $\cdot\text{OH}$ radikale. Ovakvi podaci samo potvrđuju da se tolerantnost ne može definisati na osnovu jednog parametra i ukazuju na kompleksnost odgovora biljke na stres.

U kontrolnim uzorcima statistički značajno povećanje sadržaja maltoze u 2017. kao stresnoj godini, u odnosu na 2016. zabeleženo je kod svih hibrida. Isti trend bio je primećen i nakon primene oba herbicida u zrnu svih hibrida, sem kod ZP515*su* (Tabela 13). Akumulacija maltoze u stresnim uslovima (suša i primena herbicida) može se pripisati njenoj zaštitnoj ulozi na nivou tilakoidne membrane, koja ima ulogu u fotosintetskom elektron transportnom lancu. Prevođenje maltoze iz skroba je jednostepena reakcija i za veoma kratko vreme ćelija se može snabdeti maltozom, zaštititi membranu i proteine hloroplasta (Kaplan i Guy, 2004). Statistički značajno smanjenje sadržaja saharoze u kontrolnim uzorcima tokom 2017. godine kod svih hibrida, sem kod ZP515*su* (Tabela 13) može se pripisati stresnim uslovima u pomenutoj godini. Redukcija sadržaja saharoze može se objasniti time što ona može da se jednostepenom reakcijom prevede u fruktan čiji se sadržaj u stresnim uslovima povećava (Hinch i saradnici, 2002). Saharozu utiče i na biosintezu askorbinske kiseline (Nishikawa i saradnici, 2005), zbog čega se i na ovaj način može dovesti u vezu sa odbrambenim mehanizom biljke. Dobijeni rezultati su pokazali da su oba herbicida izazvala statistički značajno smanjenje sadržaja saharoze kod ZP515*su* tokom obe godine u poređenju sa kontrolom, kao i kod ZP504*su* i ZP355*su* tokom 2016. godine (Tabela 13), što ukazuje na moguću izloženost biljaka intenzivnijem stresu.

5.3.8. Uticaj folijarnog đubriva i herbicida na sadržaj šećera

Prema literaturi, do sada nijedna studija o uticaju herbicida u kombinaciji sa folijarnim đubrivom na sadržaj ovako velikog broja pojedinačnih šećera nije objavljena. Statistički značajno smanjenje ukupnog sadržaja šećera i saharoze (nakon primene M + FĐ kod hibrida ZP515su i nakon primene oba tretmana sa FĐ u hibridu ZP553su) može ukazivati na moguću nekompatibilnost herbicida i FĐ kao i to da biljka nije uspjela da se izbori sa postojećim stresom jer kao što je navedeno u Odeljku 5.3.7. saharoza se može dovesti u vezu sa odbrambenim mehanizmima biljke. U saglasnosti sa rezultatima dobijenim u ovoj disertaciji, smanjenje sadržaja saharoze nakon primene folijarne prihrane zabeleženo je u studijama Roussos i Tassis-a (2011), Clemente-a i saradnika (2018) kao i Tekaya i saradnika (2016).

5.3.9. Uticaj herbicida na sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja, ukupnog glutaciona i antioksidativne aktivnosti

Sadržaj ukupnih fenola u zrnu ispitivanih hibrida bio je u skladu sa rezultatima Zhang-a i saradnika (2017). Das i Singh (2016) zabeležili su niži sadržaj ukupnih fenola, verovatno zbog kasnije berbe. Kod hibrida ZP553su i ZP515su nakon primene oba herbicida je zabeležen statistički značajan porast TPC (Tabela 14), te se na osnovu toga ova dva hibrida mogu smatrati potencijalno tolerantnim prema primenjenim herbicidima (Dragičević i saradnici, 2012). Generalno, tolerantniji genotipovi uglavnom imaju aktivniji antioksidativni sistem, koji ima važnu ulogu u odbrani od oksidativnog stresa do kojeg dolazi usled primene herbicida (Nemat Alla i Hassan, 2006). Habibi, (2018) kao i Lugo-Cruz i saradnici, (2018) ukazuju na povećanje antioksidativne aktivnosti u srednje stresnim uslovima a smanjenje u uslovima intenzivnog stresa. U skladu sa navedenim, dobijeni rezultati pokazali su da je u kontrolnim uzorcima tokom sušne 2017. godine antioksidativna aktivnost bila statistički značajno veća kod svih hibrida sem kod ZP504su u odnosu na 2016. godinu (Tabela 14) ukazujući na srednje stresne uslove. Nakon primene oba herbicida, kod hibrida ZP355su i ZP553su u 2017. zabeležena je veća antioksidativna aktivnost kao i veći sadržaj TPC i GSH u poređenju sa kontrolom (Tabela 14). Upravo ovakvo povećanje sadržaja TPC i GSH ukazuje na pojačano aktiviranje mehanizama biljke za odbranu od oksidativnog stresa (Nemat Alla i saradnici, 2008).

5.3.10. Uticaj folijarnog đubriva i herbicida na sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja, ukupnog glutaciona i antioksidativne aktivnosti

Statistički značajno smanjenje sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja nakon primene M + FĐ i N + FĐ u 2017. godini kod svih hibrida, sem kod ZP515su u poređenju sa mezotrionom i nikosulfuronom, respektivno (Tabela 14) moglo bi da ukaže da biljka nije uspjela da prevaziđe stres indukovani kako primenom herbicida tako i visokim temperaturama koje su zabeležene u pomenutoj godini. Sadržaj fenolnih jedinjenja može biti lako modifikovan primenom različitih nivoa sadržaja azota, tačnije sa smanjenjem sadržaja azota povećava se sinteza fenolnih jedinjenja i obrnuto (Jones i Hartley, 1999). U studiji Tekaya i saradnici (2014) primenjeno folijarno đubrivo, iako je imalo znatno veću koncentraciju N u poređenju sa FĐ primenjenim u ovoj disertaciji, dovelo je do smanjenja ukupnih fenola što je zabeleženo i u našem radu. Mogući razlog zašto primenjena mala koncentracija azota u ovoj disertaciji ne dovodi do povećanja sadržaja fenolnih jedinjenja leži u činjenici da azot može negativno da utiče na aktivnost PAL enzima koji je, kao što je već rečeno, ključni enzim u sintezi fenolnih jedinjenja (Odeljak 5.3.5.). Do sličnih rezultata došli su Fernández-Escobar i saradnici (2006) koji su u svojoj studiji prikazali negativan efekat primene azota na sadržaj fenolnih jedinjenja.

Još jedan mogući razlog za smanjenje sadržaja fenolnih jedinjenja nakon primene FĐ je prisustvo bakra u primenjenom folijarnom đubrivu jer je usled njegovog nedostatka zabeleženo povećanje koncentracije fenolnih jedinjenja (Ruiz i saradnici, 1998).

5.3.11. Analiza glavnih komponenata i klusterska analiza

Uzajamna projekcija skorova prve dve PC komponente (Slika 16) ukazuje na grupisanje uzoraka hibrida ZP355su i ZP515su (Slika 16a) i njihovo razdvajanje od ostalih ispitivanih hibrida duž PC2 ose. Uzorci hibrida ZP504su i ZP553su su se delimično preklopili nakon primene tretmana M i M + FĐ, dok je hibrid ZP504su nakon primene tretmana K, N i N + FĐ formirao izdvojen klaster (Slika 16a). Na razdvajanje hibrida ZP355su uticao je sadržaj α -T, $\beta+\gamma$ -T, α -T3, fruktoze, panoze, maltoze, cimetne i kofeinske kiseline (Slika 16b) ukazujući da primenjeni tretmani izazivaju aktiviranje neenzimskih antioksidanasa kao odgovor biljke na abiotički stres. Grupisanje i izdvajanje hibrida ZP515su u odnosu na ostale hibride nakon primenjenih tretmana bilo je uslovljeno sadržajem glukoze, saharoze, maltotrioze, trehaloze, izomaltotrioze, rafinoze, sorbitola, gentiobioze, δ -T i ferulinske kiseline (Slika 16b). Dobijeni rezultati pokazuju da primenjeni tretmani kod ovog genotipa više utiču na metabolizam ugljenih hidrata. Na delimično izdvajanje hibrida ZP504su nakon primene tretmana K, N i N + FĐ uticaj je imao sadržaj L + Z (Slika 16). Sadržaj arabinoze, turanoze, β -karotena, sinapinske i protokatehinske kiseline je uticao na delimično grupisanje hibrida ZP504su nakon primene M, M + FĐ i hibrida ZP553su nakon primene M + FĐ (Slika 16). Na osnovu dobijenih podataka može se reći da ispitivani hibridi pokazuju karakterističan i donekle jedinstven odgovor u pogledu sadržaja određenih fitohemikalija nakon primenjenih tretmana. Takođe, dobijeni rezultati mogu biti od velike koristi selekcionerima koji se bave poboljšanjem nutritivnih karakteristika genotipova kukuruza šećerca u cilju povećanja njegove vrednosti u smislu funkcionalne hrane.

Zanimljivo je istaći da je u toku 2016. godine kao meteorološki optimalne za gajenje kukuruza takođe zabeleženo izdvajanje hibrida ZP355su i ZP515su (Prilog 5) kao i kada se primeni PCA na prosečan sadržaj fitohemikalija tokom obe godine ispitivanja. Na razdvajanje hibrida ZP355su uticao je sadržaj α -T, $\beta+\gamma$ -T, α -T3, fruktoze, panoze, maltoze, izomaltoze, δ -T3 i kofeinske kiseline (Prilog 5). Svi pomenuti parametri, sem sadržaja izomaltoze i δ -T3 su imali uticaj na grupisanje pomenutog genotipa i kada je primenjena PCA na prosečan sadržaj fitohemikalija tokom obe godine ispitivanja. Grupisanje i izdvajanje hibrida ZP515su u odnosu na ostale hibride nakon primenjenih tretmana bilo je uslovljeno sadržajem maltotrioze, izomaltotrioze, rafinoze, sorbitola, δ -T, $\beta+\gamma$ -T3, cimetne, *p*-kumarinske i ferulinske kiseline (Prilog 5). U toku sušne 2017. godine hibrid ZP515su se takođe izdvojio od ostalih hibrida kao kada se primeni PCA na prosečan sadržaj fitohemikalija tokom obe godine ispitivanja što nije bio slučaj sa ZP355su. Na grupisanje hibrida ZP515su uticao je sadržaj α -T3, L + Z, saharoze, α -T, δ -T i ferulinske kiseline (Prilog 5). S obzirom da je u obe godine sadržaj δ -T i ferulinske kiseline imao uticaj na izdvajanje pomenutog hibrida može se pretpostaviti da su ove dve fitohemikalije veoma bitne u odgovoru ovog genotipa na stres, odnosno primenjene tretmane. Ova pretpostavka je potvrđena PC analizom na prosečan sadržaj fitohemikalija tokom obe godine ispitivanja (Slika 16b). Zanimljivo je takođe da su se kontrolni uzorci svih hibrida u 2017. godini nakon PCA delimično izdvojili i njihovo grupisanje bilo je indukovano sadržajem rafinoze, glukoze, izomaltotrioze, gentiobioze, trehaloze, arabinoze i maltotrioze (Prilog 5) ukazujući da su ovi šećeri veoma bitni u odgovoru biljke na sušu.

Dendrogram dobijen klusterskom analizom pokazao je izdvajanje hibrida ZP355su i ZP515su od ostalih ispitivanih hibrida kao i grafik skorova PC analize (Slika 17). Za razliku od PC analize, na dendrogramu jasno se izdvajaju dva klastera sa istim hibridima ZP504su i ZP553su, pri čemu su u prvom klasteru obuhvaćeni tretmani M i M + FĐ, a u drugom tretmani K, N i N + FĐ.

Ovakav podatak sugerise da iako genotipovi nemaju zajednicku genetičku osnovu može se ipak donekle reći da postoji jedinstven odgovor biljke nakon izlaganja stresu kao što je primena određenog tretmana.

5.4. Prinos i povezanost sa sadržajem ispitivanih fitohemikalija

Prosečni prinos svežeg klipa ispitivanih hibrida u 2017. godini bio je približno 1,5 puta manji nego u 2016. godini (Tabela 15). Razlog su svakako nepovoljni meteorološki uslovi tokom 2017. godine, sa visokim prosečnim vrednostima temperatura i generalno manjkom padavina (Tabela 3). Ovakvi stresni uslovi imaju itetako uticaj na razviće kukuruza koji su se dalje odrazili na smanjenje prinosa. Tokom vegetacione sezone 2016. godine prosečna temperatura je bila niža, dok su ukupne padavine približno 1,7 puta bile veće u poređenju sa vegetacionom sezonom 2017. godine (Tabela 3). Značajne razlike primećene su uglavnom u junu (u vreme cvetanja) kada je bilo samo 39,0 mm padavina u 2017. godini, nasuprot 107,4 mm u 2016. godini. Slično tome, prosečne temperature u maju i junu bile su za 1,0 °C i 1,4 °C, respektivno, više u 2017. u odnosu na 2016. godinu.

Dobijeni rezultati pokazali su da nikosulfuron i mezotrion nisu imali statistički značajan uticaj na prinos hibrida šećerca nakon primene (Tabela 15), što je u skladu sa Grey i saradnici (2000), O'Sullivan i saradnici (2002) kao i Robinson i saradnici (1993). Razlog za smanjenje tolerantnosti kukuruza prema primenjenom herbicidu i nemogućnosti useva da se oporavi može se pripisati i nepovoljnim agroekološkim uslovima, kao što su karakteristike zemljišta, pH, količina organske supstance u zemljištu, vlaga i temperatura zemljišta (Stefanović i saradnici, 2011). Zbog toga može se javiti visoka varijabilnost u reakciji istog hibrida i nakon primene istog herbicida tokom različitih vegetacionih sezona (Meyer i saradnici, 2010), što je i zabeleženo u ovoj disertaciji (Tabela 15).

S obzirom da do sada nije objavljena nijedna studija sa ovakvom temom i da je još uvek nije dovoljno ispitivan efekat kombinacija herbicida i folijarnih đubriva kod kukuruza šećerca, možda smanjenje prinosa koje postoji u tretmanima M + FĐ i N + FĐ, iako statistički nije značajno, može da ukazuje na nekompatibilnost herbicida i primenjenog đubriva. Slično dobijenim rezultatima u ovoj disertaciji, kombinacija metribuzina i folijarnog đubriva nije pokazala pozitivan efekat na prinos šargarepe (Silva i saradnici, 2017). Brankov (2016) sugerise da primena folijarnog đubriva značajno i pozitivno utiče na prinos linija kukuruza jer omogućava biljci da se brže i efikasnije oporavi od stresa, što je suprotno od rezultata dobijenih u ovoj studiji. Mogući razlog za smanjenje prinosa nakon primene tretmana sa FĐ može pripisati i cinjenici da efikasnost folijarne prihrane zavisi od ađuvanta, rastvorljivosti, apsorpcije i kompatibilnosti sa različitim agro-hemikalijama uključujući i herbicide (Oosterhuis, 2009). Ahmad i saradnici (2015) su pokazali da primena folijarnog đubriva obezbeđuje veći prinos kukuruza u uslovima suše, što je potvrđeno u toku sušne godine 2017. i to kod hibrida ZP355su i ZP515su gde je nakon primene M + FĐ i N + FĐ, iako statistički nije značajno, zabeležen trend povećanja prinosa u poređenju sa kontrolom (Tabela 15).

Od ispitivanih karotenoida, sadržaj β -karotena u fazi I lista pokazao je negativnu zavisnost u odnosu na prinos kod svih hibrida sem kod hibrida ZP515su, dok je sadržaj L + Z u fazi II lista takođe pokazao negativnu zavisnost u odnosu na prinos kod svih hibrida (Tabele 16 i 17). Ipak, pozitivna korelacija između ukupnog sadržaja karotenoida i prinosa zabeležena je samo u ZP355su. Ovakav podatak bi mogao imati veze sa većom izloženošću stresu, koji utiče na pojačanu sintezu karotenoida u listovima gajenih biljaka (Mibei i saradnici, 2016), a takođe se paralelno odražava i na smanjenje prinosa zrna. Pozitivna zavisnost prinosa i sadržaja cimetne kiseline tokom obe faze je zabeležena u listu hibrida ZP553su i ZP515su (Tabele 16 i 17).

Antioksidativna aktivnost u fazi II lista bila je negativno korelisana sa prinosom kod svih hibrida sem kod hibrida ZP504*su* (Tabela 17). Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u fazi II lista kod svih hibrida bio je pozitivno korelisana sa prinosom (Tabela 17) dok je obrnuti trend zabeležen u zrnu (Tabela 18). Ovo ukazuje na značajnu ulogu fenolnih jedinjenja u održavanju antioksidativnog kapaciteta u uslovima stresa u zelenim delovima biljaka, i da se usled produženog stresa, sa druge strane, pozitivno odražava na nalivanje zrna, tj. prinos kukuruza, kao i nakupljanje fenolnih jedinjenja u zrnu (Doğru i Bayram, 2016). U zrnu sadržaj ukupnog vitamina E bio je pozitivno korelisana sa prinosom kod svih hibrida (Tabela 18), sem kod ZP515*su* dok je pozitivna korelacija između sadržaja α -tokoferola i prinosa pronađena samo kod hibrida ZP355*su*.

6. Zaključak

U ovoj disertaciji su u cilju karakterizacije i određivanja fitohemijskog profila četiri hibrida kukuruza šećerca: ZP504*su*, ZP355*su*, ZP553*su* i ZP515*su* optimizovani postupci pripreme uzoraka i uslova za analizu primenom savremenih hromatografskih metoda. Na osnovu parametara validacije pokazano je da hromatografske metode primenjene u ovoj disertaciji za kvantifikaciju karotenoida, slobodnih fenolnih kiselina, tokoferola i tokotrienola imaju dobru linearnost, tačnost kao i nisku granicu detekcije. Pored parametara validacije, direktno injektovanje profiltriranog ekstrakta u HPLC sistem i kratko vreme trajanja analize omogućili su rutinsko korišćenje hromatografskih metoda za određivanje sadržaja pomenutih fitohemikalija. Dodatno, niskim vrednostima granica detekcije i skraćenim vremenom ekstrahovanja postignuta je veća osetljivost i vremenska efikasnost hromatografske metode za identifikaciju i kvantifikaciju slobodnih fenolnih kiselina. Postignuto hromatografsko razdvajanje dobre rezolucije željenih analita korišćenjem nižih protoka mobilnih faza uz ujedno smanjen utrošak štetnih organskih rastvarača ukazuje da primenjene metode u ovoj disertaciji prate principe i trendove zelene analitičke hemije.

Prema literaturnim podacima do sada nije objavljena nijedna studija koja ispituje uticaj herbicida u kombinaciji sa folijarnom prihranom na sadržaj ovako velikog broja pojedinačnih fitohemikalija, posebno funkcionalnih oligosaharida i fenolnih kiselina u zrnu kukuruza šećerca. Utvrđene vrednosti sadržaja ispitivanih fitohemikalija (3 karotenoida, 5 fenolnih kiselina, 3 tokoferola, 3 tokotrienola, 14 šećera i 1 poliol) u ovom radu ukazale su na visok nutritivni kvalitet tehnološki zrelog zrna kukuruza šećerca i time doprinele svesti o dragocenim nutritivnim karakteristikama šećerca koje mogu biti od velike koristi u programima opemenjivanja. Najveći sadržaj ispitivanih fitohemikalija u kontrolnim uzorcima zabeležen je kod hibrida ZP355*su* i ZP515*su*, respektivno. Od svih ispitivanih fitohemikalija posebnu pažnju privukli su po prvi put određeni funkcionalni oligosaharidi (izomaltoza, izomaltotrioza, panoza, trehaloza, maltotrioza, rafinoza) i značajno istakli fitohemijski potencijal kukuruza šećerca sa teritorije Srbije u smislu funkcionalne hrane koja ne prestaje da bude predmet aktuelnih istraživanja. Dobijeni rezultati su pokazali da je rafinoza bila najzastupljenija među ispitivanim oligosaharidima i da je u kontrolnim uzorcima u najvećoj koncentraciji zabeležena kod hibrida ZP515*su*.

U ovom radu uticaj tretmana (herbicidi mezotrion i nikosulfuron sa ili bez primene folijarnog đubriva) nakon dva dana i dve nedelje od njihove primene na sadržaj antioksidanasa (karotenoidi i fenolne kiseline) u listu kao i na sadržaj različitih klasa jedinjenja (karotenoidi, fenolne kiseline, tokoferoli, tokotrienoli i šećeri) u tehnološkoj zrelosti zrna kukuruza šećerca, prema našim saznanjima, po prvi put je ispitan. Na osnovu dobijenih rezultata uočeno je da je uticaj ispitivanih tretmana bio izraženiji u zrnu, odnosno u listu u većini slučajeva uticaj primenjenih tretmana na sadržaj ispitivanih antioksidanasa nije bio statistički značajan. Kao mogući razlog ovakvog rezultata može se prvenstveno navesti kratko prolazno vreme od primene tretmana do određivanja sadržaja antioksidanasa, a zatim i nepovoljni meteorološki uslovi tokom 2017. godine koji su dodatno izazvali stres kod biljke i na taj način u većoj meri umanjili njen odgovor. Primenjeni tretmani u listu su pokazali veći uticaj na sadržaj fenolnih kiselina nego na sadržaj karotenoida i to u II fazi, odnosno dve nedelje od primene. Dobijeni rezultati pokazali su da primenjeni tretmani nisu imali statistički značajan uticaj na prinos svežeg zrna šećerca. Navedeni zaključci su izvedeni na osnovu prosečnog sadržaja fitohemikalija tokom obe godine ispitivanja u tehnološkoj zrelosti zrna šećerca kao najmerodavniji odgovor genotipa na primenjene tretmane.

- U zrnu hibrida ZP504su nakon primene oba herbicida zabeleženo je statistički značajno smanjenje ukupnog sadržaja šećera i povećanje ukupnog sadržaja svih ostalih ispitivanih fitohemikalija. Primenjeno folijarno đubrivo u kombinaciji sa mezotrionom u ovom genotipu delovalo je stimulatивно i dovelo je do statistički značajnog povećanja ukupnog sadržaja svih ispitivanih fitohemikalija što ukazuje da je folijarna prihrana omogućila da se biljka izbori sa stresom koji herbicidi u ovom hibridu prouzrokuju. Dobijene vrednosti prinosa zrna u ovom genotipu bile su u negativnoj korelaciji sa sadržajem vitamina E.
- U zrnu hibrida ZP355su primenjeni herbicidi pokazali su različit uticaj na sadržaj fitohemikalija. Mezotrion je doveo do statistički značajnog smanjenja ukupnog sadržaja karotenoida, vitamina E, šećera, fenolnih jedinjenja i ujedno do povećanja ukupnog sadržaja slobodnih fenolnih kiselina, glutationa i antioksidativne aktivnosti. Sa druge strane, nikosulfuron je doveo do statistički značajnog povećanja sadržaja svih ispitivanih parametara sem sadržaja šećera. Efekat primenjenog folijarnog đubriva u kombinaciji sa primenjenim herbicidima je varirao u pogledu sadržaja ispitivanih fitohemikalija ukazujući na moguću ili nekompatibilnost herbicida i folijarnog đubriva ili malu dozu folijarnog đubriva. Ovaj genotip izdvojen je PCA analizom pri čemu je najveći uticaj na njegovo grupisanje imao sadržaj α -T, $\beta+\gamma$ -T, α -T3, fruktoze, panoze, maltoze, cimetine i kofeinske kiseline. Ovakav podatak ukazuje da su primenjeni tretmani izazvali aktiviranje neenzimskih antioksidanasa kao odgovor biljke na abiotički stres koji primenjeni tretmani izazivaju. Vrednosti prinosa zrna ovog hibrida bile su u pozitivnoj korelaciji sa ukupnim sadržajem karotenoida, vitamina E i fenolnih jedinjenja i ujedno u negativnoj korelaciji sa sadržajem ukupnih slobodnih fenolnih kiselina.
- U zrnu hibrida ZP553su nakon primene oba herbicida zabeleženo je statistički značajno povećanje ukupnog sadržaja svih ispitivanih fitohemikalija te se na osnovu toga ovaj genotip može definisati kao tolerantnim prema testiranim herbicidima. I pored ovakvog rezultata, PCA analiza ovaj genotip nije izdvojila od ostalih testiranih hibrida. Zanimljivo je napomenuti da od svih testiranih hibrida jedino kod ovog hibrida su oba primenjena herbicida dovela do statistički značajnog povećanja sadržaja ukupnih šećera. Efekat primenjenog folijarnog đubriva sa primenjenim herbicidima je varirao u pogledu sadržaja ispitivanih fitohemikalija ukazujući na moguću ili nekompatibilnost herbicida i folijarnog đubriva ili malu dozu folijarnog đubriva. Na osnovu dobijenih rezultata, u ovom genotipu trebalo bi primeniti neko drugo folijarno đubrivo, pogotovo u kombinaciji sa mezotrionom, kako bi se postigli bolji rezultati, u smislu pozitivnijeg učinka folijarne prihrane. Kod ovog genotipa dobijene vrednosti prinosa zrna bile su pozitivno korelisane sa ukupnim sadržajem vitamina E i slobodnim fenolnim jedinjenjima i ujedno negativno korelisane sa ukupnim sadržajem fenolnih kiselina i šećera.
- U zrnu hibrida ZP515su primenjeni herbicidi pokazali su različit uticaj na sadržaj fitohemikalija. Nikosulfuron doveo je do statistički značajnog smanjenja ukupnog sadržaja svih ispitivanih fitohemikalija sem sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja. Mezotrion je doveo do statistički značajnog povećanja ukupnog sadržaja fenolnih kiselina, šećera, fenolnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti i ujedno do smanjenja ostalih parametara. Primenjeno folijarno đubrivo u kombinaciji sa nikosulfuronom u ovom genotipu delovalo je stimulatивно i dovelo je do statistički značajnog povećanja ukupnog sadržaja svih ispitivanih fitohemikalija što dalje ukazuje da je ono omogućilo da se biljka izbori sa stresom koji herbicidi prouzrokuju. PCA analizom ovaj genotip je izdvojen od ostalih testiranih hibrida, a na to su uticali sadržaj glukoze, saharoze, maltotrioze, trehaloze, izomaltotrioze, rafinoze, sorbitola, gentiobioze, δ -T i ferulinske kiseline.

- Ovakav podatak ukazuje da su primenjeni tretmani izazvali aktiviranje određenih fitohemikalija kao odgovor biljke na abiotički stres koji primenjeni tretmani izazivaju. Ujedno ovakav podatak ukazuje i da primenjeni tretmani kod ovog genotipa utiču više na metabolizam ugljenih hidrata za razliku od hibrida ZP355su, što dalje pokazuje da svaki genotip različito reaguje i aktivira mehanizme odbrane kada se primene herbicidi. Ovaj rezultat pokazuje i potvrđuje neophodnost ispitivanja i definisanja tolerantnosti genotipova šećerca prema herbicidima u cilju dobijanja što kvalitetnijeg proizvoda nakon primene agrotehničkih mera. Kod ovog genotipa vrednosti prinosa zrna bile su pozitivno korelisane sa ukupnim sadržajem slobodnih fenolnih kiselina i jedinjenja i ujedno negativno korelisane sa ukupnim sadržajem šećera.

U ovoj disertaciji pokazano je da se tolerantnost genotipa ne može definisati na osnovu jednog parametra i predočena je kompleksnost odgovora biljke na stres izazvanim herbicidima kako u najranijim fazama lista tako i u zreloom zrnu. S obzirom na oskudnost u literaturnim podacima o efektu kombinacije herbicida i folijarnih đubriva na fitohemijski profil kukuruza šećerca rezultati ove disertacije ukazuju na potrebu novih istraživanja u oblasti transkriptomike i metabolomike kako bi se razumeli naizgled nedokučivi biljni procesi koji dovode do velikih variranja u sadržaju fitohemikalija usled njihove primene. Rezultati ovog istraživanja ukazali su da se sadržaj karotenoida, vitamina E, fenolnih kiselina i šećera može koristiti kao karakterističan fitohemijski pokazatelj genotipa nakon primenjenih tretmana. Dobijeni rezultati u ovoj disertaciji ukazali su da se na nov način, putem agrotehničkih mera, tačnije primenom herbicida, kao i njihove odgovarajuće kombinacije sa folijarnom prihranom, može poboljšati fitohemijski profil tehnološki zrelog zrna kukuruza šećerca. Po prvi put pokazano je da se herbicidi, pored primene u suzbijanju korova, što i jeste njihova primarna uloga u poljoprivrednoj praksi, mogu koristiti kada se primenjuju u propisanoj i dozvoljenoj koncentraciji i kao sredstva pomoću kojih se može povećati i popraviti nutritivni status tolerantnog genotipa kukuruza šećerca.

7. Literatura

- Abe, N., Murata, T., Hirota, A. (1998). Novel DPPH radical scavengers, bisorbicillinol and demethyltrichodimerol, from a fungus. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 62(4), 661-666.
- Abidi, S. (2000). Chromatographic analysis of tocol-derived lipid antioxidants. *Journal of Chromatography A*, 881(1-2), 197-216.
- Agarwal, M., Parameswari, R., Vasanthi, H., Das, D. (2012). Dynamic action of carotenoids in cardioprotection and maintenance of cardiac health. *Molecules*, 17(4), 4755-4769.
- Ahmad, Z., Waraich, E., Ahmad, T., Ahmad, R., Awan, M. (2015). Yield responses of maize as influenced by supplemental foliar applied phosphorus under drought stress. *International Journal of Food and Allied Sciences*, 1(2), 45-55.
- Ahsan, H., Ahad, A., Iqbal, J., Siddiqui, W. (2014). Pharmacological potential of tocotrienols: A review. *Nutrition and Metabolism*, 11(1), 52.
- Alan, O., Kinaci, G., Kinaci, E., Basciftci, Z., Sonmez, K., Evrenosoglu, Y., Kutlu, I. (2014). Kernel quality of some sweet corn varieties in relation to processing. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 42(2), 414-419.
- Amorim-Carrilho, K., Cepeda, A., Fente, C., Regal, P. (2014). Review of methods for analysis of carotenoids. *Trends in Analytical Chemistry*, 56, 49-73.
- Anderson, A., and Ng, P. (2000). Changes in disulfide and sulfhydryl contents and electrophoretic patterns of extruded wheat flour proteins. *Cereal Chemistry*, 77, 354-359.
- Annunziata, M., Attico, A., Woodrow, P., Oliva, M., Fuggi, A., Carillo, P. (2012). An improved fluorimetric HPLC method for quantifying tocopherols in *Brassica rapa* L. subsp. *sylvestris* after harvest. *Journal of Food Composition and Analysis*, 27(2), 145-150.
- Arceusz, A., Wesolowski, M., Konieczynski, P. (2013). Methods for extraction and determination of phenolic acids in medicinal plants: A review. *Natural Product Communications*, 8(12), 1821-1829.
- Basu, H., Del Vecchio, A., Flider, F., Orthoefer, F. (2001). Nutritional and potential disease prevention properties of carotenoids. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78(7), 665-675.
- Bi, H., Kovalchuk, N., Langridge, P., Tricker, P.J., Lopato, S., Borisjuk, N. (2017). The impact of drought on wheat leaf cuticle properties. *BMC Plant Biology*, 7(1), 85.
- Boz, H. (2015). Ferulic acid in cereals - A review. *Czech Journal of Food Sciences*, 33(1), 1-7.
- Brankov, M. (2016) Doktorska disertacija: Efekti primene herbicida i folijarnih đubriva na samooplodne linije kukuruza.
- Brankov, M., Dragičević, V., Simić, M., Filipović, M., Kresović, M., Mandić, V. (2017). Diminishing herbicide stress in maize inbred lines by application of foliar fertiliser. *Journal of Environmental Protection and Ecology*, 18, 1440-1449.
- Cahoon, E., Hall, S., Ripp, K., Ganzke, T., Hitz, W., Coughlan, S. (2003). Metabolic redesign of vitamin E biosynthesis in plants for tocotrienol production and increased antioxidant content. *Nature Biotechnology*, 21(9), 1082-1087.
- Cheng, W., Lu, J., Li, B., Lin, W., Zhang, Z., Wei, X., Sun, C., Chi, M., Bi, W., Yang, B., Jiang, A., Yuan, J. (2017). Effect of functional oligosaccharides and ordinary dietary fiber on intestinal microbiota diversity. *Frontiers in Microbiology*, 8.
- Clemente, J., Martinez, H., Pedrosa, A., Poltronieri, N.Y., Cecon, P., Jifon, J. (2018). Boron, copper, and zinc affect the productivity, cup quality, and chemical compounds in coffee beans. *Journal of Food Quality*, 1-14.
- Cutulle, M., Armel, G., Kopsell, D., Wilson, H., Brosnan, J., Vargas, J., Hines, T., Koepke-Hill, R. (2018). Several pesticides influence the nutritional content of sweet corn. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 66, 3086-3092.

- Daniel, O., Meier, M.S, Schlatter, J., Frischknecht, P. (1999). Selected phenolic compounds in cultivated plants: ecologic functions, health implications, and modulation by pesticides. *Environmental Health Perspectives*, 107(Suppl 1), 109–114.
- Daood, H., Bencze, G., Palotás, G, Pék, Z., Sidikov, A., Helyes, L. (2014). HPLC analysis of carotenoids from tomatoes using cross-linked C18 column and MS detection. *Journal of Chromatographic Science*, 52(9), 985-991.
- Das, A. K., Singh, V. (2016). Antioxidative free and bound phenolic constituents in botanical fractions of Indian specialty maize (*Zea mays* L.) genotypes. *Food Chemistry*, 201, 298–306.
- Dashty, M. (2013). A quick look at biochemistry: Carbohydrate metabolism. *Clinical Biochemistry*, 46(15), 1339-1352.
- Dauchet, L., Amouyel, P., Hercberg, S., Dallongeville, J. (2006). Fruit and vegetable consumption and risk of coronary heart disease: A meta-analysis of cohort studies *The Journal of Nutrition*, 136(10), 2588-2593.
- de Carvalho, S., Nicolai, M., Ferreira, R., De Oliveira Figueira, A., Christoffoleti, P. (2009). Herbicide selectivity by differential metabolism: Considerations for reducing crop damages. *Scientia Agricola*, 66(1), 136-142.
- Delchev, G., Dospatliev, L., Katrandzhiev, N., Stoyanova, A. (2015). Durum wheat grain yield and quality influenced by some mixtures of foliar fertilizers and combined herbicides. *Sciences Agraires*, 68(9), 1205-1212.
- DellaPenna, D. (2005). A decade of progress in understanding vitamin E synthesis in plants *Journal of Plant Physiology*, 162, 729-737.
- Dewanto, V., Wu, X., Liu, R. H. (2002). Processed sweet corn has higher antioxidant activity, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 4959-4964.
- Divya, P., Puthusseri, B., Neelwarne, B. (2012). Carotenoid content, its stability during drying and the antioxidant activity of commercial coriander (*Coriandrum sativum* L.) varieties. *Food Research International*, 45(1), 342-350.
- Doğru, A., Bayram, N. (2016). A study on drought stress tolerance in some maize (*Zea mays* L.) cultivars. *Sakarya University Journal of Science Archive*, 20(3), 509-519.
- dos Santos, W. D., Ferrarese, M. L., Nakamura, C. V., Mourão, K. S., Mangolin, C. A., Ferrarese-Filho, O. (2008). Soybean (*Glycine max*) root lignification induced by ferulic acid. The possible mode of action. *Journal of Chemical Ecology*, 34, 1230–1241.
- Dragičević, V., Simić, M., Sečanski, M., Cvijanović, G., Nišavić, A. (2012). Study of the susceptibility of maize lines to some sulfonylurea herbicides. *Genetika*, 44(2), 355-366.
- Edwards, R., Brazier-Hicks, M., Dixon, D. P., Cummins, I. (2005). Chemical manipulation of antioxidant defenses in plants. *Advances in Botanical Research*, 42, 1-32.
- Everette, J., Bryant, Q., Green, A., Abbe, Y., Wangila, G., Walker, R. (2010). Thorough study of reactivity of various compound classes toward the folin-Ciocalteu reagent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(14), 8139-8144.
- Fageria, N., Filho, M., Moreira, A., Guimarães, C. (2009). Foliar fertilization of crop plants. *Journal of Plant Nutrition*, 32(6), 1044-1064.
- FAOSTAT, 2016. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Statistics Division. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/TP>
- Fernández, V. Sotiropoulos, T., Brown, P. (2013). International Fertilizer Foliar Fertilization Scientific Principles and Field Practices. International Fertilizer Industry Association (IFA) Paris, France.
- Fernández-Escobar, R., Beltrán, G., Sánchez-Zamora, M., García-Novelo, J., Aguilera, M., Uceda, M. (2006). Olive oil quality decreases with N over-fertilization. *HortScience*, 41, 215–219.
- Galanakis, C. M., Goulas, V., Tsakona, S., Manganaris, G. A., Gekas, V. (2013). A knowledge base for the recovery of natural phenols with different solvents. *International Journal of Food Properties*, 16, 382-396.

- Gazola, D., Zucareli, C., Ringenberg, R., da Graça, J., Hoffmann-Campo C. (2018). Nitrogen fertilization in the contents of secondary compounds in cassava cultivars Semina. *Ciências Agrárias, Londrina*, 39(3), 1015-1028.
- Giannoccaro, E., Wang, Y., Chen, P. (2006). Effects of solvent, temperature, time, solvent-to-sample ratio, sample size, and defatting on the extraction of soluble sugars in soybean. *Journal of Food Science*, 71(1).
- Gill, S., Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48 (12): 909-930.
- Gliszczynska-Swiglo, A., Sikorska, E. (2004). Simple reversed-phase liquid chromatography method for determination of tocopherols in edible plant oils. *Journal of Chromatography A*, 1048, 195–198.
- Gonzalez, J., Ukrainczyk, L. (1996). Adsorption and desorption of nicosulfuron in soils. *Journal of Environmental Quality*, 25(6), 1186-1192.
- Guo, R., Shi, L., Jiao, Y., Li, M., Zhong, X., Gu, F., Liu, Q., Xia, X., Li, H. (2018). Metabolic responses to drought stress in the tissues of drought-tolerant and drought-sensitive wheat genotype seedlings. *AoB Plants*, 10(2).
- Habibi, G. (2019). Effects of mild and severe drought stress on the biomass, phenolic compounds production and photochemical activity of Aloe vera (L.) Burm.f. *Acta Agriculturae Slovenica*, 111(2), 463-476.
- Havaux, M. (2014). Carotenoid oxidation products as stress signals in plants. *Plant Journal*, 79(4), 597-606.
- Hincha, D., Zuther, E., Hellwege, E., Heyer, A. (2002). Specific effects of fructo- and gluco-oligosaccharides in the preservation of liposomes during drying. *Glycobiology*, 12(2), 103-110.
- Howe, J., Tanumihardjo, S. (2006). Evaluation of analytical methods for carotenoid extraction from biofortified maize (*Zea mays* sp.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(21), 7992-7997.
- Huang, L., Lin, C., Li, A., Wei, B., Teng, J., Li, L. (2010). Pro-coagulant activity of phenolic acids isolated from *Blumea riparia*. *Natural Product Communications*, 5, 1263-1266.
- Hura, T., Hura, K., Grzesiak, S. (2008). Contents of total phenolics and ferulic acid, and pal activity during water potential changes in leaves of maize single-cross hybrids of different drought tolerance. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 194(2), 104-112.
- Ibrahim, K., Juvik, J. (2009). Feasibility for improving phytonutrient content in vegetable crops using conventional breeding strategies: case study with carotenoids and tocopherols in sweet corn and broccoli. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 4636–4644.
- Ibrahim, O. (2018). Functional oligosaccharide: chemicals structure, manufacturing, health benefits, applications and regulations. *Journal of Food Chemistry & Nanotechnology*, 4(4).
- Inbaraj, B., Lu, H., Kao, T., Chen, B. (2010). Simultaneous determination of phenolic acids and flavonoids in *Lycium barbarum* Linnaeus by HPLC-DAD-ESI-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51(3), 549-556.
- Jones, C. G., Hartley, S. E. (1999). A protein competition model of phenolic allocation. *Oikos*, 86, 27-44.
- Kanayama, Y., Sato, K., Ikeda, H., Tamura, T., Nishiyama, M., Kanahama, K. (2013). Seasonal changes in abiotic stress tolerance and concentrations of tocopherol, sugar, and ascorbic acid in sea buckthorn leaves and stems. *Scientia Horticulturae*, 164(17), 232-237.
- Kaplan, F., Guy, C. (2004). beta-Amylase induction and the protective role of maltose during temperature shock. *Plant Physiology*, 135(3), 1674-1684.
- Karadag, A., Ozcelik, B., Saner, S. (2009). Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food Analytical Methods*, 2(1), 41-60.

- Karkacier, M., Erbas, M., Uslu, M., Aksu, M. (2003). Comparison of different extraction and detection methods for sugars using amino-bonded phase HPLC. *Journal of Chromatographic Science*, 41(6), 331-333.
- Kedare, S., Singh, R. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*, 48(4), 412-422.
- Kim, J., Yun, B., Choi, J., Kim, T., Kwak, S., Cho, K. (2004). Death mechanisms caused by carotenoid biosynthesis inhibitors in green and in undeveloped plant tissues. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 78,(3), 127-139.
- Knecht, K., Sandfuchs, K., Kulling, S., Bunzel, D. (2015). Tocopherol and tocotrienol analysis in raw and cooked vegetables: A validated method with emphasis on sample preparation. *Food Chemistry*, 169, 20-27.
- Kopsell, D., Armel, G., Mueller, T., Sams, C., Deyton, D., McElroy, J., Kopsell, D. (2009). Increase in nutritionally important sweet corn kernel carotenoids following mesotrione and atrazine applications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57, 6362-6368.
- Kopsell, D.A., Armel, G.R., Abney, K.R., Vargas, J.J., Brosnan, J.T., Kopsell, D.E. (2011). Leaf tissue pigments and chlorophyll fluorescence parameters vary among sweet corn genotypes of differential herbicide sensitivity. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 99(2),194–199.
- Kurilich, A., Juvik, J. (1999). Quantification of carotenoid and cocopherol antioxidants in Zea Mays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1948-1955.
- Lambert, J., Yang, C. (2003). Mechanisms of cancer prevention by tea constituents. *The Journal of Nutrition*, 133(10), 3262S-3267S.
- Legzdina L., Ivdre, E., Piliksere, D., Vaivode, A., Mieriņa, I., Jure, M. (2018). Effect of genotype and crop management systems on the content of antioxidants in hulless and covered spring barley. *Zemdirbyste-Agriculture*, 105, (4), 315–322.
- Lester, G., Jifon, J., Rogers, G. (2005). Supplemental foliar potassium applications with or without a surfactant can enhance netted muskmelon quality. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 130(4), 649–653.
- Lim, H., Woo, S., Hong, S., Jong, S., Lee, J. (2007). Comparison of extraction methods for determining tocopherols in soybeans. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109(11), 1124-1127.
- Lin, J-T., Liu, S-H, Tsay, G. J., Yang, D-J. (2010). Composition of flavonoids and phenolic acids in Glycin tomentella Hayata cultivated in various soils. *Food Chemistry*, 121, 659-665.
- Liu, C., Huang, Y., Hosokawa, M., Miyashita, K., Hu, M. (2009). Inhibition of proliferation of a hepatoma cell line by fucoxanthin in relation to cell cycle arrest and enhanced gap junctional intercellular communication. *Chemico-Biological Interactions*, 182(2-3), 165-172.
- Lock, K., Pomerleau, J., Causer, L., Altmann, D., McKee, M. (2005). The global burden of disease attributable to low consumption of fruit and vegetables: Implications for the global strategy on diet. *Bulletin of the World Health Organization*, 83(2), 100-108.
- Lockyer, S., White, A., Buttriss, J. (2018). Biofortified crops for tackling micronutrient deficiencies – what impact are these having in developing countries and could they be of relevance within Europe? *Nutrition Bulletin*, 43(4), 319-357.
- Loftsson, T., Duchêne, D. (2007). Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *International Journal of Pharmaceutics*, 329(1-2), pp. 1-11.
- Lucci, P., Saurina, J., Núñez, O. (2017). Trends in LC-MS and LC-HRMS analysis and characterization of polyphenols in food. *Trends in Analytical Chemistry*, 88, 1-24.
- Lugo-Cruz, E., Zavala-García, F., Rodríguez-Fuentes, H., Urías-Orona, V., Vidales-Contreras, J. A., Carranza-De La Rosa, R., Niño-Medina, G. (2018). The effect of drought stress on nutraceutical properties of Zea Mays bran. *Gesunde Pflanzen*, 4.
- Magné, C., Saladin, G., Clément, C. (2006). Transient effect of the herbicide flazasulfuron on carbohydrate physiology in Vitis vinifera L. *Chemosphere*, 62(4), 650-657.

- Maness, N. (2010). Extraction and analysis of soluble carbohydrates. *Methods in molecular biology*, 639, 341-370.
- Marschner, P. (2012). Mineral nutrition of higher plants. Academic Press, 3-5.
- Mattila, P., Kumpulainen, J. (2002). Determination of free and total phenolic acids in plant-derived foods by HPLC and diode-array detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3660-3667.
- May, M., Vernoux, T., Leaver, C., van Montagu M., Inze, D. (1998). Glutathione homeostasis in plants: Implications for environmental sensing and plant development. *Journal of Experimental Botany*, 49, 649-667.
- Meyer, M., Pataky, J., Williams, M. (2010). Genetic factors influencing adverse effects of mesotrione and nicosulfuron on sweet corn yield. *Agronomy Journal*, 102(4), 1138-1144.
- Mibei, E.K., Ambuko, J., Giovannoni, J.J., Onyango, A.N., Owino, W.O. (2016). Carotenoid profiling of the leaves of selected African eggplant accessions subjected to drought stress. *Food Science & Nutrition*, 5(1), 113-122.
- Michalowicz, J., Duda, W. (2009). The effects of 2,4,5-trichlorophenol on some antioxidative parameters and the activity of glutathione S-transferase in reed canary grass leaves (*Phalaris arudinacea*). *Polish Journal of Environmental Studies*, 18(5), 845-852.
- Mitchell, G., Bartlett, D., Fraser, T., Hawkes, T., Holt, D., Townson, J., Wichert, R. (2001). Mesotrione: A new selective herbicide for use in maize. *Pest Management Science*, 57(2), 120-128.
- Mitei, Y., Ngila, J., Yeboah, S., Wessjohann, L., Schmidt, J. (2009). Profiling of phytosterols, tocopherols and tocotrienols in selected seed oils from botswana by GC-MS and HPLC. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 86(7), 617-625.
- Munné-Bosch, S. (2005). The role of α -tocopherol in plant stress tolerance. *Journal of Plant Physiology*, 162(7), 743-748.
- Muzhingi, T., Yeum, K., Russell, R., Johnson, E., Qin, J., Tang, G. (2008). Determination of carotenoids in yellow maize, the effects of saponification and food preparations. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 78(3), 112-120.
- Naczka, M., Shahidi, F. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 1523-1542.
- Nagy, G., Peng, T., Pohl, N. (2017). Recent liquid chromatographic approaches and developments for the separation and purification of carbohydrates. *Analytical Methods*, 9(24), 3579-3593.
- Nemat Alla, M., Badawi, A., Hassan, N., El-Bastawisy, Z., Badran, E. (2008). Herbicide tolerance in maize is related to increased levels of glutathione and glutathione-associated enzymes. *Acta Physiologiae Plantarum*, 30(3), 371-379.
- Nemat Alla, M., Hassan, N. (2006). Changes of antioxidants levels in two maize lines following atrazine treatments. *Plant Physiology and Biochemistry*, 44(4), 202-210.
- Nemat Alla, M.M., Younis, M.E. (1995). Herbicide effects on phenolic metabolism in maize (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.) seedling. *Journal of Experimental Botany*, 46, 1731-1736.
- Nishikawa, F., Kato, M., Hyodo, H., Ikoma, Y., Sugiura, M., Yano, M. (2005). Effect of sucrose on ascorbate level and expression of genes involved in the ascorbate biosynthesis and recycling pathway in harvested broccoli florets. *Journal of Experimental Botany*, 56, 65-72.
- Nishizawa, A., Yabuta, Y., Shigeoka, S. (2008). Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. *Plant Physiology*, 147, 1251-1263.
- Noctor, G., Foyer, C. (1998). Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen species under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49, 249-279.
- Nouman, W., Olson, M., Gull, T., Zubair, M., Basra, S., Qureshi, M., Sultan, M., Shaheen, M. (2018). Drought affects size, nutritional quality, antioxidant activities and phenolic acids pattern of *Moringa oleifera* Lam. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 91, 79-87.

- Nour, V., Trandafir, I., Cosmulescu, S. (2013). HPLC determination of phenolic acids, flavonoids and juglone in walnut leaves. *Journal of Chromatographic Science*, 51(9), 883-890.
- O'Sullivan, J., Sikkema, P., Thomas, R. (2000). Sweet corn (*Zea mays*) cultivar tolerance to nicosulfuron. *Canadian journal of plant science*, 80(2), 419-423.
- Obulesu, M., Dowlathabad, M., Bramhachari, P. (2011). Carotenoids and Alzheimer's Disease: An insight into therapeutic role of retinoids in animal models. *Neurochemistry International*, 59(5), 535-541.
- Oerke, E. (2006). Crop losses to pests. *Journal of Agricultural Science*, 144(1), 31-43.
- Ofori-Boateng, C, Lee, K. (2014). Ultrasonic-Assisted Extraction of α -Tocopherol Antioxidants from the Fronds of *Elaeis guineensis* Jacq.: Optimization, Kinetics, and Thermodynamic Studies. *Food Analytical Methods*, 7(2), 257-267.
- Oosterhuis, D. (2009). Foliar fertilization: mechanisms and magnitude of nutrient uptake. *Paper for the Fluid Fertilizer*, Foundation meeting in Scottsdale, Arizona. February 15-17.
- Orcaray, L., Igal, M., Marino, D., Zabalza, A., Royuela, M. (2010). The possible role of quinate in the mode of action of glyphosate and acetolactate synthase inhibitors. *Pest Management Science*, 66(3), 262-269.
- Orcaray, L., Igal, M., Zabalza, A., Royuela, M. (2011). Role of exogenously supplied ferulic and p-coumaric acids in mimicking the mode of action of acetolactate synthase inhibiting herbicides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 10162-10168.
- O'Sullivan, J., Zandstra, J., Sikkema, P. (2002). Sweet corn (*Zea mays*) cultivar sensitivity to mesotrione. *Weed Technology*, 16(2), 421-425.
- Pallett, K. E., Young, A. J. (1993). Carotenoids. In: Alscher RG, Hess JL, eds. Antioxidants in higher plants. Boca Raton, FL: CRC Press, 91-110.
- Perveen, S., Iqbal, M., Nawaz, A., Parveen, A., Mahmood, S. (2016). Induction of drought tolerance in *Zea Mays* L. by foliar application of triacontanol. *Pakistan Journal of Botany*, 48(3), 907-915.
- Petry, F., C.; Mercadante, A., Z. (2018). New method for carotenoid extraction and analysis by HPLC-DAD-MS/MS in freeze-dried citrus and mango pulps. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 29(1), 205-215.
- Rafi, M., Kanakasabai, S., Reyes, M., Bright, J. (2013). Lycopene modulates growth and survival associated genes in prostate cancer. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 24(10), 1724-1734.
- Ramos, L. (2012). Critical overview of selected contemporary sample preparation techniques. *Journal of Chromatography A*, 1221, 84-98.
- Rashid Khan, M., Ahsan, H., Siddiqui, S., Siddiqui, W. (2015). Tocotrienols have a nephroprotective action against lipid-induced chronic renal dysfunction in rats. *Renal Failure*, 37(1), 136-143.
- Rivera, S., Canela, R (2012). Influence of sample processing on the analysis of carotenoids in maize. *Molecules*, 17(9), 11255-11268.
- Rivera-Madrid, R., Burnell, J., Aguilar-Espinosa, M., Rodríguez-Ávila, N., Lugo-Cervantes, E., Sáenz-Carbonell, L. (2013). Control of carotenoid gene expression in *Bixa orellana* L. leaves treated with norflurazon. *Plant Molecular Biology Reporter*, 31(6), 1422-1432.
- Robinson, D., Monks, D., Schultheis, J., Worsham, A. (1993). Sweet corn (*Zea mays*) cultivar tolerance to application timing of nicosulfuron. *Weed Technology*, 7(4), 840-843.
- Rodríguez-Casado, A. (2016). The health potential of fruits and vegetables phytochemicals: Notable Examples. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(7), 1097-1107.
- Rösler, J., Krekel, F., Amrhein, N., Schmid, J. (1997). Maize phenylalanine ammonia-lyase has tyrosine ammonia-lyase activity. *Plant Physiology*, 113, 175-179.
- Roussos, P., Tassis, A. (2011). Effects of girdling, nitrogen, zinc and auxin foliar spray applications on mandarin fruit "Nova" quality characteristics. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 23(5), 431-439.

- Rover, M., Brown, R. (2013). Quantification of total phenols in bio-oil using the Folin-Ciocalteu method. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 104, 366-371.
- Ruiz, J. M., Baghou, M., Bretones, G., Belakbir, A., Romero, L. (1998). N metabolism in tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L.): role of B as a possible regulatory factor. *International Journal of Plant Sciences*, 159, 121-126.
- Safawo, T., Senthil, N., Raveendran, M., Vellaikumar, S., Ganesan, K., Nallathambi, G., Saranya, S., Shobhana, V., Abirami, B., Gowri, E. (2010). Exploitation of natural variability in maize for β -carotene content using HPLC and gene specific markers. *Electronic Journal of Plant Breeding*, 1(4), 548-555.
- Saini, R., Keum, Y. (2016). Tocopherols and tocotrienols in plants and their products: A review on methods of extraction, chromatographic separation, and detection. *Food Research International*, 82, 59-70.
- Sánchez-Rangel, J., Benavides, J., Heredia, J., Cisneros-Zevallos, L., Jacobo-Velázquez, D. (2013). The Folin-Ciocalteu assay revisited: Improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Analytical Methods*, 5(21), 5990-5999.
- Santocono, M., Zurria, M., Berrettini, M., Fedeli, D., Falcioni, G. (2007). Lutein, zeaxanthin and astaxanthin protect against DNA damage in SK-N-SH human neuroblastoma cells induced by reactive nitrogen species. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 88(1), 1-10.
- Sari-Gorla, M., Ferrario, S., Rossini, L., Frova, C., Villa, M. (1993). Developmental expression of glutathione-S-transferase in maize and its possible connection with herbicide tolerance. *Euphytica*, 67(3), 221-230.
- Schmitzer, V., Slatnar, A., Mikulic-Petkovsek, M., Veberic, R., Krska, B., Stampar, F. (2011). Comparative study of primary and secondary metabolites in apricot (*Prunus armeniaca* L.) cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91, 860-866.
- Silva, G.S.D., Pessoa, G.D.O., Silva, D. V., Campos, E.R.D., Reis, M.R. D., Silva, A.A.D. (2017). Use of metribuzin, associated with different foliar fertilizers, on carrot crops. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 11(2), 351-358.
- Singleton, V., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.
- Smirnoff, N., Conklin, P. L., Loewus, F. A. (2001). Biosynthesis of ascorbic acid in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52, 437-467.
- Srdić, J. (2009). Doktorska disertacija: Genetička varijabilnost i kombinacione sposobnosti samooplođnih linija kukuruza šećerca (*Zea mays* L. Saccharata).
- Stefanović, L., Simić, M., Šinžar, B. (2011). Kontrola korova u agroekosistemu kukuruza, Društvo genetičara Srbije, Institut za kukuruz Zemun Polje, Beograd
- Stinco, C., Benítez-González, A., Hernanz, D., Vicario, I., Meléndez-Martínez, A. (2014). Development and validation of a rapid resolution liquid chromatography method for the screening of dietary plant isoprenoids: Carotenoids, tocopherols and chlorophylls. *Journal of Chromatography A*, 1370, 162-170.
- Stumpf, B., Feng, Y., Bernd, H. (2019). Influence of nitrogen fertilization on yield and phenolic compounds in wheat grains (*Triticum aestivum* L. ssp. *aestivum*). *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 182(1), 111-118.
- Suri, D., Tanumihardjo, S. (2016). Effects of different processing methods on the micronutrient and phytochemical contents of maize: From A to Z. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(5), 912-926.
- Szarka, A., Tomasskovics, B., Bánhegyi, G. (2012). The ascorbate-glutathione- α -tocopherol triad in abiotic stress response. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(4), 4458-4483.

- Szymanek, M., Dobrzański, B., Niedziółka, I., Rybczyński, R. (2006). Sweet corn harvest and technology physical properties and quality. B. Dobrzański Institute of Agrophysics of Polish Academy of Sciences.
- Teixeira, A., Eiras-Dias, J., Castellarin, S., Gerós, H. (2013). Berry phenolics of grapevine under challenging environments. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(9), 18711-18739.
- Tekaya, M., El-Gharbi, S., Mechri, B., Chehab, H., Bchir, A., Chraief, I., Ayachi, M., Boujnah, D., Attia, F., Hammami, M. (2016). Improving performance of olive trees by the enhancement of key physiological parameters of olive leaves in response to foliar fertilization. *Acta Physiologiae Plantarum* 38, 101.
- Tekaya, M., Mechri B., Cheheb, H., Attia, F., Chraief, I., Ayachi, M., Boujne, D., Hammami M. (2014). Changes in the profiles of mineral elements, phenols, tocopherols and soluble carbohydrates of olive fruit following foliar nutrient fertilization. *LWT - Food Science and Technology*, 59(2, Part 1), 1047-1053.
- Telfer, A. (2005). Too much light? How b-carotene protects the photosystem II reaction centre. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 4(12), 950-956.
- Thiele, J., Hsieh, S., Ekanayake-Mudiyanselage, S. (2005). Vitamin E: critical review of its current use in cosmetic and clinical dermatology. *Dermatologic surgery: official publication for American Society for Dermatologic Surgery [et al.]*, 31(7 Pt 2), 805-813.
- Tsuduki, T., Kuriyama, K., Nakagawa, K., Miyazawa, T. (2013). Tocotrienol (unsaturated vitamin E) suppresses degranulation of mast cells and reduces allergic dermatitis in mice. *Journal of Oleo Science*, 62(10), 825-834.
- Van den Ende, W., Valluru, R. (2009). Sucrose, sucrosyl oligosaccharides, and oxidative stress: scavenging and salvaging? *Journal of Experimental Botany*, 60, 9-18.
- Warman, P.R., Havard, K. A. (1998). Yield, vitamin and mineral contents of organically and conventionally grown potatoes and sweet corn. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 68(3), 207-216.
- Wong, A. D., Juvik, J. A., Breeden, D. C., Swiader, J. M. (1994). Shrunken2 sweet corn yield and the chemical components of quality. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 119, 747-755.
- Zanardo, D. I. L.; Lima, R. B.; Ferrarese, M. L. L.; Bubna, G. A.; Ferrarese-Filho, O. (2009). Soybean root growth inhibition and lignification induced by p-coumaric acid. *Environmental and Experimental Botany*, 66, 25-30.
- Zhang, R., Huang, L., Deng, Y., Chi, J., Zhang, Y., Wei, Z., Zhang, M. (2017). Phenolic content and antioxidant activity of eight representative sweet corn varieties grown in South China. *International Journal of Food Properties*, 20, 3043-3055
- Zheng, W., Wang, S. (2001). Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Society*, 49(11), 5165-5170.

8. Prilog

Prilog 1. Analiza varijanse svih fitohemikalija u listu i dobijene Tukey HSD vrednosti za sve ispitivane interakcije.

	L+Z	β -Karoten	CK	<i>p</i> -KK	PK	SK	DPPH'	GSH	TPC	Fkrit
					F					
Godina (G)	5074*	335*	2995*	7130*	16093*	4682*	1079*	1709*	2916*	161
Hibrid (H)	149,1*	13,6*	1662,8*	2260,6*	917,4*	6651,9*	15,7*	317,4*	227,3*	10,1
G × H	88,8*	10,6*	291,4*	344,1*	1560,9*	4473,4*	15,6*	10,9*	56,7*	10,1
Faza (F)	5000*	1081*	42137*	98533*	10198*	51384*	56692*	7133*	2977*	161
G × F	2077*	235*	4061*	22168*	15278*	919*	138*	2642*	487*	161
H × F	33,7*	15,8*	2313,8*	1822,5*	449,9*	4813,3*	19,5*	40,7*	60,1*	10,1
G × H × F	118,3*	14,1*	293,9*	388,2*	1847,6*	3316,7*	22,3*	410,2*	11,1*	10,1
Tretman (T)	148,91*	11,32*	798,49*	1611,01*	540,47*	1671,91*	27,05*	220,51*	92,03*	7,71
G × T	74,38*	21,56*	137,29*	563,41*	454,96*	921,63*	29,44*	55,21*	8,86*	7,71
H × T	85,75*	9,77*	890,95*	1185,53*	813,62*	481,83*	16,69*	106,13*	11,58*	4,75
G × H × T	52,67*	5,76*	372,22*	507,56*	613,71*	1379,84*	9,19*	116,96*	36,23*	4,75
F × T	121,49*	17,58*	745,86*	1266,90*	832,17*	1054,24*	12,46*	201,73*	41,93*	7,71
G × F × T	113,02*	27,10*	354,95*	381,63*	751,84*	2235,69*	8,21*	74,96*	13,29*	7,71
H × F × T	50,30*	5,48*	1056,56*	1331,84*	441,06*	728,13*	14,54*	91,57*	37,07*	4,75
G × H × F × T	70,36*	6,84*	468,04*	570,41*	493,99*	1333,65*	11,79*	95,79*	19,92*	4,75

L+Z – lutein + zeaksantin; CK – Cimetna kiselina; *p*-KK - *p*-Kumarinska kiselina; PK – Protokatehinska kiselina; SK - Sinapinska kiselina; * - Značajno na nivou pouzdanosti od 0,95 ($p \leq 0,05$).

Prilog 1. Nastavak

	L + Z	β -Karoten	CK	<i>p</i> -KK	PK	SK	DPPH*	GSH	TPC
					Tukey HSD				
Hibrid (H)	0,008	0,007	0,124	0,162	0,131	0,127	0,004	2,836	0,172
G × H	0,012	0,009	0,176	0,229	0,185	0,180	0,006	4,011	0,244
G × F	0,008	0,007	0,124	0,162	0,131	0,127	0,004	2,836	0,172
H × F	0,012	0,009	0,176	0,229	0,185	0,180	0,006	4,011	0,244
G × H × F	0,016	0,013	0,249	0,323	0,262	0,254	0,009	5,672	0,344
Tretman (T)	0,009	0,007	0,139	0,181	0,146	0,142	0,005	3,171	0,193
G × T	0,013	0,010	0,197	0,256	0,207	0,201	0,007	4,484	0,272
H × T	0,018	0,015	0,278	0,361	0,293	0,284	0,010	6,342	0,385
G × H × T	0,026	0,021	0,393	0,511	0,414	0,401	0,014	8,969	0,545
F × T	0,013	0,104	0,197	0,255	0,207	0,201	0,007	4,484	0,272
G × F × T	0,018	0,015	0,278	0,361	0,293	0,284	0,010	6,342	0,385
H × F × T	0,026	0,021	0,393	0,511	0,414	0,401	0,014	8,969	0,545
G × H × F × T	0,039	0,032	0,556	0,723	0,585	0,568	0,022	12,680	0,770

L+Z – lutein + zeaksantin; CK – Cimetna kiselina; *p*-KK - *p*-Kumarinska kiselina; PK – Protokatehinska kiselina; SK - Sinapinska kiselina.

Prilog 2. Sadržaj ispitivanih fitohemikalija u listu (I i II faza) nakon primenjenih tretmana

	Tretman	ZP504su		ZP355su		ZP553su		ZP515su	
		2016	2017	2016	2017	2016	2017	2016	2017
Lutein + Zeaksantin									
I faza	K	1,5±0,1 ^{yzab'c'd'e'f'g'}	1,60±0,01 ^{uvwxyza'b'c'}	1,70±0,08 ^{rstuvwxyz}	2,10±0,02 ^{ijklm}	1,61±0,03 ^{uvwxyza'b'c'}	1,87±0,09 ^{mnopqrst}	1,60±0,03 ^{uvwxyz a'b'c'}	1,32±0,01 ^{d'e'f' g'h'i'}
	M	1,6±0,1 ^{vwxyza'b'c'}	1,8±0,1 ^{pqrstuvw}	1,14±0,06 ^{i'}	1,96±0,05 ^{lmnopqr}	1,32±0,07 ^{e'f'g'h'i'}	2,04±0,02 ^{ijklmno}	1,58±0,04 ^{vwxyz a'b'c'd'}	2,25±0,04 ^{hij}
	N	1,27±0,02 ^{gh'i'}	1,2±0,1 ^{h'i'}	1,41±0,01 ^{c'd'e'f'g'h'}	2,15±0,01 ^{ijkl}	1,37±0,04 ^{c'd'e'f'g'h'i'}	2,05±0,01 ^{ijklmn}	1,29±0,07 ^{f'g'h'i'}	1,44±0,06 ^{a'b'c'd'e'f'g'h'}
	M + FĐ	1,41±0,04 ^{c'd'e'f'g'h'}	1,78±0,01 ^{opqrstuvw}	1,58±0,02 ^{vwxyz a'b'c'}	2,23±0,08 ^{hijk}	2,10±0,07 ^{ijklm}	1,55±0,03 ^{xyza'b'c'd'e'}	1,99±0,05 ^{klmnop}	1,36±0,04 ^{c'd'e'f'g'h'i'}
	N + FĐ	1,36±0,04 ^{c'd'e'f'g'h'i'}	1,2±0,1 ^{h'i'}	1,54±0,01 ^{xyz a'b'c'd'e'f'}	1,53±0,01 ^{xyz a'b'c'd'e'f'g'}	1,60±0,06 ^{uvwxyz a'b'c'}	1,47±0,09 ^{z a'b'c'd'e'f' g'h'}	1,59±0,07 ^{vwxyz a'b'c'}	1,81±0,06 ^{nopqrstuvw}
II faza	K	1,9±0,1 ^{mnopqrstu}	3,1±0,1 ^{ab}	1,77±0,05 ^{pqrstvw}	2,63±0,02 ^{efg}	1,72±0,09 ^{qrstvwxyz}	2,43±0,07 ^{gh}	1,57±0,03 ^{vwxyz a'b'c'd'e'}	2,39±0,05 ^{ghi}
	M	1,7±0,1 ^{qrstvwxy}	3,2±0,1 ^{ab}	2,00±0,09 ^{ijklmnop}	2,70±0,01 ^{def}	1,92±0,05 ^{lmnopqrst}	3,03±0,01 ^{bc}	1,95±0,01 ^{lmnopqrst}	2,82±0,04 ^{cde}
	N	0,86±0,04 ^{j'}	2,22±0,04 ^{hijk}	1,96±0,04 ^{lmnopqr}	1,69±0,09 ^{tuvwxyz a'b'}	1,71±0,08 ^{qrstvwxyz}	2,94±0,07 ^{bcd}	1,95±0,01 ^{lmnopqrs}	2,44±0,02 ^{fgh}
	M + FĐ	1,72±0,03 ^{qrstvwxyz}	2,4±0,1 ^{gh}	1,44±0,01 ^{b'c'd'e'f'g'h'}	2,56±0,04 ^{efg}	1,77±0,02 ^{pqrstvw}	3,09±0,01 ^b	1,83±0,02 ^{nopqrstuv}	1,96±0,03 ^{lmnopq}
	N + FĐ	1,32±0,04 ^{d'e'f'g'h'i'}	2,63±0,01 ^{efg}	1,70±0,06 ^{stuvwxyza'}	3,37±0,02 ^a	1,90±0,04 ^{lmnopqrst}	2,99±0,03 ^{b'c}	1,96±0,09 ^{lmnopq}	3,02±0,01 ^{bc}
β-karoten									
I faza	K	0,22±0,02 ^{vw}	0,48±0,03 ^{ghijklmnopqr}	0,35±0,02 ^{nopqrstuvw}	0,63±0,06 ^{abcdefg hijk}	0,31±0,04 ^{qrstvw}	0,53±0,01 ^{defghijklmnop}	0,367±0,004 ^{mnopqrstuvw}	0,376±0,003 ^{lmnopqrstuvw}
	M	0,33±0,02 ^{pqrstvw}	0,49±0,03 ^{fghijklmnopqr}	0,25±0,02 ^{uvw}	0,56±0,08 ^{bcdefghijklmn}	0,28±0,02 ^{stvw}	0,62±0,05 ^{abcdefg hijk}	0,43±0,04 ^{klmnopqrstu}	0,67±0,06 ^{abcdefg}
	N	0,25±0,05 ^{tuvw}	0,43±0,04 ^{klmnopqrstu}	0,34±0,05 ^{opqrstvw}	0,56±0,03 ^{bcdefghijklmn}	0,32±0,02 ^{pqrstvw}	0,59±0,06 ^{abcdefg hijk}	0,18±0,00 ^x	0,42±0,03 ^{klmnopqrstu}
	M + FĐ	0,27±0,01 ^{tuvw}	0,65±0,06 ^{abcdefg hijk}	0,33±0,03 ^{pqrstvw}	0,69±0,05 ^{abcdefg}	0,42±0,04 ^{klmnopqrstuv}	0,56±0,01 ^{bcdefghijklmn}	0,49±0,04 ^{fghijklmnopqr}	0,45±0,02 ^{ijklmnopqrstu}
	N + FĐ	0,21±0,01 ^w	0,48±0,01 ^{ghijklmnopqrs}	0,28±0,01 ^{rstvw}	0,48±0,04 ^{ghijklmnopqr}	0,26±0,01 ^{tuvw}	0,46±0,01 ^{hijklmnopqrst}	0,34±0,01 ^{opqrstvw}	0,52±0,03 ^{defghijklmnopq}
II faza	K	0,70±0,01 ^{abcde}	0,67±0,01 ^{abcdefg}	0,66±0,05 ^{abcdefg}	0,61±0,03 ^{abcdefg hijk}	0,60±0,05 ^{abcdefg hijk}	0,69±0,09 ^{abcdef}	0,48±0,05 ^{ghijklmnopqr}	0,64±0,08 ^{abcdefg hijk}
	M	0,60±0,06 ^{abcdefg hijk}	0,68±0,03 ^{abcdefg}	0,76±0,05 ^{ab}	0,62±0,04 ^{abcdefg hijk}	0,70±0,01 ^{abcdef}	0,66±0,07 ^{abcdefg}	0,75±0,02 ^{ab}	0,73±0,06 ^{abcd}
	N	0,53±0,02 ^{abcdefg hijk}	0,60±0,02 ^{abcdefg hijk}	0,71±0,06 ^{abcd}	0,48±0,06 ^{ghijklmnopqrs}	0,67±0,01 ^{abcdefg}	0,74±0,01 ^{abc}	0,64±0,07 ^{abcdefg hijk}	0,61±0,07 ^{abcdefg hijk}
	M + FĐ	0,66±0,04 ^{abcdefg hijk}	0,61±0,01 ^{abcdefg hijk}	0,48±0,01 ^{ghijklmnopqr}	0,62±0,03 ^{abcdefg hijk}	0,54±0,01 ^{cdefghijklmno}	0,75±0,07 ^{ab}	0,57±0,04 ^{bcdefghijklm}	0,50±0,05 ^{efghijklmnopq}
	N + FĐ	0,44±0,06 ^{ijklmnopqrstu}	0,63±0,02 ^{abcdefg hijk}	0,66±0,02 ^{abcdefg}	0,62±0,09 ^{abcdefg hijk}	0,67±0,05 ^{abcdefg}	0,78±0,05 ^a	0,70±0,05 ^{abcdef}	0,72±0,03 ^{abcd}

Različita slova označavaju postojanje statistički značajne razlike (Tukey HSD) pri nivou pouzdanosti od 0,95 ($p \leq 0,05$) između posmatranih parametara za interakciju $G \times H \times F \times T$.

Prilog 2. Nastavak

		ZP504 _{su}		ZP355 _{su}		ZP553 _{su}		ZP515 _{su}	
Tretman		2016	2017	2016	2017	2016	2017	2016	2017
Protokatehinska kiselina									
I faza	K	18,9±0,2 ^{d'e'f'}	24,7±0,9 ^{z a'b'c'}	32,5±0,4 ^{rst}	13,4±0,1 ^{h'ij'k'}	20,9±0,3 ^{c'd'e'}	31,6±0,8 ^{rstuv}	17,3±0,3 ^{e'f'}	35,1±0,4 ^{qr}
	M	11,7±0,1 ^{def}	16,3±0,7 ^{f'g'h'}	39,6±0,2 ^{nop}	15,2±0,1 ^{f'g'h'ij'}	18,1±0,3 ^f	28,3±0,8 ^{uvwxyz}	13,7±0,2 ^{gh'ij'k'}	27,5±0,8 ^{wxyza'}
	N	29,7±0,5 ^{stuw}	12,1±0,1 ^{ij'k'}	43,4±0,3 ^{mn}	18,6±0,3 ^{d'e'f'}	53,2±0,8 ^{ij}	27,0±0,9 ^{wxyza'}	41,1±0,3 ^{no}	83,6±1,9 ^c
	M + FĐ	15,3±0,1 ^{f'g'h'ij'}	25,9±0,4 ^{xyza'}	17,7±0,1 ^{e'f'}	16,1±0,1 ^{f'g'h'}	8,1±0,1 ^{lm'}	45,1±1,0 ^{lm}	18,3±0,08 ^{d'e'f'}	40,6±1,0 ^{nop}
	N + FĐ	30,2±0,4 ^{stuvw}	15,9±0,2 ^{f'g'h'i'}	45,7±0,4 ^{lm}	22,0±0,8 ^{b'c'd'}	31,9±0,3 ^{rstu}	25,2±0,5 ^{yzab'}	36,8±0,3 ^{pq}	28,5±0,8 ^{uvwxyz}
II faza	K	42,3±0,4 ^{mn}	37,1±0,6 ^{pq}	15,2±0,1 ^{f'g'h'ij'}	50,7±1,7 ^{jk}	37,7±0,6 ^{opq}	76,9±1,6 ^d	36,8±0,8 ^{pq}	75,0±2,1 ^d
	M	34,0±0,9 ^{qr}	50,1±1,7 ^{jk}	4,7±0,02 ^{m'}	59,1±1,3 ^{gh}	32,8±0,9 ^{rs}	48,0±1,8 ^{kl}	16,1±0,08 ^{f'g'h'}	61,3±1,7 ^{fg}
	N	24,7±0,6 ^{zab'c'}	26,6±0,4 ^{wxyza'}	2,0±0,6 ^{xyza'}	59,1±1,6 ^{gh}	29,6±0,1 ^{stuvw}	28,8±0,7 ^{tuvwxy}	27,9±0,5 ^{vwxyz}	87,8±1,61 ^b
	M + FĐ	20,9±0,5 ^{c'd'e'}	95,8±1,4 ^a	31,9±0,4 ^{rstu}	64,8±1,3 ^{ef}	27,4±0,8 ^{wxyza'}	13,4±0,2 ^{h'ij'k'}	10,7±0,01 ^{kl'}	56,5±0,9 ^{hi}
	N + FĐ	6,4±0,01 ^{m'}	66,7±1,2 ^e	17,5±0,6 ^{e'f'g'}	77,9±1,7 ^d	23,7±0,1 ^{ab'c'}	46,1±1,5 ^{lm}	18,3±0,7 ^{d'e'f'}	59,5±1,9 ^{gh}
<i>p</i> -Kumarinska kiselina									
I faza	K	8,97±0,04 ^{ijkl'm'n'}	17,7±0,1 ^{b'c'd'e'f'}	8,48±0,06 ^{l'm'n'}	13,6±0,4 ^{e'f'g'h'ij'}	12,2±0,4 ^{gh'ij'k'l'm'}	14,2±0,1 ^{e'f'g'h'i'}	10,61±0,09 ^{ijkl'm'n'}	20,4±0,5 ^{b'c'}
	M	10,30±0,09 ^{ijkl'm'n'}	31,6±1,0 ^{uvw}	10,58±0,08 ^{ijkl'm'n'}	16,9±0,1 ^{b'c'd'e'f'g'}	10,8±0,08 ^{h'ij'k'l'm'n'}	25,1±0,1 ^{za'}	7,71±0,05 ^{m'n'}	19,4±0,8 ^{b'c'd'}
	N	10,4±0,1 ^{ijkl'm'n'}	26,4±0,1 ^{yz}	10,44±0,04 ^{ijkl'm'n'}	35,7±0,2 ^{stu}	8,6±0,02 ^{kl'm'n'}	17,3±0,1 ^{b'c'd'e'f'}	10,86±0,07 ^{ijkl'm'n'}	13,1±0,3 ^{f'g'h'ij'k'l'}
	M + FĐ	8,05±0,04 ^{m'n'}	7,64±0,03 ^{m'n'}	12,35±0,1 ^{gh'ij'k'l'm'}	35,1±1,0 ^{uv}	13,3±0,1 ^{e'f'g'h'ij'k'}	27,2±0,1 ^{xyz}	6,47±0,05 ^{n'}	15,7±0,1 ^{c'd'e'f'g'}
	N + FĐ	8,20±0,02 ^{m'n'}	13,5±0,3 ^{e'f'g'h'ij'}	15,43±0,1 ^{d'e'f'g'h'}	14,5±0,2 ^{e'f'g'h'i'}	15,5±0,04 ^{d'e'f'g'h'}	30,7±0,2 ^{vwxy}	6,18±0,04 ^{n'}	18,0±0,4 ^{b'c'd'e'}
II faza	K	39,4±1,0 st	20,6±0,3 ^{ab'}	94,9±1,7 ^e	41,1±0,4 ^{qr}	56,5±1,3 ^{lmn}	25,4±0,2 ^z	60,4±1,4 ^{klm}	39,6±0,2 ^{rst}
	M	55,3±1,3 ^{nop}	40,4±0,7 ^{qrs}	88,9±1,3 ^f	15,8±0,2 ^{b'c'd'e'f'g'}	39,3±0,6 ^{rst}	51,3±0,5 ^{op}	87,78±2,0 ^f	76,0±1,2 ^{hi}
	N	60,7±1,6 ^{kl}	33,6±0,6 ^{uvw}	50,8±0,7 ^p	29,7±0,3 ^{wxyz}	151,8±2,7 ^b	121,7±1,95 ^c	120,1±3,7 ^c	65,7±0,4 ^j
	M + FĐ	78,5±2,5 ^{gh}	55,8±0,6 ^{mno}	123,6±2,6 ^c	51,1±0,7 ^{op}	81,6±2,1 ^g	71,6±0,9 ⁱ	80,2±1,6 ^{gh}	26,5±0,4 ^{yz}
	N + FĐ	63,7±1,0 ^{jk}	42,3±0,8 ^{qr}	76,3±1,6 ^{hi}	44,9±0,7 ^q	180,7±2,3 ^a	51,3±0,5 ^{op}	110,6±2,0 ^d	41,9±0,5 ^{qr}

Različita slova označavaju postojanje statistički značajne razlike (Tukey HSD) pri nivou pouzdanosti od 0,95 ($p \leq 0,05$) između posmatranih parametara za interakciju $G \times H \times F \times T$.

Prilog 2. Nastavak

		ZP504 _{su}		ZP355 _{su}		ZP553 _{su}		ZP515 _{su}	
		2016	2017	2016	2017	2016	2017	2016	2017
Cimetna kiselina									
I faza	K	25,4±0,4 ^w	9,54±0,06 ^{hij'kl'}	24,9±0,2 ^{vw}	10,5±0,1 ^{gh'ij'k'}	16,1±0,3 ^{b'c'd'e'}	5,39±0,02 ^{mn'}	16,4±0,2 ^{a'b'c'd'}	13,2±0,2 ^{d'e'fg'}
	M	24,4±0,4 ^{vwxy}	6,58±0,08 ^{l'mn'}	32,0±0,2 ^{opqr}	19,3±0,3 ^{za'b'}	14,6±0,7 ^{d'e'f'}	4,51±0,06 ^{n'}	19,3±0,2 ^{z a'b'}	6,48±0,04 ^{l'mn'}
	N	12,1±0,1 ^{fg'h'ij'}	6,68±0,06 ^{l'mn'}	25,8±0,4 ^{tuvw}	10,4±0,08 ^{gh'ij'k'}	25,3±0,2 ^{vw}	8,51±0,03 ^{jk'l'mn'}	19,0±0,2 ^{z a'b'}	7,12±0,05 ^{kl'mn'}
	M + FĐ	23,4±0,3 ^{vwxy}	7,52±0,07 ^{kl'mn'}	31,0±0,3 ^{pqr}	9,11±0,05 ^{ij'kl'}	35,3±0,3 ^{mno}	8,22±0,02 ^{kl'm'}	23,3±0,5 ^{vwxy}	9,99±0,02 ^{gh'ij'kl'}
	N + FĐ	26,7±0,3 ^{stuv}	6,98±0,02 ^{kl'mn'}	41,9±0,3 ^k	9,16±0,09 ^{ij'kl'}	31,1±0,3 ^{pqr}	13,0±0,2 ^{d'e'fg'h'}	35,1±0,3 ^{mno}	7,99±0,06 ^{kl'mn'}
II faza	K	42,3±0,5 ^k	20,9±1,0 ^{xyz}	32,3±0,4 ^{opqr}	15,8±0,3 ^{b'c'd'e'}	54,9±0,7 ⁱ	29,2±1,4 ^{rst}	54,0±0,5 ⁱ	22,2±0,7 ^{wxyz}
	M	60,2±0,4 ^h	41,1±1,3 ^{kl}	50,1±0,7 ^j	14,3±0,2 ^{b'c'd'e'f'}	60,6±1,0 ^h	29,5±1,5 ^{rs}	66,9±0,4 ^g	29,1±0,8 ^{rstu}
	N	96,1±1,5 ^e	30,7±1,3 ^{qr}	111,5±1,4 ^c	12,5±0,1 ^{e'f'gh'i'}	54,8±0,7 ⁱ	17,0±0,2 ^{a'b'c'}	133,2±2,0 ^a	31,2±1,4 ^{pqr}
	M + FĐ	65,4±0,7 ^g	48,8±1,5 ^j	60,7±1,0 ^h	34,6±1,1 ^{mno}	90,1±1,4 ^f	52,1±2,5 ^{ij}	101,5±1,1 ^d	19,9±0,7 ^{yzal}
	N + FĐ	38,0±0,4 ^{lm}	25,5±0,5 ^{uvw}	126,7±1,5 ^b	36,2±1,1 ^{mn}	43,5±0,2 ^k	24,0±1,0 ^{vwxy}	125,3±1,3 ^b	33,8±1,5 ^{nopq}
Sinapinska kiselina									
I faza	K	15,1±0,2 ^{z a'b'c'd'e'f'}	13,1±0,3 ^{e'f'gh'i'}	23,88±0,2 ^{rst}	23,1±0,6 st	18,4±0,3 ^{vwxyz}	16,3±0,1 ^{yzab'c'd'e'}	18,3±0,5 ^{vwxyza'}	12,1±0,4 ^{fg'h'ij'}
	M	23,8±0,9 ^{rst}	23,8±0,2 ^{rst}	21,0±0,4 ^{tuvw}	16,2±0,3 ^{yz a'b'c'd'e'}	25,0±0,4 ^{qrs}	17,8±0,1 ^{wxyza'b'}	32,0±0,2 ^{op}	20,8±0,1 ^{tuvwxy}
	N	17,5±0,2 ^{wxyza'b'c'}	27,0±0,4 ^{qr}	8,05±0,1 ^{kl'}	17,2±0,2 ^{xyz a'b'c'd'}	25,±0,3 ^{qrs}	15,3±0,2 ^{za'b'c'd'e'f'}	14,6±0,1 ^{b'c'd'e'f'g'}	20,8±0,4 ^{tuvwxy}
	M + FĐ	21,0±0,7 ^{uvw}	13,9±0,1 ^{c'd'e'f'g'h'}	17,9±0,2 ^{wxyza'b'}	6,8±0,1 ^{l'}	45,3±0,4 ^{jk}	14,7±0,1 ^{a'b'c'd'e'f'}	33,5±0,3 ^{no}	15,0±0,1 ^{z a'b'c'd'e'f'}
	N + FĐ	19,1±0,4 ^{uvwxy}	13,5±0,7 ^{e'f'gh'i'}	13,3±0,2 ^{d'e'f'g'h'i'}	10,8±0,2 ^{gh'ij'k'}	20,7±0,2 ^{tuvwxy}	12,1±0,2 ^{fg'h'ij'}	12,2±0,2 ^{fg'h'ij'}	18,7±0,5 ^{uvwxyz}
II faza	K	42,9±1,4 ^{kl}	40,1±0,6 ^{lm}	22,3±1,1 ^{stu}	27,9±0,2 ^q	40,1±0,5 ^{lm}	55,3±0,8 ^h	40,5±0,9 ^{lm}	42,4±0,5 ^{kl}
	M	120,1±2,3 ^b	43,8±0,7 ^{kl}	10,2±0,3 ^{ij'kl'}	56,1±0,4 ^h	70,3±1,4 ^g	87,7±1,3 ^e	36,9±0,3 ^{mn}	49,4±0,3 ⁱ
	N	74,2±1,7 ^f	15,6±0,2 ^{yz a'b'c'd'e'f'}	8,43±0,06 ^{jk'l'}	10,8±0,1 ^{h'ij'k,}	107,1±1,1 ^c	17,5±0,2 ^{wxyza'b'c'}	22,0±1,0 ^{stuv}	27,4±0,3 ^{qr}
	M + FĐ	100,0±2,5 ^d	51,0±0,7 ⁱ	13,1±0,3 ^{e'f'gh'i'}	84,4±1,2 ^e	69,0±1,5 ^g	34,2±0,3 ^{no}	15,2±0,1 ^{z a'b'c'd'e'f'}	43,4±0,4 ^{kl}
N + FĐ	57,0±0,9 ^h	70,3±0,8 ^g	28,0±0,4 ^q	13,8±0,2 ^{c'd'e'f'g'h'i'}	151,3±3,6 ^a	28,6±0,2 ^{pq}	48,5±0,1 ^{ij}	27,4±0,3 ^{qr}	

Različita slova označavaju postojanje statistički značajne razlike (Tukey HSD) pri nivou pouzdanosti od 0,95 ($p \leq 0,05$) između posmatranih parametara za interakciju $G \times H \times F \times T$.

Prilog 2. Nastavak

		ZP504su		ZP355su		ZP553su		ZP515su	
		2016	2017	2016	2017	2016	2017	2016	2017
DPPH* (μmol ET/g s.m.)									
I faza	K	0,60±0,02 ^y	0,90±0,01 ^{pq}	0,75±0,02 ^{rstuvw}	0,74±0,04 ^{rstuvw}	0,69±0,01 ^{uvwxy}	0,77±0,03 ^{qrstuvw}	0,69±0,01 ^{wxy}	0,78±0,01 ^{qrstuvw}
	M	0,79±0,01 ^{qrstuvw}	0,80±0,03 ^{qrstuvw}	0,63±0,03 ^{xy}	0,71±0,07 ^{tuvwxy}	0,71±0,03 ^{tuvwxy}	0,81±0,02 ^{qrstuv}	0,73±0,02 ^{rstuvwxy}	0,85±0,01 ^{qrst}
	N	0,73±0,01 ^{rstuvwxy}	0,80±0,02 ^{qrstuvw}	0,73±0,02 ^{rstuvwxy}	0,90±0,01 ^{pq}	0,69±0,02 ^{uvwxy}	0,80±0,09 ^{qrstuvw}	0,73±0,01 ^{rstuvwxy}	1,01±0,01 ^p
	M + FĐ	0,72±0,02 ^{tuvwxy}	0,87±0,03 ^{pqr}	0,73±0,01 ^{rstuvwxy}	0,66±0,02 ^{wxy}	0,72±0,04 ^{stuvwxy}	0,73±0,02 ^{rstuvwxy}	0,72±0,02 ^{rstuvwxy}	0,87±0,02 ^{pqrs}
	N + FĐ	0,72±0,01 ^{stuvwxy}	0,72±0,02 ^{stuvwxy}	0,74±0,03 ^{stuvwxy}	0,75±0,02 ^{rstuvw}	0,76±0,02 ^{qrstuvw}	0,80±0,01 ^{qrstuvw}	0,72±0,01 ^{tuvwxy}	0,84±0,01 ^{qrstu}
II faza	K	1,73±0,02 ^{ghijklmn}	1,80±0,08 ^{defghijkl}	1,68±0,01 ^{klmno}	1,82±0,06 ^{cdefghijk}	1,65±0,04 ^{mno}	1,83±0,07 ^{cdefghij}	1,74±0,05 ^{fghijklmn}	1,87±0,09 ^{bcdefg}
	M	1,75±0,03 ^{fghijklmn}	1,84±0,05 ^{cdefghi}	1,65±0,04 ^{mno}	1,98±0,05 ^{ab}	1,74±0,03 ^{fghijklmn}	1,84±0,05 ^{bcdefghi}	1,60±0,09 ^{no}	1,85±0,05 ^{bcdefgh}
	N	1,72±0,04 ^{hijklmn}	2,13±0,07 ^a	1,66±0,04 ^{lmno}	2,09±0,07 ^a	1,64±0,05 ^{mno}	1,78±0,07 ^{defghijklm}	1,68±0,05 ^{jklmn}	1,93±0,09 ^{bcd}
	M + FĐ	1,68±0,07 ^{jklmn}	1,79±0,05 ^d ^{efghijklm}	1,70±0,04 ^{ijklmn}	1,86±0,05 ^{bcdefgh}	1,67±0,03 ^{lmno}	1,88±0,06 ^{bcdef}	1,77±0,05 ^{efghijklmn}	1,90±0,04 ^{bcde}
	N + FĐ	1,53±0,02 ^o	1,76±0,09 ^{efghijklm}	1,74±0,05 ^{fghijklmn}	1,94±0,06 ^{bc}	1,72±0,04 ^{hijklmn}	1,79±0,05 ^{cdefghijkl}	1,70±0,06 ^{ijklmn}	1,87±0,05 ^{bcdefg}
TPC (mg EFK/g s.m.)									
I faza	K	24,3±1,3 ^{qrstuvwxy}	19,1±0,4 ^{za'b'c'd'}	21,5±0,5 ^{uvwxyzab'c'}	18,0±0,5 ^{a'b'c'd'}	23,0±2,1 ^{rstuvwxyza'}	16,8±0,6 ^{c'd'}	19,0±1,2 ^{a'b'c'd'}	18,9±0,7 ^{a'b'c'd'}
	M	28,4±2,2 ^{nopq}	19,8±0,2 ^{yzab'c'd'}	15,2±0,1 ^{d'e'}	17,8±0,1 ^{ab'c'd'}	30,3±1,3 ^{lmno}	21,0±1,0 ^{wxyz a'b'c'}	28,0±1,1 ^{opqr}	21,7±0,9 ^{tuvwxyz a'b'c'}
	N	28,7±0,7 ^{nopq}	17,9±0,7 ^{b'c'd'}	17,5±0,7 ^{c'd'}	26,7±1,3 ^{opqrs}	29,5±2,5 ^{mnop}	24,1±1,0 ^{rstuvwxyz}	33,1±2,0 ^{ijklmn}	27,4±0,1 ^{opqrs}
	M + FĐ	26,0±2,3 ^{opqrstuvw}	25,5±0,9 ^{opqrstuvw}	18,3±0,1 ^{a'b'c'd'}	11,2±0,5 ^{e'}	38,8±1,0 ^{cdefgh}	24,3±1,4 ^{qrstuvwxy}	27,8±2,3 ^{opqr}	25,1±1,64 ^{pqrstuvw}
	N + FĐ	26,1±0,6 ^{pqrstuvw}	25,2±1,8 ^{pqrstuvw}	21,1±1,0 ^{vwxyzab'c'}	15,2±0,6 ^{d'e'}	38,3±0,9 ^{cdefgh}	24,1±0,7 ^{qrstuvwxyz}	34,3±2,0 ^{hijklm}	19,0±0,5 ^{a'b'c'd'}
II faza	K	42,6±0,4 ^{bc}	27,4±0,9 ^{opqrs}	28,7±1,4 ^{nopq}	20,4±0,5 ^{xyz a'b'c'}	37,1±0,7 ^{efghij}	26,2±0,4 ^{opqrstu}	36,7±0,8 ^{fghij}	22,7±0,4 ^{stuvwxyz a'b'}
	M	43,1±1,3 ^{bc}	29,7±0,4 ^{mnop}	40,8±0,5 ^{bcdef}	24,2±0,3 ^{qrstuvwxyz}	48,9±1,8 ^a	27,5±1,0 ^{opqrs}	37,5±0,5 ^{defghij}	33,2±0,1 ^{ijklmn}
	N	42,3±0,7 ^{bcd}	27,0±1,9 ^{opqrs}	34,8±0,1 ^{hijkl}	28,4±0,3 ^{nopq}	44,3±0,5 ^{ab}	24,6±0,9 ^{pqrstuvwxy}	40,2±1,1 ^{bcdefg}	24,2±0,3 ^{qrstuvwxyz}
	M + FĐ	40,4±0,8 ^{bcdefg}	28,6±0,5 ^{nopq}	41,8±0,8 ^{bcde}	27,9±1,9 ^{opqr}	37,4±0,6 ^{defghij}	27,0±0,4 ^{opqrs}	42,7±2,0 ^{bc}	30,5±1,7 ^{klmno}
	N + FĐ	36,6±0,8 ^{fghij}	27,5±0,2 ^{opqrs}	35,5±0,6 ^{ghijk}	26,3±1,7 ^{opqrstu}	36,5±2,6 ^{fghij}	27,3±1,1 ^{opqrs}	44,5±1,1 ^{ab}	20,4±0,5 ^{xyzab'c'}

Različita slova označavaju postojanje statistički značajne razlike (Tukey HSD) pri nivou pouzdanosti od 0,95 ($p \leq 0,05$) između posmatranih parametara za interakciju $G \times H \times F \times T$.

Prilog 2. Nastavak

		ZP504 _{su}		ZP355 _{su}		ZP553 _{su}		ZP515 _{su}	
		2016	2017	2016	2017	2016	2017	2016	2017
		GSH (nmol/g s.m.)							
I faza	K	221,3±19,5 ^{e'fgh'i'}	436,8±15,6 ^{stu}	178,6±24,8 ^{gh'i'}	297,9±11,6 ^{zya'b'c'd' e'}	224,2±14,6 ^{e'fgh'i'}	323,7±9,0 ^{xyza'b'c'}	321,3±18,1 ^{xyz a'b'c'd'}	319,6±14,5 ^{xyza'b'c'd'}
	M	177,8±7,5 ^{gh'i'}	352,9±13,0 ^{vwxyza'b'}	523,0±10,9 ^{opq}	282,0±8,7 ^{a'b'c'd' e'f'}	323,3±22,0 ^{xyz a'b'c'}	325,7±14,2 ^{xyza'b'c'}	238,3±24,0 ^{d'e'fgh'i'}	275,9±13,2 ^{b'c'd'e'f'}
	N	203,4±8,6 ^{f'gh'i'}	365,4±8,7 ^{uvwxyz a'}	538,2±14,0 ^{nopq}	313,1±14,5 ^{xyza'b'c'd'}	136,5±17,5 ^{i'}	294,8±5,8 ^{zya'b'c'd'e'}	478,6±7,9 ^{pqrs}	314,9±5,1 ^{xyza'b'c'd'}
	M + FĐ	415,5±19,2 ^{stuvw}	337,1±4,3 ^{wxyza'b'}	439,2±35,5 ^{rstu}	311,2±9,6 ^{xyza'b'c'd'}	269,5±29,2 ^{b'c'd' e'f'}	272,6±7,7 ^{b'c'd'e'f'}	587,4±9,9 ^{lmno}	337,4±3,1 ^{wxyza'b'}
	N + FĐ	669,1±43,4 ^{hijkl}	346,6±9,6 ^{vwxyza'b'}	361,3±15,7 ^{uvwxyza'}	314,5±14,4 ^{xyza'b'c'd'}	160,6±5,9 ^{h'i'}	321,6±7,3 ^{xyza'b'c'd'}	535,4±19,0 ^{nopq}	288,6±11,2 ^{zya'b'c'd'e'}
II faza	K	827,2±5,1 ^{bcd}	878,5±25,1 ^b	470,3±25,4 ^{qrs}	606,9±6,9 ^{klmn}	350,1±12,3 ^{vwxyza'b'}	537,7±8,8 ^{nopq}	371,1±27,9 ^{uvwxy}	881,1±14,4 ^b
	M	383,2±10,7 ^{tuvwxyz}	745,6±21,7 ^{defgh}	675,3±22,3 ^{hijk}	859,2±24,6 ^{bc}	249,4±4,5 ^{c'd'e'f'g'}	685,0±15,0 ^{ghijk}	526,2±15,3 ^{nopq}	776,7±9,7 ^{cdef}
	N	366,1±28,2 ^{uvwxyz}	557,3±32,0 ^{mnop}	178,8±24,3 ^{gh'i'}	522,2±13,2 ^{opqr}	308,1±20,9 ^{xyz a'b'c'd'}	421,5±37,0 ^{stuv}	297,4±10,2 ^{yz a'b'c'd'e'}	750,9±20,4 ^{defg}
	M + FĐ	536,9±4,5 ^{nopq}	785,3±32,0 ^{cde}	170,6±27,9 ^{gh'i'}	978,7±18,8 ^a	696,7±12,4 ^{fghij}	602,3±6,0 ^{klmno}	497,6±11,5 ^{pqrs}	736,3±2,2 ^{efghi}
	N + FĐ	638,8±19,7 ^{ijklm}	661,4±23,1 ^{ijkl}	285,8±14,1 ^{za'b'c'd'e'f'}	780,0±12,6 ^{cdef}	587,6±13,5 ^{lmno}	603,6±29,2 ^{klmno}	461,1±12,4 ^{qrst}	767,7±9,1 ^{defg}

Različita slova označavaju postojanje statistički značajne razlike (Tukey HSD) pri nivou pouzdanosti od 0,95 ($p \leq 0,05$) između posmatranih parametara za interakciju $G \times H \times F \times T$.

Prilog 3. Analiza varijanse svih fitohemikalija u zrnu i dobijene LSD vrednosti za sve ispitivane interakcije.

Parametar	F							LSD					
	Godina (G)	Hibrid (H)	G × H	Tretman (T)	G × T	H × T	G × H × T	H	G × H	T	G × T	H × T	G × H × T
L + Z	1773*	3152,1 *	123,5*	389,75*	129,80*	374,83 *	75,33*	0,37	0,52	0,41	0,58	0,82	1,16
β -Karoten	1336*	2906,9 *	707,8 *	456,09*	141,83*	303,50*	44,69 *	0,02	0,03	0,02	0,03	0,04	0,06
δ -T3	2277*	526,6 *	717,7*	211,39*	160,42*	165,29 *	126,39 *	0,02	0,03	0,02	0,03	0,04	0,06
$\beta + \gamma$ -T3	4446937*	96590,6*	23669,6*	52966,98*	108203,02*	78587,14*	67360,00*	0,02	0,03	0,02	0,03	0,04	0,06
α -T3	166168*	15150,8 *	40952,9 *	3225,330*	5661,65*	7330,56*	8922,18 *	0,02	0,03	0,02	0,03	0,04	0,06
δ -T	34 *	406,7 *	104,6 *	139,86 *	42,59*	162,50 *	41,24*	0,02	0,03	0,02	0,03	0,04	0,06
$\beta + \gamma$ -T	87779*	25644,4*	48263,9*	13969,31*	1247,62*	11906,91*	2668,02*	0,04	0,06	0,04	0,06	0,09	0,17
α -T	49721 *	39804,9 *	35599,8 *	3323,05*	2167,91*	5961,85*	2253,33 *	0,03	0,04	0,03	0,04	0,06	0,09
PK	2084 *	1759,5 *	803,8 *	1586,09*	209,83*	191,65 *	252,38*	0,31	0,43	0,34	0,48	0,68	0,97
KK	1346 *	5573,4 *	4503,6*	1075,86*	819,17*	1177,04 *	615,09*	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>p</i> -KK	510396*	139289,4*	165826,9*	5987,77 *	8429,09*	24741,86*	20937,29 *	0,02	0,03	0,02	0,03	0,04	0,06
FK	6315 *	6161,3 *	1329,6 *	154,63*	59,66 *	184,12 *	74,54 *	0,17	0,25	0,19	0,27	0,08	0,55
CK	43827 *	41406,5 *	86352,6*	3543,34*	3932,37*	6019,87*	3240,15 *	0,02	0,03	0,02	0,03	0,04	0,06
SK	836636*	39071,3*	31554,2*	9490,63*	17179,85*	19144,52*	12831,97*	0,03	0,03	0,03	0,04	0,06	0,09
Ara	326594 *	72849,2*	82838,2 *	15235,43*	15909,75*	10696,03*	11563,96*	0,02	0,03	0,02	0,03	0,04	0,06
Glu	269 *	7126,0*	2144,6*	5142,10*	1248,69 *	2452,75*	2976,28 *	0,23	0,33	0,26	0,37	0,52	0,74
Fru	1057*	1834,6*	650,6 *	1665,87 *	964,79*	947,38 *	1036,62 *	0,30	0,43	0,34	0,48	0,68	0,96
<i>i</i> Malt	33872*	477,6*	361,3 *	2424,03*	2593,57*	592,44*	635,89*	0,40	0,56	0,44	0,63	0,89	1,25

L+Z – lutein + zeaksantin; δ -T3 - δ -Tokotrienol; $\beta + \gamma$ -T3 - $\beta + \gamma$ -Tokotrienol; α -T3 - α -Tokotrienol; δ -T - δ -Tokoferol; $\beta + \gamma$ -T - $\beta + \gamma$ -Tokoferol; α -T - α -Tokoferol; PK – Protokatehinska kiselina; KK – Kofeinska kiselina; *p*-KK - *p*-Kumarinska kiselina; FK – Ferulinska kiselina; CK – Cimetna kiselina; SK - Sinapinska kiselina; Ara – Arabinoza; Glu – Glukoza; Fru – Fruktioza; *i*Malt - Izomaltoza. * - Značajno na nivou pouzdanosti od 0,95 ($p \leq 0,05$).

Prilog 3. Nastavak

Parametar	Godina (G)	F						LSD					
		Hibrid (H)	G × H	Tretman (T)	G × T	H × T	G × H × T	(H)	G × H	(T)	G × T	H × T	G × H × T
Sah	10461*	9995,6*	40963,6*	8626,01*	15911,7	6344,87 *	4874,63*	0,23	0,33	0,26	0,37	0,52	0,74
Gent	9095 *	108,8*	379,8*	209,31*	214,80*	257,95*	167,72 *	0,02	0,03	0,02	0,03	0,045	0,063
Treh	37725*	7724,8*	9351,2*	15926,65*	6712,07*	16617,61*	13655,26*	0,02	0,03	0,02	0,03	0,045	0,00
Tur	304332*	49917,9*	48851,9*	44975,96*	18795,65*	6976,14*	7011,80 *	0,04	0,06	0,04	0,06	0,09	0,13
Malt	41701 *	2035,4*	1328,9*	1205,64*	672,57*	157,97*	257,21 *	0,39	0,06	0,44	0,62	0,88	1,24
Raf	69026 *	16468,3*	6853,0 *	26287,60*	17765,85*	3088,47*	5366,24*	0,26	0,37	0,29	0,41	0,59	0,83
iMaltotri	6480 *	5069,7*	5840,1*	1198,87*	835,91 *	943,59*	686,65 *	6×10^{-4}	9×10^{-4}	7×10^{-4}	1×10^{-3}	$1,4 \times 10^{-3}$	2×10^{-3}
Pan	51273*	11964,5*	10537,9*	1354,35*	1198,98*	3134,91*	1869,74*	6×10^{-4}	9×10^{-4}	7×10^{-4}	1×10^{-3}	$1,4 \times 10^{-3}$	2×10^{-3}
maltotri	351752*	1381,7*	8617,1*	40060,63*	18747,14*	15898,62 *	14975,55*	6×10^{-4}	9×10^{-4}	7×10^{-4}	1×10^{-3}	$1,4 \times 10^{-3}$	2×10^{-3}
Sorb	389698 *	215183,9*	311647,2*	7429,76*	9615,17*	12015,85*	12150,20*	0,02	0,03	0,02	0,03	0,04	0,63
DPPH'	288 *	116,3*	40,2 *	89,85*	355,477 *	80,22*	65,15 *	0,04	0,56	0,04	0,63	0,09	0,13
TPC	3682 *	251,4*	154,9*	134,30*	238,95*	96,17	55,10 *	0,02	0,03	0,02	0,03	0,04	0,63
GSH	8469 *	410,6*	238,2*	151,19*	144,17*	153,13*	136,43 *	7,71	10,90	8,62	12,19	17,24	24,38
Fkrit	161	10,1	10,1	7,71	7,71	4,75	4,75						

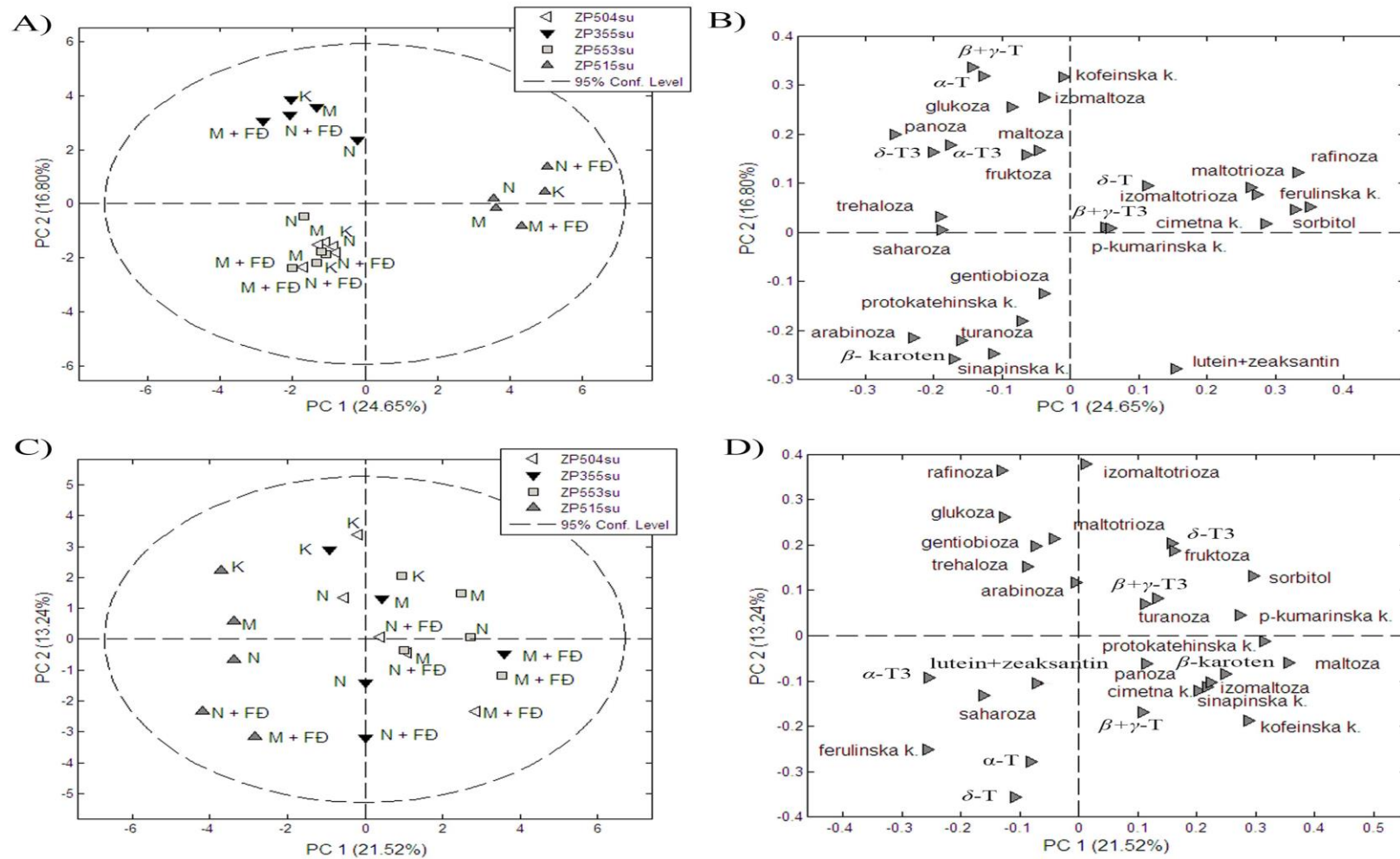
Sah – Saharoza; Gent – Gentiobioza; Treh – Trehaloza; Tur – Turanoza; Malt – Maltoza; Raf – Rafinoza; iMaltotri – Izomaltotrioza; Pan - Panoza; Maltotri – Maltotrioza; Sorb – Sorbitol. * - Značajno na nivou pouzdanosti od 0,95 ($p \leq 0,05$).

Prilog 4. Analiza varijanse prinosa i dobijene LSD vrednosti za sve ispitivane interakcije.

	F	Fkrit	LSD
Godina(G)	236*	161	
Hibrid(H)	23,8*	10,1	0,50
G × H	18,0*	10,1	0,70
Tretman (T)	2,09	7,71	
G × T	1,38	7,71	
H × T	0,63	4,75	
G × H × T	1,32	4,75	

* - Značajno na nivou pouzdanosti od 0,95 ($p \leq 0,05$).

Prilog 5. PCA analiza za 2016. godinu (A i B) i 2017. godinu (C i D).



Biografija

Jelena Vukadinović (rođ. Mesarović) rođena je 16.07.1989. godine u Beogradu, Republika Srbija. Srednju školu (medicinska škola, smer farmaceutski tehničar) završila je u Beogradu. Osnovne akademske studije na studijskom programu „Diplomirani hemičar“ na Univerzitetu u Beogradu - Hemijskom fakultetu upisala je školske 2008/09. godine, a diplomirala 2012. godine, sa prosečnom ocenom 8,13 (osam i 13/100) i ocenom 10 na završnom radu, pri Katedri za analitičku hemiju. Master akademske studije na studijskom programu „Diplomirani hemičar – master“ na Univerzitetu u Beogradu - Hemijskom fakultetu pri Katedri za analitičku hemiju upisala je školske 2012/13 i diplomirala 22.08.2013. godine sa prosečnom ocenom 9,75 (devet i 75/100) i ocenom 10 na završnom (master) radu. Doktorske akademske studije na studijskom programu „Hemija“ pri Katedri za analitičku hemiju Univerziteta u Beogradu – Hemijskog fakulteta upisala je školske 2013/14. godine.

Od aprila 2015. godine Jelena Vukadinović zaposlena je u Institutu za kukuruz „Zemun Polje“ u Laboratoriji za Molekularnu genetiku i fiziologiju. Angažovana je kao istraživač saradnik na projektu „Poboljšanje svojstava kukuruza i soje molekularnim i konvencionalnim oplemenjivanjem“ koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja (Projekat br. TR 31068). Glavna oblast naučno-istraživačkog rada Jelene Vukadinović je optimizacija metoda i određivanje sadržaja fitohemikalija (tokoferola, fenolnih kiselina, karotenoida i dr.) primenom visoko-efikasne tečne hromatografije u cilju poboljšanja svojstava kukuruza prema abiotičkom i biotičkom stresu u pogledu nutritivnog kvaliteta zrna.

Rezultati istraživanja, proistekli iz ove doktorske disertacije, prikazani su u dva naučna rada. Jedan rad štampan je u istaknutom međunarodnom časopisu (M22), a drugi u međunarodnom časopisu (M23). Takođe, rezultati istraživanja su prikazani u okviru 4 saopštenja na skupovima međunarodnog i nacionalnog značaja od čega jedno saopštenje na skupu međunarodnog značaja štampano u celini, jedno saopštenje na skupu međunarodnog značaja štampano u izvodu, dva saopštenja na naučnim skupovima nacionalnog značaja štampana u izvodu i jedne nagrade.

Objavljeni radovi i saopštenja koji čine deo disertacije**1. Naučni radovi****1.1. Rad objavljen u istaknutom međunarodnom časopisu (M22)**

1.1.1. Mesarović, J., Srdić, J., Mladenović-Drinić, S., Dragičević, V., Simić, M., Brankov, M., Milojković-Opsenica, M. Evaluation of the nutritional profile of sweet maize after herbicide and foliar fertilizer application, *Journal of Cereal Science* (2019), 87, 132-137. DOI: 10.1016/j.jcs.2019.03.017. ISSN: 0733-5210 (Impact factor 2018, **2,452** - Food Science & Technology (42/135)).

1.2. Rad objavljen u međunarodnom časopisu (M23)

1.2.1. Mesarović, J., Srdić, J., Mladenović Drinić, S., Dragičević, V., Simić, M., Brankov M., Milojković-Opsenica, D. Antioxidant status of the different sweet maize hybrids under herbicide and foliar fertilizer application, *Genetika* (2018), 50(3), 1023-1034. DOI: 10.2298/GENSR1803023M. ISSN: 0534-0012 (Impact factor 2018, **0,459** – Agronomy (78/89), Genetics & Heredity (169/174)).

2. Saopštenja sa naučnih skupova**2.1. Saopštenja na naučnim skupovima međunarodnog značaja štampana u celini (M33)**

2.1.1. Mesarovic J., Mladenovic Drinic, S., Dragicevic, V., Srdic, J., Simic, M., Brankov, M. Variability of tocopherols in sweet maize grain induced by herbicides. *Journal of International Scientific Publications, Agriculture & Food*, June 20-24, 2017, Elenite, Bulgaria 5, 42- 49. ISSN 1314-8591.

2.2. Saopštenja na naučnim skupovima međunarodnog značaja štampana u izvodu (M34)

2.2.1. Mesarović, J., Srdić, J., Mladenović-Drinić, S., Simić, M., Brankov, M., Kresović, B., Dragičević, V. Herbicide impact on content of phenolic compounds in sweet maize. 6th Congress of the Serbian genetic society, 13th – 17th October 2019, Vrnjačka Banja, Serbia. Book of abstracts, pp. 233. ISBN 978-86-87109-15-5

2.3. Saopštenja na naučnim skupovima nacionalnog značaja štampana u izvodu (M64)

2.3.1. Mesarović, J., Srdić, J., Mladenović-Drinić, S., Simić, M., Dragičević, V., Brankov, M., Kresović, B. Uticaj folijarnog đubriva na sadržaj karotenoida u zrnu kukuruza šećerca. Zbornik apstrakata VI Simpozijuma Sekcije za oplemenjivanje organizama Društva genetičara Srbije i IX Simpozijuma Društva selekcionera i semenara Republike Srbije, 07-11.maj, Vrnjačka Banja 2018, str. 55. ISBN 978-86-87109-14-8.

2.3.2. Mesarović, J., Brankov, M., Simić, M., Dragičević, V. Uticaj herbicida na sadržaj karotenoida u listu kukuruza šećerca. *Krat. izv. rad. Četvrte konferencije mladih hemičara Srbije*, 5. Novembar, 2016, Beograd, Srbija, str. 21. ISBN 978-86-7132-064.

3. Nagrade i priznanja (M104)

3.1. Mesarović J., S. Mladenović Drinić, V. Dragičević, M. Simić, J. Srdić, M. Brankov : Zlatna medalja za Antioxidants Improvement by Herbicides and Foliar Fertilizers Application in Sweet Maize Kernel. Odluka XV International Salon of Inventions and New Technologies "New Time", Sevastopolj, 26-28. septembar, 2019, Ruska Federacija.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора **Јелена З. Вукадиновић**

Број индекса **ДХ17/2013**

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**Утицај хербицида никосулфурана и мезотриона и фолијарног ђубрива на садржај
фитохемикалија у листу и зрну кукуруза шећерца**

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршила ауторска права и користила интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду,

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора **Јелена З. Вукадиновић**

Број индекса **ДХ17/2013**

Студијски програм **доктор хемијских наука**

Наслов рада **Утицај хербицида никосулфурина и мезотриона и фолијарног
ђубрива на садржај фитохемикалија у листу и зрну кукуруза
шећерца**

Ментор **др Душанка Милојковић-Опсеница**

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предала ради похрањења у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктор 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 аутора

У Београду,

Изјава о коришћењу

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

Утицај хербицида никосулфурона и мезотриона и фолијарног ђубрива на садржај фитохемикалија у листу и зрну кукуруза шећерца

која је моје ауторско дело.

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

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучила.

1. Ауторство (CCBY)
2. Ауторство – некомерцијално (CCBY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CCBY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CCBY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CCBY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CCBY-SA)

(Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду,

-
1. **Ауторство.** Дозвољаваате 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.** Дозвољаваате 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 прерада.** Дозвољаваате 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.** Дозвољаваате 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 прерада.** Дозвољаваате 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.** Дозвољаваате 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.