

Kvantitativno određivanje antioksidativno-protektivnih i pojedinih rezervnih supstanci semena i listova - modifikacija metodološkog pristupa

- Originalan naučni rad -

Slobodanka SREDOJEVIĆ i Vesna DRAGIČEVIĆ
Institut za kukuruz "Zemun Polje", Beograd-Zemun

Izvod: U ovom radu izvršena je modifikacija metoda za određivanje organskih i neorganskih supstanci odgovornih za klijanje semena i rast biljaka: fitin i slobodni PO_4 jon, kao i antistresnih faktora različitog porekla: ukupnih rastvorljivih tiola i fenola, u semenu i biljci, a koja se sastojala u izboru ekstrakcionog sredstva pogodnog za kvantitativno izolovanje navedenih supstanci iz zajedničkog ekstrakta početnog materijala (seme, list). Pokazalo se da je 0,15% tri-natrijum-cirtat poednako efikasan za ukupne toile, fitin, slobodni PO_4 jon i ukupne fenole. Dalje, dve odvagane supstance od 0,1 do 0,5 g iz prosečnog uzorka: 25 semena, odnosno klijanaca; pet mladih biljaka sa 5-7 listova, kao i dva lista (listovi ispod i iznad klipa) sa po tri biljke u fazi metličanja, sa 8 do 15 ml datog rastvora omogućava spektrofotometrijsko određivanje navedenih supstanci u dva, odnosno tri ponavljanja. Procedura je razrađena za potrebe introdukcije i selekcije, gde se raspolaze sa minimalnim prosečnim uzorkom koji se može upotrebiti za analize. U analitičkom smislu problem predstavlja mala masa uzorka kod sitnih semena i klijanaca, što zahteva minimalnu odvaganu supstancu i broj ponavljanja. Primena preciznih i brzih spektrofotometrijskih metoda, modifikovanih za velike serije, omogućava smanjenje broja ponavljanja na dva (statistički minimum), tako da preostaje dosta prostora (ml ekstrakta, g polaznog uzorka) da se uvedu i druge željene analize.

Ključne reči: Mminimalni prosečni uzorak, mogućnost proširenja analiza na druge poželjne faktore, precizne i brze spektrofotometrijske metode, zajedničko ekstrakciono sredstvo.

Uvod

Klijavost i održanje vitalnosti semena su od velikog biološkog i ekonomskog značaja, naročito za održanje semenskog materijala za potrebe selekcije i introdukcije. Fitin i slobodan fosfatni anjon (PO_4), kao faktori klijanja semena i metabolizma kod biljaka, zatim antioksidansi kao što su ukupni fenoli i tioli, kao faktori očuvanja klijavosti u semenu i stres-protektivni faktori u listu, su veoma važni faktori vitalnosti semena. Osim toga, naglašena je potreba testiranja širokog opsega odabranog materijala za introdukovanje u procesu selekcije na usporenu hidrolizu fitina u semenskom materijalu, a njegov smanjen sadržaj u konzumnom zrnju hibrida kukuruza (antinutritivni faktor - blokira fosfor i hidrolizu proteina), kao i na povećan sadržaj navedenih antioksidanasa.

Fitin. - Kao što je poznato fitin (mioinozitol heksa fosfat) je aktivna rezerva fosfora koja pomoću fitaze sukcesivno hidrolizuje do mioinozitol mono fosfata i pet PO_4 grupa, *Mihailović i sar.*, 1965. Fitin u semenu vezuje između 60 i 90 % fosfora koji se u fazi imbibicije i klijanja oslobađa hidrolizom. Ispitivanjima obavljenim na pšenici, *Hadžijev*, 1965, uočena je razlika u brzini hidrolize fitina i ugradnje PO_4 jona kod visokoprinosnih i niskoprinosnih sorti. Takođe je nađeno da pri niskim vrednostima pH zemljišta (smanjeno usvajanje fosfora), genotipovi sa smanjenim potrebama za ovim elementom imaju bolje recikliranje unutar zatvorenog sistema biljke, što je i inače karakteristično za fosfor u živim sistemima, *Mihailović i sar.*, 1965, *Clarkson i Scattergood*, 1982.

Iz navedenih razloga potrebno je da se iz kolekcije odaberu genotipovi i preduzmu koraci u pravcu dobijanja linija sa bolje usaglašenom hidrolizom fitina i ugradnjom PO_4 jona u biosintezu *de novo*, a u daljem postupku hibrida kukuruza sa smanjenim sadržajem fitina, jer je on u ishrani čoveka i monogastričnih životinja antinutritivni faktor, *Liu i sar.*, 2004.

Antioksidansi. - Antioksidansi su jedinjenja uglavnom iz grupe sekundarnih metabolita, različita po poreklu i strukturi, ali sa zajedničkim svojstvom da mogu da reaguju sa slobodnim radikalima poreklom, pre svega, iz procesa disanja, kao i iz drugih izvora. Veliku grupu antioksidanasa čine fenoli, jedinjenja u čijoj strukturi figurira šestočlani prsten i dvostruka veza konjugovana sa OH grupom. Ovde je stabilizacija slobodnog radikala različite energije i porekla omogućena putem izmene strukture celog molekula, gde ključnu ulogu ima šestočlani prsten.

Drugu grupu vrlo značajnih antioksidanasa čine tioli, odnosno njihov oksidovani i redukovani oblik. Tiolnu (SH) grupu proteina karakteriše to da može velikom brzinom da pređe iz redukovanog (PSH) u oksidovani (PSSP) oblik i obmuto. Pri tome se aktivni kiseonik prevodi u vodu, a sama tiolna grupa oslobađa za dalju reakciju.

Navedeni parametri imaju genotipsku zavisnost, te se osobine povećanog i/ili smanjenog sadržaja, kao i brzine reverzibilnih reakcija, odnosno, recikliranja mogu preneti - ugraditi u potomstvo radi prevazilaženja nepovoljnih spoljnih faktora kvaliteta zemljišta kada je u pitanju fosfor ili očuvanje inteziteta fotosinteze u stresnim uslovima, kao i produženja vitaliteta semena i biljke kao biološko-ekonomskog faktora.

Materijal i metode

Prosečan uzorak semena ili klijanaca (između 20-25 i 100 jedinki, zavisno od raspoloživosti semenom), zatim pet mladih biljaka, odnosno po dva lista odrasle biljke (ispod i iznad klipa, iz faze metličenja) se izmere na analitičkoj vagi i podvrgnu usitnjavanju, najpre na mlinu čekićaru da se dobije krupnoća čestice od 0,5 mm, a zatim se sprae u kugličnom mlinu u puder. Potom se odvagane od 0,2 do 0,5 g sprasene supstance i prelije sa 8-10 ml rastvora 0,15 % natrijum citrata ($C_6H_5Na_3O_7$) u bidestilovanoj vodi, te ostavi na mućkanju jedan sat. Dobijeni ekstrakt se centrifugira na 12.000 obrtaja 15 min na 4°C, nakon čega se vrši razblaženje prikazano u Tabeli 1, shodno osetljivosti datih metoda za detekciju, nakon čega se razblaženi ekstrakt rasporedi po odgovarajućim alikvotima. Za detekciju navedenih jedinjenja primenjeni su reagensi i postupci standardnih metoda za njihovu detekciju.

Dalje, preostali ekstrakt, kao i početna sprasena supstanca semena i lista, mogu se upotrebiti za detekciju faktora odgovornih za druga svojstva.

Fitin. - Procedura sa Wade-ovim reagensom, **Latta** i **Eskin**, 1980, po modifikaciji **Sredojevićeve**, 1989, je sledeća: razblaženi alikvot ekstrakta (Tabela 1) se pomeša sa 0,5 ml Wade-ovog reagensa (0,003 % $FeCl_3 \times 6 H_2O$ i 0,3 % 5-sulfosalicilne kiseline rastvori se u destilovanoj vodi; čuva se u tamnoj staklenoj boci, a ispravnost se proverava preko slepe probe posle mesec dana čuvanja) i centrifugira 10 minuta na 12.000 obrtaja na 4°C. Značajno je da se naglasi da kod ovog reagensa slepa proba ima najveću vrednost jer se reakcija sa fitinom bazira na vezivanju gvožđa, te se intenzitet boje smanjuje proporcionalno opadanju njegove koncentracije. Kao standard upotrebljen je natrijum fitat izolovan iz kukuruza (SIGMA) pomoću serije rastvora koncentracije 0,025-0,150 mg ml⁻¹ u vodi na talasnoj dužini 500 nm.

Slobodni fosfatni anjon. - Određuje se po metodi koju je razvio **Pollman**, 1991, za ukupni fosfor. U alikvot od 2 ml (Tabela 1) dodaje se 0,5 ml molibdovanadatnog reagensa (60 g $(NH_4)Mo_7O_{24} \times 4H_2O$ u 900 ml vrele bidestilovane vode, ohlađeno preneti u normalni sud od 1 l; dalje, 1,5 g NH_4VO_3 u 690 ml vrele vode, ohladiti i dodati 300 ml HNO_3 , ohlađeno se prenese u normalni sud od 1L; dva rastvora se pomešaju obavezno: I - molibdenski u II - vanadatni i čuvaju na sobnoj temperaturi u plastičnoj boci neograničeno uz proveru slepe probe). Standardna kriva se pravi sa KH_2PO_4 u koncentracijama od 2,5 µg do 17,5 µg ml⁻¹ (0,1097 g u 100 ml → 1 ml u 100 ml → 10 ml 100 ml → 1; 2; 3; 4; 5 ml i dalje, u 10 ml na talasnoj dužini 400 nm).

Redukovani PSH. - Određuje se po metodi **de Kok i sar.**, 1981: razblaženje se vrši dodavanjem 0,5 ml vode u 0,5 ml ekstrakta, nakon čega se dodaje 1 ml reagensa (0,059 g DTNB se rastvori u 100 ml 0,1 M TRIS-HCl, uz doterivanje reekcije pH=7) nakon čega se očitava absorbanca na spektrofotometru na 412 nm.

Ukupni fenoli. - Određuju se prema Prajsovoj metodi Pruskog plavog, **Budini i sar.**, 1980, **Price** and **Butler**, 1977, a prema modifikaciji Simićeve, **Simić i sar.**, 2004. Za standardnu krivu upotrebljen je derivat cimetine kiseline (3-hidroksi-4-metoksicimetna kiselina, Merck) u koncentraciji od 0,5 do 4 µg ml⁻¹ (0,0548 g u 500 ml; 0,5-4,0 ml u 100 ml) na talasnoj dužini 720 nm.

Rezultati i diskusija

Izbor ekstrakcionog sredstva. - Izbor zajedničkog ekstrakcionog sredstva podrazumevao je da se ekstrakciona sredstava koja se primenjuju za fitin, slobodni fosfatni jon i ukupne fenole prilagode operativnom sredstvu za ukupne tiole, blagom puferskom rastvoru: 0,15 % tri-natrijum citratu rastvorenom u bidestilovanoj vodi, **Dragičević**, 1999, 2007. Spektrofotometrijska metoda za detekciju fitina Wade-ovim reagensom prošla je kroz više modifikacija zavisno od delova biljke u kojima je vršeno određivanje. Prvo takvo prilagođavanje se sastojalo u neutralizaciji 5% TCA (tri-hlor sirćetna kiselina) ekstrakta do pH vrednosti 5,5-7,5 **Sredojević**, 1990. Sledila je upotreba vode kao rastvarača za ekstrakciju rastvorljivog fitina iz semena kukuruza, **Jočić**, 1995, potom 1N NaCl rastvor za ekstrakciju iz lista zelene salate, **Dragičević**, 1999. Prednost 0,15 % tri-Na-citrata u odnosu na 5% TCA kao ekstrakcionog sredstva je što je neutralan (pH 7), čime se eliminiše jedan korak: neutralizacija visoko kiselog rastvora. Međutim, voda kao rastvarač za fitin je nepovoljna zato što se za ispiranje fitina iz semena mora ili primeniti veliko razblaženje ili veliki broj sukcesivnih ispiranja a, **Jočić**, 1995. Što se slanog rastvora tiče, on je nepovoljan u narednoj fazi modifikacije postupka po principu "sve iz jednog ekstrakta", jer koaguliše proteine.

Pokazalo se da svi rastvarači pogodni za ekstrakciju fitina iz semena i lista mogu da budu podjednako efikasni i za slobodni fosfatni anjon, PO₄ jon, **Dragičević**, 1999, 2007. Stoga je za detekciju datog anjona prihvatljivo isto ekstrakciono sredstvo, 0,15 % tri-Na-citrat u bidestilovanoj vodi (Tabela 1).

Metoda za određivanje fenola je modifikovana za velike serije uzoraka pri proceni klijavosti iz eksudata semena, **Simić i sar.**, 2004, te je kao ekstrakciono sredstvo upotrebljena voda. S obzirom na neutralnost (pH 7) i nisku koncentraciju tri-

Table 1. Razblaženje ekstrakta i alikvoti po metodama
Dilution of Extracts and Aliquots over Methods

	PPhY	PPO ₄ #	PSH	Fenoli - Phenols
Ekstrakt (ml) - Extract	0,1	1	1	1
Rastvarač (ml) - Solvent	1,4	1	1	9
Odnos - Relation	1: 14	1:1	1: 1	1: 9
Alikvot - ml - Aliquot	1,5	2	1	2,1
λ (nm)	500	400	412	720

Samo u slučaju detekcije PO₄ jona koristi se ekstrakciono sredstvo za razblaženje (vodeni rastvor 0,15 % Na-citrata); ostala razblaženja se vrše sa bidestilovanu H₂O; λ - talasna dužina očitavanja apsorbancije na spektrofotometru - # Solvent was used as a dilution medium (0.15% Na-citrate), only in case of PO₄ ion detection; the other dilutions were performed by bi-distilled water; λ - wavelength of spectrophotometric absorbance.

PPy - fitinski fosfor; PPO₄ - fosfor u orto fosfatnom anjonu; PSH-tiolna grupa proteina; Fenoli - organski fenolni metaboliti - PPy - Phytic phosphorus; PPO₄ - phosphorus in ortho-phosphatic anion; PSH-thiolic group of proteins; Phenols - organic phenolic metabolites.

Na-citrata (0,15 %) nije bilo potrebno da se vrši prilagođavanje pri prelasku sa vode kao ekstrakcionog sredstva na tri-Na- citrat.

Izbor metoda za detekciju pojedinačnih, traženih parametara. - Savremene metode za detekciju fitina uglavnom se baziraju na upotrebi HPLC i spektrofotometrijskih aparata. Navedeno prilagođavanje, preko ekstrakcionog sredstva je namenjeno spektrofotometrijskom određivanju sa Wade-ovim reagensom. Bojena reakcija sa trovalentnim gvožđem (Fe^{3+}) zahtevala je neutralnu sredinu, pH 7, što je omogućilo jednostavnu primenu ekstrakcionog sredstva koje samo po sebi ima datu pH vrednost.

Za detekciju slobodnog PO_4 jona razvijen je veliki broj metoda zavisno od potreba i uslova koje su diktirali ometajući faktori. Ovde je odabrana metoda koja se u seriji predviđenih parametara koristi za određivanje ukupnog fosfora prevedenog u formi PO_4 jona. Izbor je učinjen po principu jednokratnog ubrizgavanja mešanog dvojnog molibdo-vanado kompleksnog reagensa, **Pollman**, 1991.

Važnost slobodnih tiola se ogleda u njihovoj zaštitnoj, antioksidativnoj ulozi **Schürman** i **Jacquot**, 2000, kao i u signalnoj funkciji, **Xiong i sar.**, 2002. S obzirom da je tri-Na-citrat preuzet kao ekstrakciono sredstvo pri detekciji slobodnih tiola, **de Kok i sar.**, 1981, metoda nije imala značajnije modifikacije, osim različitih razblaženja, u odnosu na materijal koji je bio analiziran (Tabela 2).

Tabela 2. Raspon variranja merenja apsorpcija, odnosno, koncentracija u okviru: a) standardnih krivih sa odgovarajućim p.a. supstancama, b) test uzoraka semena i lista

The Range of Variations of Absorption Measurements, i.e. of Concentrations within: a) Standard Curves with Appropriate p.a. Substances, b) Test Seed and Leaf Samples

a)	Fitin	P_{Phy}	PO_4	PSH	Fenoli					
	Phytine	P-phytic			Phenols					
Max raspon	4.07605	0.018974	0.000895	0.279513	/					
Max range	30.57037	0.142307	0.017007	4.572034	/					
SD	1.451737	0.006758	59.47133	0.102583	/					
	11.11923	0.0055262	469.3968	1.685313	/					
b)	Fitin	P-Phy		PO_4	PSH	Fenoli				
	Phytine	Max	SD	Max	Max	SD	Max	SD	Max	
Seme Seed	7.28	2.17	0,03	0.01	1.223	0.459	117.77	37.564	69.07	23.82
List Leaf	8.21	2.18	8.91	2.18	15.037	6.06	29.55	10.26	16.27	4.32

Ukupni fenoli su, zbog svog antioksidativnog značaja za čovekov organizam u velikoj žiži interesovanja, te stoga, i naučnog ispitivanja, tako da se neprekidno modifikuju i razvijaju nove metode njihove detekcije, kako klasične spektrofotometrijske, tako i primenom novijih tehnika, HPLC na primer. Međutim, *J. Sci. Agric. Research/Arh. poljopr. nauke* 70, 249 (2009/1), 13-20

kako je i za ostale parametere izbor aparature za detekciju bio spektrofotometar i za nega prilagođene metode, te je i za detekciju ukupnih fenola za velike serije u kratkom vremenskom intervalu od jeseni do proleća (berba-setva) odabrana metoda Pruskog (Berlinskog) plavog po modifikaciji **Simić i sar.**, 2004.

Odstupanja. - Za date reakcije rađena su minimalna i maksimalna odstupanja i to na dva nivoa: sa apsolutnim standardima (p.a. supstanca), čije vrednosti su date u Tabeli 2a i one su znatno niže nego vrednosti dobijene za uzorak (Tabela 2b). Približavanje vrednosti odstupanja kod uzoraka u odnosu na standarde postiže se rutinom i/ili odmernim instrumentima (instrumenti kojima se vrši manipulacija).

Prema iznetim vrednostima u Tabeli 2b maksimalno odstupanje vrednosti za fitin, kod semena i lista se približava vrednosti minimalnog odstupanja kod standardne krive (Tabela 2a). Slične vrednosti se nalaze kod semena za P_{phy} , dok čist PO_4 kod semena, a naročito lista prelazi vrednosti dobijene pri formiranju standardne krive. Slično se ponašaju PSH i fenoli, kako u listu, tako i u semenu, s tim, što se kod ova dva parametra manja odstupanja nalaze kod lista nego kod semena. Bolje usaglašavanje između standarda i uzorka (seme i list) biće predmet daljeg analitičkog ispitivanja i prilagođavanja putem pripreme uzorka, odabira ekstrakcionih sredstava, kao i samih metoda detekcije pojedinačnih parametara.

Zaključak

Izvršen je izbor i testiranje nekoliko rastvarača, ekstrakcionih medijuma najčešće primenjivanih za izolaciju ispitivanih parametara: fitina, slobodnog ortofosfatnog anjona, rastvorljivih tiola i ukupnih fenola. Od zastupljenih rastvarača za ekstrakciju pojedinačnih ispitivanih supstanci, univerzalni karakter je pokazao puferski visoko razblaženi 0.15% tri- natrijum-citrat. Odabrani rastvarač je preuzet iz procedure za ukupne tirole, te za njihovo određivanje nije bila potrebna modifikacija. Takođe, njegova primena na ekstrakciju ukupnih fenola nije zahtevala korekcije, jer su oni podjednako ekstraktibilni u razblaženim i neutralnim rastvaračima, pa čak i u vodi.

Literatura

- Budini, R., D. Tonelli and S. Grotti** (1980): Analysis of total phenols using Prussian Blue methods. *J. Agric. Food Chem.* 28: 1236-1238.
- Clarkson, D.T. and C.B. Scattergood** (1982): Growth and phosphate transport in barley and tomato plants during the development of and recovery from phosphate stress. *J. Exp. Bot.* 33: 865-875
- de Kok, L.J., P.J.L. de Kan, G. Tanczos and J.C. Kupier** (1981): Sulphate induced accumulation of glutathione and frost-tolerance of spinach leaf tissue. *Physiol. Plant.* 53: 435-438

- Dragičević, V.** (1999) Uticaj selena na dinamiku rasta i biohemijska svojstva salate (*Lactuca sativa* L.), Magistarski rad, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad.
- Dragičević, V.** (2007) Uticaj ubrzanog starenja i stimulativnih koncentracija 2,4-d na seme kukuruza (*Zea mays* L.). Doktorska disertacija, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad.
- Hadžijev, D.** (1963): Dinamika raznih oblika fosfora u pšenici u toku njene ontogeneze. Doktorska disertacija, Hemijski odsek, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd
- Jočić, N.** (1995): Ispitivanje sadržaja rastvorljivog fitina u semenu kukuruza F1 generacije u fazi mirovanja, Specijalistički rad, Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd.
- Latta, M. and M. Eskin** (1980): A simple and rapid colorimetric method for phytine determination. *J. Agric. Food Chem.* 28: 1308-1311.
- Liu, J.C., I. Ockeden, M. Truex M. and J.N.A. Lott** (2004) Phytic acid-phosphorus and other nutritionally important mineral nutrient elements in grain of wild type and low phytic acid (*Ipa-1*) rice. *Seed Sci. Res.* 14: 109-116
- Mihailović, M., M. Antić and D. Hadžijev** (1965): Chemical investigation of wheat. *Plant Soil XXIII*: 117-128
- Pollman, R.M.** (1991): Atomic absorption spectrophotometric determination of calcium and magnesium and colorimetric determination of phosphorus in cheese: Collaborative study. *J. Assoc. Anal. Chem.* 74 (1): 27-30.
- Price, M.L. and J.G. Butler** (1977): Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain. *J. Agric. Food Chem.* 25: 1268-1273.
- Schürmann, P. and J.P. Jacquot** (2000): Plant tioredoxin systems revisited. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51: 371-400.
- Simić, A., S. Sredojević, M. Todorović, L. Đukanović and Č. Radenović** (2004): Studies on the relationship between content of total phenolics in exudates and germination ability of maize seed during accelerated aging. *Seed Sci. Technol.* 32: 213-218.
- Sredojević, S.** (1990): Modified, rapid spectrophotometric method for phytine determination in maize seed, leaf and root. *Book of Abstracts of the Symposium in Bioanalytical Methods, September 4-7, 1990, Prague, Czechoslovakia*, pp. 114.
- Xiong, L., K.S. Schumaker and J.K. Zhu** (2002): Cell signalling during cold, drought and salt stress. *Plant Cell* 14: 165-183.

Primljeno: 20.03.2009.

Odobreno: 31.03.2009.

* *
*

The Quantitative Determination of Antioxidative-protective and some Storage Substances of Seeds and Leaves - Modification of Methodological Approach

- Original scientific paper -

Slobodanka SREDOJEVIĆ and Vesna DRAGIČEVIĆ
Maize Research Institute, Zemun Polje, Belgrade-Zemun

Summary

The modification was done with a purpose to find the integral medium for extraction of some organic and nonorganic substances responsible for seed germination and plant growth: phytine, PO₄ ion, as well as, stress protecting substances of a different origin: total soluble phenols and thiols in seeds and leaves. This modification implied the selection of the extraction medium suitable for the quantitative isolation of substances from the common extracts of the initial material (seed, leaf). It was shown that highly diluted 0.15% *tri*-sodium-citrate can be used as a universal extraction medium for phytine, *ortho*-phosphate ion, soluble total thiols and total phenols. This medium allowed the efficient extraction of phytine and phosphate from degermed milled maize seeds. Also, it is sensitive enough to make difference between their content in young and mature maize leaves. Two weighted samples of 0.1-0.5 g, from the average sample of 25 seeds or seedlings, five young plants, as well as, two leaves (above and below maize cob) from three plants in the tasseling stage, with the addition of 8-15 ml of the above mentioned solution, provided a spectrophotometrical determination of these substances in 2-3 replicates. The procedure was developed to be suitable for the introduction and breeding, including a unique minimum average sample for all observed parameters. The application of precise and rapid spectrophotometrical methods, modified for large sample series, provides the reduction in the number of replicates to two (the statistical minimum), hence there is enough space for the introduction of the other desirable analyses.

Received: 20/03/2009

Accepted: 31/03/2009

Adresa autora:

Slobodanka SREDOJEVIĆ

Institut za kukuruz "Zemun Polje"

Slobodana Bajića 1

11185 Beograd-Zemun

Srbija

E-mail: vesnadrag@yahoo.com