

Utjecaj bifortifikacije selenom na koncentracije makro i mikroelemenata u moštu i vinu sorte vinove loze Regent

Šinko, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:206292>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-15**



Sveučilište Josipa Jurja
Strossmayera u Osijeku

**Fakultet
agrobiotehničkih
znanosti Osijek**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek - Repository of the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Ana Šinko

Diplomski sveučilišni studij Voćarstvo, vinogradarstvo i vinarstvo

Smjer Vinogradarstvo i vinarstvo

**UTJECAJ BIOFORTIFIKACIJE SELENOM NA KONCENTRACIJE MAKRO I
MIKROELEMENATA U MOŠTU I VINU SORTE VINOVE LOZE REGENT**

Diplomski rad

Osijek, 2022.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Ana Šinko

Diplomski sveučilišni studij Voćarstvo, vinogradarstvo i vinarstvo

Smjer Vinogradarstvo i vinarstvo

**UTJECAJ BIOFORTIFIKACIJE SELENOM NA KONCENTRACIJE MAKRO I
MIKROELEMENATA U MOŠTU I VINU SORTE VINOVE LOZE REGENT**

Diplomski rad

Osijek, 2022.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Ana Šinko

Diplomski sveučilišni studij Voćarstvo, vinogradarstvo i vinarstvo

Smjer Vinogradarstvo i vinarstvo

**UTJECAJ BIOFORTIFIKACIJE SELENOM NA KONCENTRACIJE MAKRO I
MIKROELEMENTATA U MOŠTU I VINU SORTE VINOVE LOZE REGENT**

Diplomski rad

Povjerenstvo za ocjenu i obranu diplomskog rada:

1. izv. prof. dr. sc. Mato Drenjančević, predsjednik
2. izv. prof. dr. sc. Andrijana Rebekić, mentor
3. izv. prof. dr. sc. Vladimir Jukić, član

Osijek, 2022.

Sadržaj

| | |
|--|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1. Cilj istraživanja | 1 |
| 2. PREGLED LITERATURE | 2 |
| 2.1. Biofortifikacija | 2 |
| 2.2. Bioraspoloživost hraniva | 2 |
| 2.3. Uloga selena (Se) u tlu i biljkama | 4 |
| 2.4. Uloga željeza (Fe) u tlu i biljkama | 6 |
| 2.5. Uloga cinka (Zn) u tlu i biljkama | 7 |
| 2.6. Uloga magnezija (Mg) u tlu i biljkama | 8 |
| 2.7. Uloga kalcija (Ca) u tlu i biljkama | 10 |
| 2.8. Uloga kalija (K) u tlu i biljkama | 12 |
| 2.9. Uloga mangana (Mn) u tlu i biljkama | 13 |
| 3. MATERIJALI I METODE | 15 |
| 3.1. Položaj vinograda i klimatski uvjeti | 15 |
| 3.2. Sorta Regent | 15 |
| 3.3. Postavljanje pokusa | 17 |
| 3.4. Priprema uzoraka mošta i vina | 18 |
| 3.5. Simulacija probave <i>in vitro</i> | 19 |
| 3.6. Određivanje koncentracije K, Ca, Mg, Fe, Zn i Se u moštu i vinu | 21 |
| 3.7. Statistička analiza podataka | 21 |
| 4. REZULTATI | 22 |
| 4.1. Ukupne koncentracije K, Ca i Mg (mg L^{-1}) u moštu i vinu | 22 |
| 4.2. Ukupne koncentracije Se ($\mu\text{g L}^{-1}$), Fe, Zn i Mn (mg L^{-1}) u moštu i vinu | 23 |
| 4.3. Bioraspoložive koncentracije K, Ca i Mg (mg L^{-1}) u moštu i vinu | 24 |
| 4.4. Bioraspoložive koncentracije Se ($\mu\text{g L}^{-1}$), Fe, Zn i Mn (mg L^{-1}) u moštu i vinu | 25 |
| 5. RASPRAVA | 27 |
| 6. ZAKLJUČAK | 29 |
| 7. LITERATURA | 30 |
| 8. SAŽETAK | 36 |
| 9. SUMMARY | 37 |
| 10. POPIS TABLICA | 38 |
| 11. POPIS SLIKA | 39 |

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA
BASIC DOCUMENTATION CARD

1. UVOD

Vinova loza spada među najstarije kultivirane biljke. Prema arheološkim nalazima, može se zaključiti da se počela uzgajati 8000 godina pr. Kr. na području Crnog i Kaspijskog mora. Sa ovih prostora se kultivirana loza širila prema Mediteranu te ostalim dijelovima Europe. Kolonizacijom ostalih dijelova svijeta proširila se po svim kontinentima. Na područje Hrvatske donio ju je rimski car Marko Aurelije i proširio po cijelom Panonskom području. Vinova loza (*lat. Vitis vinifera*) potječe iz porodice *Vitaceae*. Najviše se uzgaja zbog proizvodnje vina. Zbog različitih sorti i kultivara prema kakvoći se dijeli na stolna, kvalitetna i vrhunska, a prema boji na bijela, ružičasta i crna. Vino spada u kategoriju najpopularnijih alkoholnih pića u svijetu, a smatra se važnim sastojkom u europskim i svjetskim kuhinjama. Potrošnja vina po stanovniku u Europi u prosjeku iznosi oko 28 litara. Razvojem znanosti i svijesti o nedostatku resursa i hrane s visokom nutritivnom vrijednošću te utjecaju hrane na ljudsko zdravlje javila se potreba za istraživanjem blagodati i učinka vina na ljudski organizam. Za normalnu funkciju ljudskog organizma potrebna su 22 različita elementa. Jedan od ciljeva prilikom proizvodnje hrane, pa tako i vina, je proizvesti hranu sa što bogatijim i raznovrsnijim mineralnim sastavom. Kao jedna od metoda za povećanje nutritivne vrijednosti hrane koristi se biofortifikacija. Biofortifikacija je postupak kojim se povećavaju koncentracije esencijalnih elemenata u jestivim dijelovima biljke. Specifičnost biofortifikacije je u tome što se usredotočuje na obogaćivanje biljke hranjivim tvarima dok biljka raste, umjesto da se hranjive tvari dodaju nakon sazrijevanja i prilikom prerade. Vino je vrlo kompleksan proizvod, koji uz alkohol kao kvantitativno najzastupljeniji sastojak, sadrži na stotine spojeva različitih kemijskih struktura i svojstava (Soleas i sur., 1997.). Na sastav vina i njegova kvalitativna i kemijska svojstva utječe cijeli niz svojstava, od uzgoja vinove loze, sastava tla, sorte, gnojidbe, špricanja i berbe. Prema tome, može se očekivati da bi se biofortifikacijom mogao povećati sadržaj minerala u vinu. Uzevši u obzir da je vino kompleksan proizvod, važno je pratiti kako biofortifikacija utječe na kvalitativna svojstva vina.

1.1. Cilj istraživanja

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi utjecaj biofortifikacije selenom na ukupne i bioraspoložive koncentracije makro i mikroelemenata u moštu i vinu vinove loze Regent.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Biofortifikacija

Biofortifikacija ili “biološka fortifikacija“ odnosi se na nutritivno poboljšanje prehrambenih usjeva korištenjem moderne tehnologije (Garg i sur., 2018.). S obzirom na način provođenja, razlikujemo agronomsku i genetsku biofortifikaciju. Agronomska biofortifikacija se odnosi na upotrebu gnojiva s mikroelementima u tlo ili folijarnom primjenom izravno na lišće usjeva radi povećanja koncentracije elemenata u jestivim dijelovima biljke kako bi se povećao unos odabranog esencijalnog elementa u ljudskoj prehrani (Adu i sur., 2018.). Iako je gnojidba tla radi povećanja hranjivih tvari standardna agrotehnička mjera, folijarna primjena smatra se učinkovitijom i ekonomičnijom kao metoda biofortifikacije mikroelementima (Cakmak, 2018.). Agronomska biofortifikacija je relativno jeftina i primjenjuje se kao kratkoročno rješenje koje je neophodno ponavljati u svakoj vegetacijskoj sezoni.

Genetska biofortifikacija podrazumijeva provođenje oplemenjivanja s ciljem kreiranja sorti s poboljšanom sposobnošću usvajanja i akumulacije viših koncentracija minerala. Ovaj pristup je dugotrajniji i značajno skuplji nego agronomska biofortifikacija. S druge strane, smatra se održivim pristupom za povećanje koncentracije mikronutrijenata u biljkama (Cakmak, 2008.).

Kako bi se smanjile posljedice pothranjenosti selenom provedena su mnoga istraživanja na različitim biljnim vrstama. Lokalni, ekološki i ekonomski aspekti u proizvodnji hrane te prihvaćanje ovakvog načina proizvodnje od strane poljoprivrednika imaju veliku ulogu u uspješnom ishodu biofortifikacije (Schiavon i sur., 2020). Ovakvim načinom proizvodnje dostupnost Se ili bilo kojeg drugog esencijalnog nutrijenta postaju pristupačniji u ljudskoj prehrani (Zahirul Islam i sur., 2019). Hrana biofortificirana Se ima veću ekonomsku i nutritivnu vrijednost i time je privlačnija kupcima koji su svjesni važnosti raznovrsne prehrane.

2.2. Bioraspoloživost hraniva

Biljke pomoću Sunčevog zračenja pretvaraju neorgansku (neživu) tvar u organsku tvar koja je potrebna svim živim bićima. Taj proces se naziva primarna organogena produkcija za koju su neophodni mineralni organogeni elementi (C, O, H). Sve elemente koji se

koriste u tom procesu nazivamo neophodna biljna hraniva, a biljke ih mogu usvajati u različitim kemijskim oblicima (Vukadinović i Vukadinović, 2011.).

Mineralni elementi mogu biti organskog i anorganskog podrijetla, a nastaju kao produkti razgradnje organske (žive) tvari ili iz minerala Zemljine kore. Zbog njihove različite uloge u rastu i razvitku biljaka možemo ih podijeliti u grupe (Vukadinović i Vukadinović, 2011.). Ovisno o tlu, raspoloživost elemenata ishrane može veoma varirati, a ovisi o mnogim svojstvima tla kao što su sadržaj humusa, količina oborina, struktura tla te o gnojidbi i vrsti kultivara. Biljka elemente ishrane usvaja preko korijenovog sustava. Raspoloživost hraniva ovisi o kemijskom obliku u kojem ih biljka može usvojiti i moraju se nalaziti u zoni korjenovog sustava. Bioraspoloživost hraniva ovisi o energiji koja je biljci potrebna da bi ga usvojila (Vukadinović i Vukadinović, 2011.).

Smatra se kako je za život biljaka neophodno 17 kemijskih elemenata i zbog toga ih nazivamo neophodni, esencijalni ili biogeni elementi. Biljka za svoj rast i razvoj zahtjeva različite količine hranjivih elemenata i prema tome ih možemo podijeliti na:

1. Makroelemente: C, O, H, N, P, K, S, Ca, Mg i Fe
2. Mikroelemente: B, Mn, Zn, Cu, Mo, Cl, Ni
3. Korisne elemente: Co, Na, Si, Al, Se, V, Ti, La, Ce
4. Toksične elemente: Cr, Cd, U, Hg, Pb, As

2.3. Uloga selena (Se) u tlu i biljkama

Selen (Se) je kemijski element kojeg je 1818. godine otkrio Jöns Jacob Berzelius, švedski kemičar koji je također izolirao i opisao elemente cerij, cirkonij, silicij i torij. Naziv selen potječe od grčke riječi „*selene*“ što znači mjesec. Selen je nemetal koji se označava simbolom Se i atomskim brojem 34. Nalazi se u četvrtoj periodi periodnog sustava u skupini halogena zajedno s kisikom, sumporom i telurom (Perrone i sur., 2015.).

Selen se smatra jednim od najkontroverznijih mikroelemenata. Dok je s jedne strane otrovan u velikim dozama, s druge njegov nedostatak utječe na povećanje osjetljivosti životinja i ljudi na različite bolesti. Tlo je glavni izvor Se za biljke, pa tako i za životinje koje jedu te biljke i ljude koji konzumiraju proizvode biljnog i životinjskog podrijetla. Raspoloživost Se razlikuje se po područjima. Njegova raspoloživost u tlu dodatno se smanjuje korištenjem anorganskog gnojiva koji sadrži sumpor (S), zakiseljavanjem tla, smanjenom aeracijom tla (Lyons i sur., 2007.). U prirodi selen možemo pronaći u organskom i anorganskom obliku. U anorganskom obliku može se naći u različitim mineralima u obliku selenita, selenata i selenida, kao i u metalnom (Se⁰) obliku. Selen se nalazi u sastojcima hrane za životinje poput krmne smjese, žitarica i jela od uljane repice. Sastavni je dio različitih organskih spojeva, uključujući aminokiseline selenometionin i selenocistein te se može pronaći u Se²⁻ oksidacijskom stanju. Aminokiselina selenometionin smatra se najboljim načinom unosa selena u organizam za životinje i ljude (Lyons i sur., 2007.).

Koncentracija selena u tlima značajno varira. Sadržaj selena se u većini tala kreće od 0,1 do 2 ppm. U tlu se nalazi u obliku selenida, selenita, selenata, elementarnog Se i organskih spojeva selena. Selen se u visokim koncentracijama većinom pronalazi u sedimentnim stijenama i škriljevcima formiranim u krškom razdoblju, dok se niske koncentracije nalaze u granitima, vapnencima, vulkanskim stijenama i pješćarama (Van Metre i Callan, 2001.). Biljke Se akumuliraju iz okoliša i akumuliraju pomoću metaboličke transformacije. Količina usvojenog Se ovisi o njegovom kemijskom obliku i koncentraciji, svojstvima tla te sposobnošću biljke da apsorbira i metabolizira Se (Gupta i Gupta, 2017.; Germ i Stibilj, 2007.). Anorganski oblici koje biljke efikasno apsorbiraju su selenati (SeO₄²⁻) i seleniti (SeO₃²⁻), te organski oblici poput selenometionina (SeMet) i selenocisteina (SeCys) imaju puno veću sposobnost zadržavanja u organizmu (Gupta i Gupta, 2017; Germ i Stibilj, 2007.). Selenat prevladava u tlima bogatim kisikom i brže se asimilira, dok je selenit

zastupljeniji u tlima povećane kiselosti i vlažnosti (Li i sur., 2008.). Selen se ispire iz stijena, sedimenata i tala i završava u vodi gdje postaje dostupan biljnim organizmima. Biljke ga većinom usvajaju u obliku SeO_4^{2-} , reduciraju i ugrađuju u organske komponente. Prenosi se kroz hranidbeni lanac te razgrađuje i izlučuje iz organizma. Taj proces se naziva biokemijski ciklus Se (Hartikainen, 2005.). U procjeni bioraspoloživosti Se ključni su podaci o kemijskim svojstvima anorganskog Se i metaboličkim transformacijama u organske oblike. Sadržaj Se ovisi o obliku Se kojima je organizam izložen te njegovoj kvaliteti i kvantiteti. Prema sposobnostima apsorpcije i akumulacije Se, provođenju metabolizma i stupnju tolerancije, biljke se dijele u tri skupine: primarni akumulatori (hiperakumulatori), sekundarni akumulatori i neakumulatori (Gupta i Gupta, 2017; Pilon-Smits i Quinn, 2010.). Skupini neakumulatora pripadaju žitarice i trave koje akumuliraju samo nekoliko miligrama Se i mogu rasti na seleniferanom tlu, a glavnim uzrokom toksičnosti smatra se supstitucija S sa Se (Terry i sur., 2000.). Sekundarni akumulatori metaboliziraju S i se u jednakoj mjeri, u rasponu 100 – 1000 mg Se kg^{-1} suhe tvari. Primarni akumulatori ili hiperakumulatori sadrže velike količine Se i S. Rastu na tlima bogatim Se i akumuliraju ga u koncentracijama većim od 1000 mg Se kg^{-1} suhe tvari bez pojave toksičnosti. Hiperakumulatori imaju razvijen selenospecifičan organizam kojim se ostvaruje potencijal u procesu biofortifikacije (Pilon-Smits i Quinn, 2010.).

Selen se poput cinka i bakra u organizmu nalazi u malim količinama, ali ima vrlo važnu ulogu i sudjeluje u antioksidacijskim procesima. Neophodan je za funkcioniranje ljudskog organizma jer štiti stanice od lipidne peroksidacije, čuva zdravlje reproduktivnih organa, regulira hormone štitnjače, smanjuje mogućnost oboljenja od raka, jača imunitet i ima antiviralna svojstva (D'Amato i sur., 2018; Rayman, 2012.). U organizmu se nalazi u obliku selenoproteina koji sadrže aminokiseline selenometionin (SeMet) i selenocistein (SeCys). Selenoproteini imaju antioksidacijsko djelovanje i uklanjaju reaktivne kisikove tvari (ROS, eng. *reactive oxygen species*) koje štetno djeluju na stanice (Pilon – Smits i Quinn, 2010.). Koncentracija ROS-a u organizmu može se kontrolirati pokretanjem enzimskih i neenzimskih reakcija koje imaju pozitivan utjecaj na toleranciju stresa i omogućuju normalan rast i razvoj biljaka. Pri visokim koncentracijama Se koje organizam ne može tolerirati dolazi do trovanja i smrti organizma. Do visoke koncentracije Se dolazi zbog prisustva S u proteinima bogatim aminokiselinama. Zbog zamjene S sa Se u proteinima dolazi do pogrešnog slaganja i metaboličke disfunkcije molekula, te dolazi do

stresa uzrokovanog pro-oksidacijskim reakcijama. Ugradnjom aminokiselina u proteine smanjuje se koncentracija unutarstaničnog Se (Çakır i sur., 2012.).

U biljnim organizmima Se utječe na povećanje tolerancije biljaka na stres izazvan UV svjetlošću, pomaže pri niskim temperaturama, povišenim salinitetom, regulirati vodni režim tijekom suše te potaknuti sazrijevanje sjemena i rast biljke (Xue i sur., 2001.).

2.4. Uloga željeza (Fe) u tlu i biljkama

Željezo spada u neplemenite metale, nije stabilan na zraku i uz kisik i vodu korodira. Otapa se u razrijeđenim neoksidirajućim kiselinama uz oslobađanje vodika. Smatra se najzastupljenijim prijelaznim metalom na Zemlji. Važan je za mnoge žive organizme i njihov opstanak. Smatra se esencijalnim elementom jer je sastavni dio staničnih procesa uključujući disanje, redoks procese, energetski metabolizam, DNA sintezu i regulaciju gena (Andrews, 1998.). Unatoč velikoj dostupnosti željeza u biosferi, organizmi mogu doživjeti nedostatak ili suvišak Fe sa nepopravljivim posljedicama. U prirodi se pojavljuje u dva oksidacijska stanja, u obliku iona Fe^{2+} i Fe^{3+} . Soli dvovalentnog željeza (Fe^{2+}) su zelene boje i lako topljive u vodi, dok su soli trovalentnog željeza (Fe^{3+}) crvene ili smeđe boje i teško se otapaju u vodi (Raos, 2008). Velika razlika u redoks potencijalu između željezovih iona pridonosi ulozi željeza kao bitnog biološkog metala (Miethke i Marahiel, 2007.).

U Zemljinoj kori se nalazi oko 5% željeza, najčešće u obliku primarnog oksida hematit (Fe_2O_3), imnenit ($FeTiO_3$) i magnetit (Fe_3O_4). U sedimentima se nalazi u obliku Fe-oksida i siderita ($FeCO_3$) (Mengel i Kirkby, 1987). S obzirom na njegovu dostupnost u tlu, topivost u vodi mu je slaba. Topiv je u obliku Fe^{2+} , Fe^{3+} i $FeOH^{2+}$. Na tlima sa dobrim vodozračnim režimom količine Fe^{2+} su vrlo niske. Željezni ion Fe^{2+} ima dominantnu ulogu na tlima s visokom pH vrijednošću (Mengel i Kirkby, 1987). U zbijenim tlima sa slabom aeracijom tla, odnos između iona željeza Fe^{3+} i Fe^{2+} predstavlja važan parametar za procjenu pogodnosti rasta biljaka. Na ovakvim tlima dolazi do procesa redukcije u kojem se različiti oblici Fe oksida reduciraju u Fe^{2+} oblik. Zbog specifičnosti procesa redukcije i utroška H^+ iona povisuje se pH vrijednost tla (Mengel i Kirkby, 1987.). Karbonatna tla sadrže veće količine željeza, ali vrlo malo u pristupačnom obliku za biljke. Zbog visokih pH na karbonatnim tlima, dolazi do intenzivne tvorbe željeznih spojeva, $Fe(OH)^{2+}$, $Fe(OH)^3$ i $Fe(OH)^4$, koji su slabo topivi u tlu što je razlog slabe opskrbljenosti biljaka željezom.

Najslabija topivost Fe je pri pH vrijednosti od 7,4 - 8,5 (Mengel i Kirkby, 1987.). Prema Marchneru biljke prema osjetljivosti na nedostatak Fe možemo podijeliti na dvije skupine:

1. Fe neučinkovite – biljke koje su jako osjetljive na nedostatak željeza
2. Fe učinkovite – biljke iz porodica trava, kod kojih se rijetko javljaju simptomi nedostatka Fe

Biljke iz porodica trava ili „Fe učinkovite“ fiziološkim procesima osiguravaju potrebnu količinu željeza čak i u uvjetima izrazitog nedostatka Fe (Mengel i Kirkby, 1987). Pokretljivost željeza u biljci je vrlo slaba. Prvi nedostatak željeza na biljci se uočava na lišću, koje se željezom opskrbljuje preko ksilemskog toka. Željezo se većinom u biljkama nalazi u obliku Fe-citrata. Važno je za nastanak klorofila, a osim toga sudjeluje u radu različitih enzima: peroksidaze, citokromoksidaze, katalaze i raznih citokom enzima (Mengel i Kirkby, 1987). Željezo se u biljka nalazi u obliku Fe-fosfo-proteina koji služi kao zaliha Fe (Mengel i Kirkby, 1987.). Optimalna opskrbljenost vinove loze Fe iznosi 100 - 200 mg kg⁻¹, dok se simptomi nedostatka uočavaju pri količinama nižim od 50 mg kg⁻¹. Toksičnost Fe se rijetko javlja, a uglavnom su to količine preko 500 mg kg⁻¹ (Jackson, 2000). Siderofore su molekule koje imaju veliku ulogu u opskrbi biljke željezom iz tla. To su organske molekule koje tvore kompleksni spoj s ionima Fe te ga tako čine puno pristupačnijim biljkama i mikroorganizmima (Powel i sur., 1983). Korijenov sustav biljaka je vrlo važan za usvajanje Fe jer ga biljke mogu usvajati samo sa vršnim zonama korijenove dlačice (Clarkson i Sanderson, 1978).

2.5. Uloga cinka (Zn) u tlu i biljkama

Cink je kemijski element 12.-te skupine periodnog sustava elemenata. Ima tendenciju stvaranja stabilnih kovalentnih spojeva s kisikom i dušikom. Amfoteran je i otapa se u kiselinama i jakim lužinama. Dobar je vodič električne energije. U prirodi se nalazi u elementarnom stanju. Upotrebljava se za proizvodnju limova, cijevi, žica, dijelova motornih vozila, strojeva, kućanskih aparata, za zaštitu metala od korozije. U spojevima je dvovalentan. Mnogi cinkovi spojevi su otrovni, ali je neophodan za život biljaka, životinja i ljudi.

Cink u tlu nastaje razgradnjom primarnih i sekundarnih minerala. Veće količine cinka se nalaze u alkalnim matičnim stijenama poput bazalta, dok je u kiselim matičnim stijenama

poput granita i gnajsa količina cinka dosta manja. U tlu se prosječno nalazi u koncentraciji od 10 - 300 mg kg⁻¹ ukupnog Zn (Mengel i Kirkby, 1987.). Biljka ga iz tla usvaja u obliku kationa (Zn²⁺, ZnCl⁺, (ZnNH₃)₄²⁺, Zn(OH)²⁺) ili u obliku Zn-kelata. Usvajanje cinka iz tla je aktivan proces pri čemu je posebno izražen antagonizam prema dvovalentnim zemnoalkalijskim kationima (Mg²⁺ i Ca²⁺). Na otežano usvajanje cinka iz tla utječu niske temperature tla i visoke količine fosfora u tlu. Veliki nedostatak cinka se javlja na glinastim i karbonatnim tlima (Gluhic i Deklic, 2018.). Vrijednost pH utječe na količinu cinka koju biljka može usvojiti. Da bi se biljka mogla opskrbiti potrebnom količinom cinka koncentracija vodene otopine tla morala bi porasti 100 puta za svaku jedinicu porasta pH vrijednosti tla. Na dostupnost cinka u tlu utječe i količina organske tvari u tlu. Oba oblika cinka (topivi i netopivi) s organskom tvari čine različite kompleksne spojeve. Oko 60% topivog cinka nalazi se u kompleksnim spojevima s organskom tvari (Hodgson i sur., 1966.). Topivi cink čini organske spojeve s amino i fulvo kiselinama, a netopivi kompleksne spojeve s huminskim kiselinama (Stevenson i Ardakani, 1972.). Oko 95 % ukupnog cinka iz tla se usvaja procesom difuzije, te je nedostatak cinka vrlo čest na zbijenim, neprozračnim tlima gdje je mogućnost rasta korijena ograničena (Elgawhary i sur., 1970.).

Cink je esencijalni biljni hranjivi element. Sudjeluje u razvoju reproduktivnih dijelova biljke i u više metaboličkih procesa. Aktivator je velikog broja enzima kao što su fruktoza 1,6 bifosfat aldolaza u biljci koji ima značajnu ulogu u sintezi ugljikohidrata. Kod nedostatka cinka dolazi do smanjenja aktivnosti enzima fruktoza 1,6 bifosfat aldolaze. Količina cinka u biljci ovisi o biljnoj vrsti. Koncentracije cinka u biljci kreću se od 0,6 - 83 mg kg⁻¹. Pokretljivost cinka u biljkama je osrednja. U većim količinama se taloži u korijenu biljke za vrijeme velikih gnojidbi putem tla te se sporo translocira prema ostalim dijelovima biljke (Giordano i sur., 1974.). Cink povećava otpornost biljaka na bolesti, na sušu, te povećava otpornost na niske temperature (Fregoni, 1981.). Simptome nedostatka cinka se mogu uočiti u pojavi međulisne kloroze lista, sitnolisnatosti i smanjenju rasta zbog skraćivanja internodija (Gluhic i Deklic, 2018.). Nedostatak cinka se većinom javlja u vrijeme proljeća, u vrijeme niskih temperatura i visoke vlažnosti tla i zraka (Fregoni, 1981.). Suvišak cinka je rijetka pojava i većinom se javlja na kiselim tlima ili područjima koja trpe velika onečišćenja cinkom iz industrijskih postrojenja (Sauerbeck, 1982.). Na tlima s većim količinama cinka dolazi do smanjenog usvajanja fosfora i željeza.

2.6. Uloga magnezija (Mg) u tlu i biljkama

Magnezij je kemijski element koji spada u skupinu zemnoalkalnih metala, atomskog broja 12 i atomske mase 24,3050. Otkrio ga je sir. Humphry Davy godine 1808. Topiv je samo u vrućoj vodi i ne reagira burno. Dobro je topiv u kiselinama osim u fluorovodičnoj i koncentriranoj sumpornoj kiselini, nije topiv u lužinama. Vrlo je rasprostranjen i u prirodi ga ne možemo naći u elementarnom stanju već u spojevima, najčešće u obliku oksida. Sastavni je dio mnogih minerala i silikatnih stijena. U biljkama je bitan sastojak klorofila. U prirodnim vodama ga ima u velikim količinama u obliku iona Mg^{2+} , u štasfurtskim solima koje su nastale taloženjem iz nekadašnjeg mora.

Magnezij je bitan element za rast i razvoj biljke. Dostupnost Mg biljkama ovisi o različitim čimbenicima: o distribuciji i kemijskim svojstvima stijenskog materijala, klimatskim i antropogenim čimbenicima, ovisi o vrsti uzgajane vrste i plodoredu, mineralnoj gnojidbi (Mikkelsen, 2010.; Scheffer i Schachtschabel, 2002.). Magnezij je osmi najzastupljeniji mineral na Zemlji (Maguire i Cowan, 2002.). Potječe iz stijena koje sadrže razne vrste silikata. Sadržaj Mg u različitim tipovima silikata znatno varira. Razlog toga je što se unutar silikata ion Al^{3+} zamjenjuje za Mg^{2+} . Zbog velike varijacije Mg u silikatima sadržaj magnezija u tlu se kreće između 0,05 i 0,5 % (Grimme, 1991.; Maguire i Cowan, 2002.). Veće količine Mg se nalaze na glinastim i muljevitim tlima, dok se nedostatak Mg uočava na pjeskovitim tlima. U ekstremnim slučajevima, u tlima s visokim udjelom silikata osiromašenih magnezijevim kloritom može doći do fiksacije magnezija (Papenuß i Schlichting, 1979.; Scheffer i Schachtschabel, 2002.). Magnezij vezan u slojevima silikata nije mobilan i otpušta se samo u pokretne frakcije kroz proces trošenja, što se smatra dugotrajnim i sporim procesom. U izmijenjenom obliku zauzima 20 % adsorpcijskog kompleksa tla, a povoljan je sadržaj između 5 – 15 % KIK-a. U vodenoj fazi tla se nalazi u malim količinama u obliku iona Mg^{2+} (Vukadinović i Vukadinović, 2011.). Osim u silikatima, magnezij se nalazi i u sekundarnim mineralima gline zajedno s organskom tvari tla koji predstavljaju aktivnu frakciju tla. Te čestice gline ponašaju se kao koloidi negativnog naboja, te mogu apsorbirati katione kao i organska tvar. Magnezij ima veću mobilnost u tlu od kalcija, kalija i natrija, njegov je hidratizirani radijus veći. Zbog slabog vezanja magnezija za koloide tla, veće koncentracije magnezija završavaju u otopini tla. Ovo dovodi do negativnih posljedica na njegovu mobilnost u tlu i ishranu bilja (Gransee i Fuhrs, 2013.).

Osim njegovog udjela u sastavu klorofila, u biljkama magnezij ima važnu ulogu u funkciji ribosoma, i prijenosu energije (Kastori, 1983.). Usvajanje magnezija se povezuje s pojmom antagonizam K - Mg ili proces kod kojeg dolazi do kompeticije kationa i vrlo je česta pojava na neizbalansiranim tlima. Na primjer na tlima koja su dobro opskrbljena kalcijem, kalijem i manganom došlo je do smanjenja dostupnog magnezija (Gransee i Fuhrs, 2013.). Na pokretljivost magnezija u tlu veliki utjecaj ima kalcij. Smatra se da imaju dosta sličnosti poput nakupljanja u starijim listovima i u akropetalnom pravcu premješta pretežno transpiracijskim tokom. Za razliku od kalcija, magnezij je pokretljiviji i dobro se kreće i kroz floem. Zbog toga je veća zastupljenost magnezija u plodovima nego kalcija. Kod nedostatka magnezija biljka ga premješta iz korijena u mlađe organe, zbog toga procesa nedostatak Mg se prvo primijeti na starijem lišću (Kastori, 1983.). List prvo poprimi narančastu boju, zatim crvenu, pa ljubičastu, a nakon toga dijelovi lista prelaze u nekrotične površine, dok su žile i dalje zelene boje. Deficit magnezija utječe na sintezu klorofila, intenzitet fotosinteze i sintezu proteina. Uočava se i povećano nakupljanje saharoze u listovima jer nedostatak magnezija djeluje negativno na transport saharoze putem floema (Cakmak i Yazici, 2010.). Suvišak magnezija dovodi do smanjena koncentracije kalcija i kalija u biljci (Kastori, 1983.).

2.7. Uloga kalcija (Ca) u tlu i biljkama

Kalcij je kemijski element koji spada u skupinu zemnoalkalnih metala. Ima sposobnost izgradnje kompleksnih spojeva kao što su primarni minerali silicija, sekundarni minerali kalcija, dolomit ($\text{CaCO}_3 \times \text{MgCO}_3$), kalcit (CaCO_3) i gips ($\text{CaSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$) te različiti kalcijevi fosfati. Ovi spojevi predstavljaju glavne izvore kalcija u tlu. Njihovom se razgradnjom oslobađa kalcij koji sudjeluje u izgradnji novih sekundarnih minerala (Vukadinović i Vukadinović, 2011.). Kalcij sudjeluje u procesima fotosinteze, zaštite biljke od toksičnog djelovanja suviška pojedinih elemenata, smanjenju hidratiziranosti protoplazme, disanja (Vukadinović i Vukadinović, 2011.).

Kalcij se u tlu većinom nalazi u obliku kationa Ca^{2+} , te je najviše zastupljen na adsorpcijskom kompleksu, dok se u vodenoj fazi tla nalazi u malim količinama (Vukadinović i Vukadinović, 2011.). Na karbonatnim tlima se kalcij u većim količinama nalazi u obliku kalcijevih karbonata (CaCO_3), te njegova prisutnost može utjecati na raspoloživost dušika, fosfora, magnezija, kalija, bakra, mangana, cinka i željeza. Pri niskim

pH vrijednostima dolazi do nedostatka kalcija, te se zbog toga primjenjuje agrotehnička mjera kalcizacije pri čemu se povećava vrijednost pH tla (Vukadinović i Vukadinović, 2011.). Kalcizacijom se ne povećava samo pH vrijednost tla nego i dostupnost drugih elemenata poput fosfora, željeza, bora, bakra, cinka i mangana (Vukadinović i Vukadinović, 2011.). Potrebna količina materijala za kalcizaciju se izračunava pomoću hidrolitičke kiselosti. Najčešći materijali koji se koriste za kalcizaciju su: lapor, dolomit, kalcijev karbonat, saturacijski mulj iz šećera. Kalcizaciju treba provoditi s velikim oprezom jer ima veliki utjecaj na promjene u tlu posebice dostupnost hraniva (Vukadinović i Vukadinović, 2011.). U procesima nitrifikacije, amonifikacije, biološke fiksacije dušika i oksidacije sumpora kalcij ima pozitivan utjecaj. Kalcij ima važan utjecaj na strukturu tla i zajedno sa humusnim tvarima omogućuje vezanje čestica tla u strukturne agregate. Tim se procesom poboljšava vodozračni režim tla, biogenost tla i oksido-redukcijski procesi (Vukadinović i Vukadinović, 2011.).

Biljke kalcij usvajaju u obliku dvovalentnog kationa Ca^{2+} aktivnom zonom korijena. Smatra se da je usvajanje kalcija starijim vakuoliziranim stanicama aktivan, a meristemskim stanicama pasivan proces (Vukadinović i Vukadinović, 2011.). Kalcij se nalazi u mnogim staničnim organelama kao što su kloroplasti, ribosomi, mitohondriji i drugi (Kastori, 1983.). Biljke usvajaju kalcij iz otopine tla i prenose ga pomoću ksilema. Kad kalcij prolaziti kroz citoplazmu stanica koje su povezane plazmodezmom taj proces se naziva put po simplastu, a kad prolazi između stanica se naziva putem po apoplastu. Uloga ovih dvaju puteva u transportu kalcija do ksilema još uvijek nije poznat, ali omogućuju stanicama korijena usvajanje Ca^{2+} te kontrolu količine ulaska kalcija do ksilema i sprječavaju nakupljanje toksičnih kationa u nadzemnom dijelu biljke (White i Broadley, 2003.). Sklonost ili afinitet korijena biljke prema kalciju je manja u odnosu na druge elemente (Kastori, 1983.). Kalcij je u biljci slabo pokretan. Pokretljivost kalcija je bolja prema korijenu, nego prema vrhu stabljike. Zbog njegove slabe pokretljivosti unutar biljke novoformirani organi opskrbljuju se kalcijem isključivo iz otopine tla. Reutilizacija kalcija iz starijih u mlađe novoformirane organe moguća je samo iz stabljike i korijena, dok je kalcij u starijim listovima nepokretljiv te se time objašnjava nakupljanje istoga u starijim listovima (Kastori, 1983.). Kalcij ima važnu ulogu u stanici biljaka. Sastavni je dio kalcij - pektinata koji se nalaze u staničnoj stijenci i na taj način ima važnu ulogu u strukturi stanice. Kalcij ima veliku ulogu u regulaciji propusnosti stanične membrane, jer se izostankom kalcija propusnost membrane povećava, dolazi do prolaska različitih tvari i

iona koje dovode do negativnih posljedica. Nedostatak kalcija prvo zahvaća stanice parenhimskog tkiva, jer pektinaza izlazi iz stanice i razlaže se središnja lamela. Na taj način dolazi do autolize stanice i tkivo poprima tamnu boju (Kastori, 1983.). Nedostatkom kalcija u fotosintezi dolazi do narušavanja lamelarnog sustava kloroplasta, te za posljedicu ima smanjenje fotosinteze. Kalcij nema utjecaj na usvajanje CO₂, cikličnu i necikličnu sintezu ATP u izoliranim kloroplastima, niti na disanje u mraku. Nedostatak kalcija u listovima dovodi do povećanja koncentracije natrija. Ima neznatnu ulogu u aktivaciji enzima (Kastori, 1983.). Deficit kalcija možemo uočiti na mladom lišću, sporijem razvoju korijenovog sustava i biljke. Pri dužem nedostatku kalcija pojavljuje se nekroza na mladom lišću. Kod voća i povrća nedostatak kalcija se prvo uočava na plodovima tek onda na lišću (Simon, 1977.). Suvišak kalcija još uvijek nije dovoljno istražen, ali smatra se da pri njegovoj pojavi dolazi do smanjenog usvajanja svih biogenih elemenata (Vukadinović i Vukadinović, 2011.).

2.8. Uloga kalija (K) u tlu i biljkama

Kalij je kemijski element atomskog broja 19 i atomske mase 39,0983. Simbol mu je K. Spada u skupinu alkalijskih metala i sedmi je najzastupljeniji element u Zemljinoj kori. Kalij je esencijalni makroelement koji je potreban svim živim organizmima. Sastavni je dio mnogih stijena i silikata u obliku alumosilikata, kalcijeva klorida, soli sa magnezijem i kalcijem. Po teksturi se smatra mekanim alkalijskim metalom, može se rezati nožem. Uz litij, metal je najmanje gustoće i reaktivniji je od natrija. Njegovu ulogu u rastu i razvoju biljaka prvi je prepoznao Liebig 1841. godine. U biljkama i tlu nalazi se u obliku jednovalentnog kationa s redukcijским svojstvima.

Sadržaj kalija u tlima je veoma promjenjiv i kreće se od 0,5 - 2,5 %, a potječe iz primarnih minerala čijim se raspadanjem oslobođeni kalij odmah veže za adsorpcijski kompleks. Pokretljivost kalija u tlu je vrlo niska, te ne postoji opasnost od ispiranja osim na pjeskovitim i lakšim tlima (Vukadinović i Vukadinović, 2011.). Raspoloživost kalija povezana je sa procesima adsorpcije i desorpcije pri čemu i drugi kationi utječu na nju. Budući da pristupačnost izmjenjivih kationa ovisi o njihovoj koncentraciji u vodenoj fazi tla, dostupnost kalija određena je njihovom pristupačnom količinom (Vukadinović i Vukadinović, 2011.). Čvrsto vezivanje kalija za specifične lokacije nekih glinenih minerala naziva se fiksacija i utječe na usvajanje kalija i učinak K-gnojidbe (Vukadinović i

Vukadinović, 2011.). Kalij koji se nalazi u vodenoj fazi tla i izmjenjivo je vezan na vanjskim površinama minerala gline se smatra potpuno pristupačnim za ishranu bilja. Postoje četiri različita izvora kalija u tlu. Najveća komponenta čini 90 - 98 % ukupnog kalija u tlu i sastoji se od minerala tla kao što su feldspat i glina. Veoma mala količina kalija iz ovog izvora je dostupna biljkama za usvajanje. Drugi izvor kalija je neizmjenjivi kalij i povezan je sa mineralima gline (2:1). Smatra se rezervnim izvorom kalija u tlu. Treći izvor kalija u tlu čini izmjenjiv ili lako dostupan kalij i nalazi se na mjestima kationske izmjene ili u otopini tla (Vukadinović i Vukadinović, 2011.). Kalij iz otopine tla lako se preuzima u korijenov sustav, a zatim se nadomješta na mjestima izmjene. Četvrti izvor kalija u tlu je kalij koji se nalazi u organskim tvarima i unutar mikrobnog populacije tla. Ovaj izvor daje vrlo male količine kalija potrebnog biljkama za rast (Slavik, 1974.). Koncentracija kalija značajno varira i ovisi o vrsti usjeva, godini, lokaciji i gnojidbi (Zorb i sur, 2014.). Biljke koje su dobro opskrbljene kalijem tijekom rasta bolje će podnositi stres izazvan vanjskim utjecajima (Zorb i sur., 2014.). Dovoljna količina kalija dovodi do smanjena potrošnje vode za sintezu suhe tvari, dok nedostatak dovodi do bržeg gubljenja turgora i manje otpornosti na sušu (Jug i sur, 2008.).

2.9. Uloga mangana (Mn) u tlu i biljkama

Mangan je kemijski element rednog broja 25 i atomske mase 54,94. Označava se simbolom Mn. Nalazi se u 7. skupini periodnog sustava elemenata. Elementarni mangan otkrio je švedski kemičar C.W. Scheele u Stockholmu 1774. godine, a izolirao ga je J. Gahn. Mangan je srebrno sive do bijele boje, te je tvrda i krta kovina. Poznato je dvadeset izotopa mangana, a samo je ^{55}Mn stabilan i javlja se u prirodi. Jedan je od 5 najvažnijih oligoelemenata i prijeko je potreban za rast i razvoj živih organizama. U većim količinama je otrovan.

Mangan je teški metal koji se u biljkama nalazi u obliku kationa Mn^{2+} i Mn^{3+} , a u tlu i kao Mn^{4+} i Mn^{6+} . Nalazi se u velikom broju minerala, ali najvećim dijelom u tlu potječe iz MnO_2 (Vukadinović i Vukadinović, 2011.). Po rasprostranjenosti u litosferi zauzima deseto mjesto. Ukupan sadržaj mangana u tlu iznosi 200 - 3000 ppm, a od toga je 0,1-1,0 % dostupno biljkama za usvajanje. Raspoloživost mangana raste povećanjem kiselosti tla i njegove redukcije do Mn^{2+} . Biljke lako usvajaju mangan u obliku vodotopljivog Mn^{2+} i izmjenjivo sorbiranog Mn^{2+} , te lako reducirajućeg MnO(OH) (Vukadinović i Vukadinović,

2011.). Nedostatak Mn česta je pojava na organskim tlima sa visokim pH, pjeskovitim tlima sa niskom količinom organske tvari i na tlima na kojima je provođena kalcifikacija. Povećanjem vlažnosti tla dostupnost Mn se povećava (Gluhić, 2013.). Sadržaj mangana u biljkama ovisi o biljnoj vrsti. Mangan ima veliku ulogu u oksido-redukcijskim procesima, sastavni je dio enzima i aktivator karboksilaza, enolaza i drugih enzima. Vrlo važnu ulogu ima u fotosintetskom transportu elektrona fotosustava 2 u procesu fotooksidacije vode (Vukadinović i Vukadinović, 2011.). Značajan je za ekonomičnije iskorištavanje hraniva u tlu jer dobrom raspoloživošću mangana se smanjuje potreba za N, P, K, i Ca bez negativnog utjecaja na prinos. Pokretljivost Mn u biljkama je minimalna. U biljkama se prosječno nalazi u koncentraciji od 5 - 250 ppm. Smatra se da je kritična granica nedostatka mangana 10 - 20 ppm u suhoj tvari, a akutan nedostatak nastupa kad je količina Mn manja od 10 ppm. Simptomi nedostatka mangana pojavljuju se kao mrkožute mrlje na lišću dikotiledona. Otrovnost mangana javlja se kada je količina Mn u tlu veća od 1000 ppm, najčešće u vrlo kiselim tlima i očituje se pojavom smeđih mrlja na starijem lišću (Vukadinović i Vukadinović, 2011.).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Položaj vinograda i klimatski uvjeti

Pokus je proveden na vinogradskom području Baranje koje pripada Vinogradskoj regiji Slavonije i hrvatskog Podunavlja. Vinogorje Baranja spada u podregiju hrvatskog Podunavlja i obuhvaća Beli Manastir, Kneževe Vinograde, Popovac, Draž, Čeminac, Jagodnjak, Bilje, Petlovac i Dardu (NN, 76/2019). Vinogorje Baranja poznato je po dugogodišnjoj tradiciji uzgoja grožđa i proizvodnje vina. Izrazito je ravničarski kraj, kojeg sa sjevera nadvisuje brdo "Banska kosa" (241 m) i idealan je za uzgoj vinove loze. Smatra se jednim od najkvalitetnijih vinogradarskih položaja i pruža se u pravcu jugozapad-sjeveroistok između Belog Manastira i Batine (Predojević, 2016.). Odlikuje se iznimno plodnim tlom, pogodnim za uzgoj kvalitetnog grožđa te proizvodnju vina sa zaštićenom oznakom izvornosti ili zemljopisnog podrijetla. U Baranjskom području se nalaze bogata crna tla koja sadrže žute porozne sedimente uzrokovane vjetrovima koji pušu s Dunava i stvaraju povoljne uvjete za uzgoj vinove loze. Blaga padina Banske kose okrenuta ka jugu štiti vinograde od jakih sjevernih vjetrova i osigurava dobru osunčanost svakog grozda (vinacroatia.hr).

Klima ovog područja svrstava se u umjereno kontinentalnu. Srednja godišnja temperatura iznosi oko 11,2°C, a u tijeku vegetacije srednja temperatura iznosi oko 18,6°C. Suma efektivnih temperatura u vegetacijskom periodu (IV. – X. mjeseca) iznosi oko 1550 °C. U tijeku godine padne od oko 650 do 690 mm oborina ravnomjerno raspoređenih tijekom cijele godine.

3.2. Sorta Regent

Sorta vinove loze Regent je nastala međuvrsnim križanjem 1967. godine na Institutu za oplemenjivanje vinove loze u Geilweilerhofu u Njemačkoj. Veliku ulogu u stvaranju sorte imao je prof. Gerhard Alleweldt. Regent je dobiven križanjem sorte Diana i Chamburcine. Izbor tog roditeljskog para možemo pripisati njihovom podrijetlu. Sorta vinove loze Diana nastala je križanjem sorata Silvanac i Muller – Thurgau koje svrstavamo među važnije bijele sorte u Njemačkoj. Sorta vinove loze Chamburchin je nastala u Francuskoj međuvrsnim križanjem. Odlikuje se visokom otpornošću na plamenjaču i pepelnicu. Sorta vinove loze Regent postala je priznata kao nova sorta 1994. godine, te 1996. postaje preporučena sorta za proizvodnju kvalitetnih vina u svim vinogradarskim regijama

Njemačke. Zbog dobrih uzgojnih svojstava i visoke kakvoće vina jedna je od rijetkih sorti križanaca koja se širi u proizvodnji. Najzastupljenija je u Njemačkoj, a sadi se i u Velikoj Britaniji i hladnijim područjima SAD-a. Sorta vinove loze Regent pokazuje veliku otpornost na vinske bolesti. Najveću otpornost pokazuje prema plamenjači, pa se zaštita protiv te bolesti u većini godina može izostaviti. Dobro podnosi niske zimske temperature, pa se sve više širi u hladnijim vinogradarskim regijama. Rano dozrijeva, prinosi su joj osrednji, a kiselost je umjerena (Agroklub, 2010.).



Slika 1. Regent (A.Šinko)

U Hrvatskoj je sorta u fazi ispitivanja. Veliku zainteresiranost za nju pokazuju ekološki proizvođači (Agroklub, 2010.). Sorta vinove loze Regent je srednje veličine, grane su joj jake i široke. Listovi su peterokrlni, na rubovima nazubljeni, boja im je zelena sa svijetlo žutim žilama, mogu biti srednje ili velike veličine. Grozdovi nisu veliki, u prosjeku teže oko 160-185 grama, umjerene gustoće, cilindrično - stožasti. Bobice su zaobljene, tamnoplave boje, teže oko jedan i pol gram. Pulpa je sočna, bogatog okusa. Dobiveno vino

ove sorte je intenzivne boje. Bobice dobro čuvaju šećer. Zrelo grožđe sadrži do 22 % udjela šećera.



Slika 2. Trsovi sorte Regent (A.Šinko)

3.3. Postavljanje pokusa

Istraživanje utjecaja biofortifikacije selenom provedeno je u vinogorju Baranja na sorti vinove loze Regent koja je posađena 2013. godine na podlozi SO4. Vinograd je zasaden s međurednim razmakom od 3 metra i razmakom sadnje unutar reda 0,75 metara. Za uzgojni oblik odabran je Guyot s jednim prigojnim reznikom s dva pupa i jednim lucnjem s 9 pupova. Provedene su sve redovne agrotehničke i ampelotehničke mjere tijekom vegetacije. Pokus je proveden s jednim tretmanom koji je imao tri razine u četiri ponavljanja po sasvim slučajnom planu. U kontrolnom tretmanu provedeno je folijarno tretiranje s destiliranom vodom i okvašivačem u istoj količini kao i kod ostala dva tretmana. Za pripremu otopina potrebnu za provođenje biofortifikacije korišten je Se u obliku natrijevog selenata Na_2SeO_4 , a kao okvašivač je korišten Tween 20 prema uputama

proizvođača. Primijenjeni tretmani, koncentracija Se (g Se ha^{-1}) i vrijeme folijarne aplikacije prikazani su u Tablici 1. Prikupljanje uzoraka provedeno je 13. rujna 2021. godine, po postizanju tehnološke zrelosti.

Tablica 1. Koncentracija i vrijeme primjene tretmana

| | Na_2SeO_4 | Vrijeme primjene |
|--------------------|---------------------------|---|
| Kontrola | 0 g Se ha^{-1} | Prije cvatnje/prije cvatnje i u fazi šare |
| Biofortifikacija 1 | 5 g Se ha^{-1} | Prije cvatnje |
| Biofortifikacija 2 | 5 g Se ha^{-1} | Prije cvatnje i u fazi šare |

3.4. Priprema uzoraka mošta i vina

Tijekom berbe sorte vinove loze Regent uzeto je 12 uzoraka koji su odvojeni u zasebne kašete. Iz svakog uzorka odvojeno je 5 kilograma grožđa, te je uklonjena sva peteljkovina s grozdova. Svaki uzorak je zdrobljen i stavljen u posebni demižon.



Slika 3. Odvajanje uzoraka u demižone (A.Šinko)

Pomoću šprice iz svakog demižona je izvađen uzorak mošta i pohranjen u posebne posudice. Svaka posudica je imala svoj broj uzorka kako ne bi došlo do miješanja. Nakon uzimanja uzorka mošta, u svaki demižon je dodan je kvasac ICV D21.



Slika 4. Uzimanje uzoraka mošta (A.Šinko)

3.5. Simulacija probave *in vitro*

U provedenom istraživanju za simulaciju probave *in vitro* korištena je metoda po Minekusu (2014.). Metoda je modificirana i prilagođena tekućim uzorcima te je provedena u dvije faze, simulacije probave u ustima i simulacije probave u tankom crijevu. U Tablici 2. su prikazane kemikalije korištene za pripremu otopina koje simuliraju želučani i crijevni sok prema Minekus-ovoj metodi.

Tablica 2. Količina otopina potrebnih za pripremu želučanih i crijevnih otopina za 12 uzoraka.

| | Količina (g) | Volumen (mL) | SGF ¹ (125mL) | SIF ² (225mL) |
|---|--------------|--------------|---|---|
| KCl | 1,119 | 30 | 2,16 | 3,83 |
| KH ₂ PO ₄ | 0,340 | 5 | 0,28 | 0,45 |
| NaHCO ₃ | 5,040 | 60 | 3,91 | 23,91 |
| NaCl | 4,680 | 40 | 3,69 | 5,40 |
| MgCl(H ₂ O) ₆ | 0,153 | 5 | 0,13 | 0,62 |
| (NH ₄) ₂ CO ₃ | 0,048 | 1 | 0,16 | 0,00 |
| NaOH | 1,999 | 50 | - | - |
| HCl | 12,49 ml | 25 | 0,41 | 0,39 |
| | | | +H ₂ O do 125 ml 114,25 ml H ₂ O | +H ₂ O do 225 ml 190,41 ml H ₂ O |
| CaCl ₂ (H ₂ O) | 0,0882 | 2 | - | - |

¹SGF- Simulated gastric fluid (Simulirana želučana tekućina)

²SIF- Simulated intestinal fluid (Simulirana crijevna tekućina)

Za pripremu uzoraka korištene su Falcon epruvete od 50 ml. Prvo je uliveno 7 ml uzorka, zatim pufer koji simulira želučanu tekućinu (SGF), pepsin, CaCl_2 , HCl i destilirana voda. Kako bi simulacija bila uspješna pH mora biti oko 3 jer je pH želuca veoma nizak.

Nakon pripreme uzoraka za prvu fazu, uzorci su stavljeni u vodenu kupelj na 2 sata pri brzini treskanja od 190 okretaja, na temperaturu od $37\text{ }^\circ\text{C}$ jer ona predstavlja temperaturu tijela. Nakon sat vremena inkubacije u uzorcima je izmjeren pH čija se vrijednost kretala oko 3,0. Nakon završetka prve inkubacije u uzorke se nadodao pufer koji predstavlja otopinu crijevnih sokova (SIF), CaCl_2 te otopine pankreatina i žuči. Vrijednost pH se podizala na $6,0 \pm 0,25$ kako bi se žuč i pankreatin mogli aktivirati. Nakon toga, uzorci su vraćeni u vodenu kupelj na 2 sata pri temperaturi od $37\text{ }^\circ\text{C}$ i brzini treskanja od 190 okretaja. Nakon završetka druge inkubacije uzorci su stavljeni na led 5 minuta, zatim su premješteni u centrifugu na 15 minuta pri temperaturi od $4\text{ }^\circ\text{C}$ i 4000 rpm da bi se odvojio talog od čiste tekućine. Kad je centrifugiranje završilo, uzorci su obrisani i preliveni u Falcon epruvete od 15 ml i pohranjeni u zamrzivaču na $-80\text{ }^\circ\text{C}$.



Slika 5. Uzorci u vodenoj kupelji (A.Šinko)

3.6. Određivanje koncentracije K, Ca, Mg, Fe, Zn i Se u moštu i vinu

Razaranje uzoraka rađeno je prema metodi mokrog razaranja. Tijekom procesa pripreme uzoraka u kivete je dodano 2 ml tekućeg uzorka i 6 ml 65% HNO₃ + 2 ml 30 % H₂O₂. Kao instrument za razaranje korišten je sustav za mikrovalnu digestiju (*eng. Microwave Digestion System*) MARS 6 One Touch (CEM) (Slika 6.). Razaranje je provedeno pri temperaturi od 180 - 200 °C u trajanju od sat i pol uz hlađenje. Nakon završenog razaranja uzorci se preliveni epruvete od 50 ml i nadopunjene su destiliranom vodom do 30 ml volumena, te se protresu kako bi se uzorak homogenizirao.



Slika 6. MARS 6 One Touch (CEM) (A.Šinko)

Ukupne i bioraspoložive koncentracije elemenata u uzrocima mošta i vina izmjerene su pomoću ICP-OES i ICP-MS uređaja, a izražene su u mg kg⁻¹ ili μ kg⁻¹.

3.7. Statistička analiza podataka

Statistička analiza podataka napravljena je pomoću programa SAS Enterprise Guide 9.4 2 Copyright© 2016 by SAS Institute Inc., Cary, NC, USA. Za analizu dobivenih podataka korištene su sljedeće mjere opisne statistike: aritmetička sredina i standardna pogreška aritmetičke sredine. Utjecaj biofortifikacije na ukupne i bioraspoložive koncentracije ispitivanih elemenata utvrđen je pomoću jednofaktorijalne analize varijance. Razlike između srednjih vrijednosti ispitane su pomoću Tukeyevog HSD testa ($p < 0,05$).

4. REZULTATI

4.1. Ukupne koncentracije K, Ca i Mg (mg L⁻¹) u moštu i vinu

Za ukupne koncentracije Ca (df = 2; F = 0,11; p = 0,997) i Mg (df = 2; F = 0,3; p = 0,751) u moštu, kao i za ukupne koncentracije Ca (df = 2; F = 0,39; p = 0,685) i Mg (df = 2; F = 1,57; p = 0,261) u vinu nije utvrđen statistički značajan utjecaj biofortifikacije selenom. Prosječne koncentracije Ca u moštu nisu puno varirale između tretmana, a najviša koncentracija je zabilježena u kontroli (Tablica 5). Koncentracija magnezija u moštu najveća je u biofortifikaciji 1, i za 1,5% je veća od kontrolnog tretmana, te za 0,23% od biofortifikacije 2 (Tablica 3). Prosječne koncentracije Ca u vinu nisu značajno varirale između tretmana, a najveća je bila u biofortifikaciji 2. Ukupne koncentracije magnezija u vinu pokazuju silazni trend, odnosno najviša koncentracija Mg je utvrđena u kontroli, a najniža u biofortifikaciji 2 (Tablica 3).

Za ukupnu koncentracija K u moštu utvrđen je statistički značajan utjecaj biofortifikacije selenom (df = 2; F = 12,4; p = 0,0026). Najviša koncentracija K utvrđena je u kontroli, koja se statistički značajno razlikovala od biofortifikacije 1 (Tablica 3). Jednofaktorijalnom analizom varijance utvrđen je statistički značajan utjecaj biofortifikacije Se na ukupne koncentracije K u vinu (df = 2; F = 12,63; p = 0,0024). U biofortifikaciji 2 utvrđena je najviša koncentracija koje se značajno razlikovala od biofortifikacije 1 i kontrole (Tablica 3).

Tablica 3. Ukupne koncentracije K, Ca i Mg (mg L⁻¹) u moštu i vinu

| | Tretman | K (mg L ⁻¹) | Ca (mg L ⁻¹) | Mg (mg L ⁻¹) |
|------------------|--------------------|-----------------------------|--------------------------|--------------------------|
| M O Š T | Kontrola | 824,47 ± 6,65 ^{a*} | 76,49 ± 1,58 | 88,73 ± 1,46 |
| | Biofortifikacija 1 | 790,86 ± 3,41 ^b | 76,43 ± 6,23 | 90,08 ± 1,05 |
| | Biofortifikacija 2 | 808,81 ± 3,55 ^{ab} | 76,06 ± 4,18 | 89,87 ± 1,45 |
| V I N O | Kontrola | 1196,3 ± 4,90 ^b | 58,42 ± 2,97 | 104,03 ± 1,48 |
| | Biofortifikacija 1 | 1195,88 ± 5,82 ^b | 55,63 ± 4,65 | 101,98 ± 3,09 |
| | Biofortifikacija 2 | 1232,79 ± 6,98 ^a | 59,77 ± 1,84 | 98,99 ± 0,74 |

*srednje vrijednosti označene različitim slovima statistički se značajno razlikuju p < 0.05 prema (Tukey HSD)

4.2. Ukupne koncentracije Se ($\mu\text{g L}^{-1}$), Fe, Zn i Mn (mg L^{-1}) u moštu i vinu

Jednofaktorijalnom analizom varijance utvrđen je statistički značajan utjecaj biofortifikacije selenom na ukupne koncentracije Se u moštu ($df = 2$; $F = 8,92$; $p = 0,0073$) i u vinu ($df = 2$; $F = 8,1$; $p = 0,0097$). Najniža koncentracija selena u moštu zabilježena je u kontroli, a najviša pri biofortifikaciji 2. Statistički značajne razlike između srednjih vrijednosti Se u moštu utvrđene su između kontrole i biofortifikacije 2 te biofortifikacije 1 i biofortifikacije 2 (Tablica 4). Pri biofortifikaciji 1 došlo je do povećanja prosječne koncentracije selena za 73 % u odnosu na kontrolu, a pri biofortifikaciji 2 za 3,28 puta u odnosu na kontrolu (Tablica 4). Prosječna koncentracija selena u vinu povećava se pod utjecajem biofortifikacije. Najniža koncentracija je utvrđena u kontroli, a najviša pri biofortifikaciji 2, te su između njih utvrđene i statistički značajne razlike (Tablica 4).

Jednofaktorijalnom analizom varijance utvrđen je statistički značajan utjecaj biofortifikacije selenom na ukupne koncentracije Fe u moštu ($df = 2$; $F = 7,63$; $p = 0,011$), dok za koncentraciju u vinu ($df = 2$; $F = 4,18$; $p = 0,052$) nisu utvrđene statistički značajne razlike. Ukupna koncentracija Fe u vinu u biofortifikaciji 1 niža je za 17 % u odnosu na koncentraciju u kontroli i biofortifikaciji 2.

Tablica 4. Ukupne koncentracije Se ($\mu\text{g L}^{-1}$), Fe, Zn i Mn (mg L^{-1}) u moštu i vinu

| | Tretman | Se ($\mu\text{g L}^{-1}$) | Fe (mg L^{-1}) | Zn (mg L^{-1}) | Mn (mg L^{-1}) |
|------------------|--------------------|-----------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| M O Š T | Kontrola | $1,57 \pm 0,09^{b*}$ | $0,06 \pm 0,003^b$ | $0,70 \pm 0,04$ | $0,60 \pm 0,02$ |
| | Biofortifikacija 1 | $2,72 \pm 0,24^b$ | $0,06 \pm 0,006^b$ | $0,72 \pm 0,1$ | $0,58 \pm 0,03$ |
| | Biofortifikacija 2 | $5,16 \pm 1,03^a$ | $0,09 \pm 0,01^a$ | $0,76 \pm 0,09$ | $0,63 \pm 0,03$ |
| V I N O | Kontrola | $2,89 \pm 0,30^b$ | $0,88 \pm 0,05$ | $0,17 \pm 0,01$ | $0,99 \pm 0,03$ |
| | Biofortifikacija 1 | $4,63 \pm 0,69^{ab}$ | $0,75 \pm 0,03$ | $0,18 \pm 0,02$ | $1,01 \pm 0,03$ |
| | Biofortifikacija 2 | $7,04 \pm 1,02^a$ | $0,88 \pm 0,03$ | $0,15 \pm 0,03$ | $1,08 \pm 0,02$ |

*srednje vrijednosti označene različitim slovima statistički se značajno razlikuju $p < 0.05$ prema (Tukey HSD)

Ukupna koncentracija Zn u moštu ($df = 2$; $F = 0,15$; $p = 0,861$) i vinu ($df = 2$; $F = 0,65$; $p = 0,545$) nije bila pod značajnim utjecajem biofortifikacije selenom. U moštu, najniža koncentracija Zn je utvrđena u kontroli a najviša pri biofortifikaciji 2, dok je u vinu najniža koncentracija Zn utvrđena u biofortifikaciji 2.

Ukupna koncentracija Mn u moštu (df = 2; F = 0,61; p = 0,562) i vinu (df = 2; F = 2,76; p = 0,116) nije bila pod značajnim utjecajem biofortifikacije selenom. U moštu i u vinu najniža koncentracija Mn je utvrđena u kontroli, a najviša pri biofortifikaciji 2 (Tablica 4).

4.3. Bioraspoložive koncentracije K, Ca i Mg (mg L⁻¹) u moštu i vinu

Provedenom jednofaktorijalnom analizom varijance nije utvrđen značajan utjecaj na bioraspoložive koncentracije Ca (df = 2; F = 2,64; p = 0,125) i Mg (df = 2; F = 0,32; p = 0,736) u moštu.

Najveća koncentracija Ca u moštu zabilježena je u kontroli i bila je za 33 % viša u odnosu na koncentraciju Ca utvrđenu u biofortifikaciji 2.

Najveća koncentracija magnezija utvrđena je u biofortifikaciji 1 i bila je 3,6 % viša u odnosu na koncentraciju utvrđenu u kontroli, te za 3,5 % u odnosu na koncentraciju utvrđenu u biofortifikaciji 2 (Tablica 5).

Tablica 5. Bioraspoložive koncentracije K, Ca i Mg u moštu i vinu nakon simulacije probave *in vitro* (aritmetička sredina ± standardna pogreška aritmetičke sredine)

| | Tretman | K* (mg L ⁻¹) | Ca (mg L ⁻¹) | Mg (mg L ⁻¹) |
|------------------|--------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| M O Š T | Kontrola | | 9,35 ± 0,86 | 14,77 ± 0,65 |
| | Biofortifikacija 1 | | 9,30 ± 0,97 | 15,30 ± 1,43 |
| | Biofortifikacija 2 | | 7,00 ± 0,62 | 14,26 ± 0,29 |
| V I N O | Kontrola | 138,93 ± 1,87 | 18,2 ± 0,27 | 21,11 ± 0,36 |
| | Biofortifikacija 1 | 168,23 ± 7,97 | 17,62 ± 1,54 | 20,43 ± 1,3 |
| | Biofortifikacija 2 | 152,62 ± 16,41 | 19,2 ± 0,78 | 21,25 ± 0,32 |

*podatci o bioraspoloživim koncentracijama K nisu pravilno očitani, te iz tog razloga nisu analizirani

**srednje vrijednosti označene različitim slovima statistički se značajno razlikuju p < 0.05 prema (Tukey HSD)

Za bioraspoloživu koncentraciju K (df = 2; F = 1,92; p = 0,202), Ca (df = 2; F = 0,62; p = 0,559) i Mg (df = 2; F = 0,3; p = 0,074) u vinu nije utvrđena statistički značajan utjecaj biofortifikacije.

Najveća vrijednost K u vinu utvrđena je u biofortifikaciji 1 i bila je 21 % viša nego koncentracija utvrđena u kontroli.

Koncentracija Ca u vinu bila je najviša u biofortifikaciji 2, te je bila za 9 % viša od koncentracije u biofortifikaciji 1 te je 5,5 % viša nego u kontroli.

Najniža koncentracija Mg zabilježena je u biofortifikaciji 1 i bila je za 4 % niža nego koncentracija Mg u biofortifikaciji 2, koja je imala najvišu koncentraciju Mg.

4.4. Bioraspoložive koncentracije Se ($\mu\text{g L}^{-1}$), Fe, Zn i Mn (mg L^{-1}) u moštu i vinu

Koncentracija Se u moštu dobivenom iz biofortificiranog uzorka bila je 4,6 puta viša u odnosu na koncentraciju utvrđenu u kontroli (Tablica 6). Utvrđen je statistički značajan utjecaj biofortifikacije na bioraspoloživu koncentraciju Se u moštu ($df = 2$; $F = 9,33$; $p = 0,0064$), a statistički značajne razlike utvrđene su između kontrole i biofortifikacije 2, te biofortifikacije 1 i biofortifikacije 2 (Tablica 6).

Jednofaktorijalnom analizom varijance utvrđen je statistički značajan utjecaj biofortifikacije Se na bioraspoložive koncentracije Se u vinu ($df = 2$; $F = 9,88$; $p = 0,005$). Najniža koncentracija selena u vinu zabilježena je u kontroli i bila je 45 % niža u odnosu na koncentraciju Se utvrđenu u biofortifikaciji 2. Tukeyevim HSD testom utvrđene su statistički značajne razlike u srednjim vrijednostima između biofortifikacije 2 i kontrole, te biofortifikacije 2 i biofortifikacije 1 (Tablica 6).

Bioraspoloživa koncentracija Zn u moštu bila je pod statistički značajnim utjecajem biofortifikacije Se ($df = 2$; $F = 5,77$; $p = 0,024$). Statistički značajne razlike utvrđene su između biofortifikacije 1 i kontrole, koja je imala 33 % višu koncentraciju selena nego kontrolni uzorak (Tablica 4).

Za bioraspoložive koncentracije Fe u moštu ($df = 2$; $F = 3,46$; $p = 0,076$) i bioraspoložive koncentracije Fe u vinu ($df = 2$; $F = 0,05$; $p = 0,952$) nije utvrđen statistički značajan utjecaj biofortifikacije selenom.

Bioraspoložive koncentracije Mn u moštu ($df = 2$; $F = 0,59$; $p = 0,573$) i bioraspoložive koncentracije Mn u vinu ($df = 2$; $F = 1,62$; $p = 0,250$) također nisu bile pod statistički značajnim utjecajem biofortifikacije selenom.

Tablica 6. Bioraspoložive koncentracije Se, Fe, Zn i Mn u moštu i vinu nakon simulacije probave *in vitro*

| | Tretman | Se ($\mu\text{L L}^{-1}$) | Fe* (mg L^{-1}) | Zn (mg L^{-1}) | Mn (mg L^{-1}) |
|------------------|--------------------|-----------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|
| M O Š T | Kontrola | $0,62 \pm 0,06^*$ | $0,04 \pm 0,004$ | $0,18 \pm 0,01^b$ | $0,12 \pm 0,01$ |
| | Biofortifikacija 1 | $0,49 \pm 0,08^b$ | $0,05 \pm 0,003$ | $0,24 \pm 0,01^a$ | $0,13 \pm 0,01$ |
| | Biofortifikacija 2 | $2,88 \pm 0,64^a$ | $0,03 \pm 0,001$ | $0,23 \pm 0,02^{ab}$ | $0,14 \pm 0,01$ |
| V I N O | Kontrola | $1,94 \pm 0,29^b$ | $0,18 \pm 0,01$ | $0,19 \pm 0,01$ | $0,22 \pm 0,02$ |
| | Biofortifikacija 1 | $1,77 \pm 0,33^b$ | $0,19 \pm 0,01$ | $0,18 \pm 0,005$ | $0,24 \pm 0,01$ |
| | Biofortifikacija 2 | $3,51 \pm 0,29^a$ | $0,18 \pm 0,01$ | $0,18 \pm 0,01$ | $0,25 \pm 0,01$ |

*srednje vrijednosti označene različitim slovima statistički se značajno razlikuju $p < 0.05$ prema (Tukey HSD)

5. RASPRAVA

U Hrvatskoj se uočava trend porasta srednje godišnje temperature zraka te velika variranja u količini oborina. Klimatološka istraživanja koja se provode regionalnim klimatskim modelima pokazuju da će se ekstremne vrijednosti temperature i oborine iznad Europe intenzivirati u budućoj klimi. Spomenute promjene imaju veliki utjecaj na vinogradarstvo i ostale biljne kulture. Sve to utječe na kvalitetu i kakvoću grožđa i vina te smanjenu količinu mikronutrijenata u jestivim dijelovima biljke. Procjenjuje se da više od 2 milijarde ljudi globalno pati od nedostatka mikronutrijenata, poznatije pod nazivom „skrivena glad“ (Prom-u-thai i sur. 2020.). Ova pojava se većinom javlja u slabije razvijenim zemljama i najčešće među djecom u razvoju i trudnicama. Među mikronutrijentima, oni najviše povezani s pothranjenošću su cink, selen i željezo. Diljem svijeta znanstvenici provode istraživanja kojima je cilj obogaćivanje prehrambenih proizvoda cinkom, selenom i željezom radi smanjivanja njihovih nedostataka u ljudskoj prehrani (Szerement i sur. 2022.). Zbog spomenutog problema počela su se provoditi istraživanja biofortifikacije. Biofortifikacija je postupak povećanja određenog elementa u jestivim dijelovima biljke. U ovom istraživanju je provedena agronomska biofortifikacija selenom na sorti vinove loze Regent. Agronomska biofortifikacija selenom ima mnoge prednosti. Anorganski selen se apsorbira i biljka ga pretvara u organske oblike koji imaju veću bioraspoloživost. Mnoge varijable uključene su u strategiju biofortifikacije selenom, kao što je način primjene selena (gnojidba tla, folijarno prskanje), doza selena, vrsta i oblik gnojiva, vrsta usjeva te sorta i faza rasta (D'Amato i sur. 2020.). Sortu Regent stvorio je 1967. godine prof. Gerhard Alleweidt na Institutu za oplemenjivanje vinove loze u Geilweilerhofu u Njemačkoj. Smatra se jednom od najotpornijih hibrida na gljivične bolesti.

Pokus je proveden na baranjskom vinogradskom području u 2021. godini. Sastojao se od tri tretmana i četiri ponavljanja. Provedena je folijarna primjena selena prije cvatnje te prije cvatnje i u fazi šare sa po 5 g Se ha⁻¹. Ispitivan je utjecaj biofortifikacije selenom na bioraspoložive i ukupne koncentracije makro i mikroelemenata u moštu i vinu. Biofortifikacija selenom pokazala je pozitivan utjecaj na povećanje ukupnih i bioraspoloživih koncentracija selena u moštu i vinu.

U prošlogodišnjem istraživanju provedenom na istom području i vinogradu i s istim brojem tretmana i količinom korištenih otopina od zabilježen je pozitivan utjecaj biofortifikacije selenom na ukupne koncentracije selena u moštu i vinu (Mikulić, 2020.). Povećanje ukupne koncentracije Se u moštu je iznosilo 171 %, dok je u vinu to povećanje bilo 165 %

u odnosu na kontrolni tretman. U ovom istraživanju utvrđeno je još značajnije povećanja koncentracije selena u moštu (228 %), dok je u vinu zabilježen porast koncentracije Se u vinu u odnosu na kontrolu za 144 %. Kako bi se utvrdio i višegodišnji učinak biofortifikacije na koncentracije selena u moštu i vinu, potrebno je provesti višegodišnje istraživanje na istom uzorku. Zhao i sur. (2020.) su proveli istraživanje biofortifikacije selenom i litijem na kakvoću bobica i sadržaj mikroelemenata u bobicama. Pokus je proveden folijarnom primjenom selena (Se) i litija (Li) na pet sorata grožđa. Također su istraženi učinci biofortifikacije na bujnost vinove loze, kvalitetu plodova, ukupne mikronutrijente i fenolne spojeve. Utvrdili su da se koncentracija Se i Li u grožđu povećala višestruko nakon provedbe agronomske biofortifikacije, dok nije značajno utjecala na bujnost vinove loze i kvalitetu bobica, te je utvrđen porast hranjive vrijednosti bobica i mikroelemenata u tragovima. Folijarna primjena selena uz pomoć različitih otopina uspješno je primijenjena na povećanje koncentracije Se u mnogim poljoprivrednim proizvodima (mrkva, maslinovo ulje, zeleni luk, rajčica). Fonatella i sur. (2017.) proveli su istraživanje utjecaja biofortifikacije selenom na sortu vina Sangiovese u lišću, grožđu i vinu i utvrdili značajno povećanje sadržaja Se u pod utjecajem biofortifikacije. U ovom istraživanju osim ukupnih koncentracija, provedeno je istraživanje utjecaja biofortifikacije selenom na bioraspoložive koncentracije selena u moštu i vinu. Bioraspoložive koncentracije se odnose na koncentracije koje su pronađene u uzorcima nakon što je na njima provedena simulacija probave *in vitro*. Odnosno, to je ono što će biti potencijalno dostupno za apsorpciju u ljudskom organizmu. Prema dobivenim rezultatima bioraspoloživa koncentracija Se nakon biofortifikacije selenom se povećala za 4,6 puta u moštu, i za 1,80 puta u vinu u odnosu na kontrolni tretman. Utjecaj biofortifikacije selenom na makro i mikroelemente uočen je kod pojedinih elemenata, ali ne može se donijeti konačan zaključak o izravnom utjecaju folijarne primjene selena, s obzirom na mali broj uzoraka u provedenom istraživanju. Potrebno je provesti dodatna istraživanja na različitim sortama vinove loze, ali i ostalim biljnim vrstama.

Folijarna primjena Se je učinkovit način obogaćivanja vinove loze selenom. Kako bi se biofortifikacija Se provodila što učinkovitije, potrebno je provesti dodatna istraživanja da bi se odredila optimalna količina, oblik i vrijeme primjene selena.

6. ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata provedenog istraživanja možemo zaključiti sljedeće:

1. Jednofaktorijskom analizom varijance utvrđen je statistički značajan pozitivan utjecaj biofortifikacije selenom na ukupne i bioraspoložive koncentracije selena u moštu i vinu.
2. Jednofaktorijskom analizom varijance nije utvrđen značajan utjecaj folijarne primjene selena na bioraspoložive i ukupne koncentracije Mg i Ca u moštu, dok je biofortifikacija selenom imala utjecaj na ukupne koncentracije K u moštu.
3. Jednofaktorijskom analizom varijance nije utvrđen statistički značajan utjecaj biofortifikacije selenom na bioraspoložive i ukupne koncentracije Fe i Mn u moštu, dok je utvrđen statistički značajan utjecaj biofortifikacije selenom na bioraspoložive koncentracije Zn u moštu.
4. Jednofaktorijskom analizom varijance nije utvrđen značajan utjecaj folijarne primjene selena na bioraspoložive i ukupne koncentracije Mg i Ca u vinu, dok je utvrđen statistički značajan utjecaj biofortifikacije selenom na ukupnu koncentraciju K u vinu.
5. Jednofaktorijskom analizom varijance nije utvrđen statistički značajan utjecaj biofortifikacije selenom na bioraspoložive i ukupne koncentracije Fe, Zn i Mn u vinu.
6. S obzirom na dobivene rezultate može se zaključiti da biofortifikacija selenom ima pozitivan utjecaj na povećanje bioraspoloživih i ukupnih koncentracija selena u moštu i vinu.
7. Kako bi se utvrdila povezanost biofortifikacije selenom i koncentracija ostalih ispitivanih elemenata u moštu i vinu, potrebno je provesti opsežnije istraživanje, prvenstveno s više razina biofortifikacije, različitim oblicima i terminima primjene te različitim sortama vinove loze.

7. LITERATURA

1. Adu O.M., Yawson M., Nyarko A., Osei-Agyeman K. (2018): Agronomic biofortification of selected underutilised solanaceae vegetables for improved dietary intake of potassium (K) in Ghana. *Heliyon* 4(8): 1-10.
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00750>
2. Andrews, S. C. (1980): Iron storage in bacteria. *Advances in Microbial Physiology* (40): 281-300.
3. Çakır Ö, Turgut-Kara N, Arı Ş. (2012): Selenium Metabolism in Plants: Molecular Approaches, *Advances in Selected Plant Physiology Aspects*, Dr. Montanaro G (Ed.). Edited volume. InTech, Rijeka, Croatia: 210-232.
4. Cakmak, I. (2008.): Enrichment of cereal grains with zinc: Agronomic or genetic biofortification? *Plant and Soil*, 302: 1-17.
5. Cakmak, I., Yazici, A.M. (2010.): Magnesium: A Forgotten Element in Crop Production. *Better Crops*, 94(2): 23-25.
6. Clarkson D.T. i Sanderson J. (1978): Sites of absorption and translocation of iron in barley roots. *Plant Physiology* 61: 731-736.
7. D'Amato R., Regni L., Falcinelli B., Mattioli S., Benincasa P., Dal Bosco A., Pacheco P., Proietti P., Troni E., Santi C., Businelli D. (2020.): Current Knowledge on Selenium Biofortification to Improve the Nutraceutical Profile of Food. *Journal of Agricultural and food chemistry* 68(14): 4080–4081.
8. Elgawhary S.M., Lindsay W.L, Kemper W.D. (1970): Effect of complexing agent and acid on the diffusion of zinc to a simulated root. *Soil Science Society of America Journal* 34 (2): 211-214.
9. Fonatella M. C., D'Amato R., Regni L., Proietti P., Beone G. M., Businelli D. (2017.): Selenium speciation profiles in biofortified sangiovese wine, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 43: 87 - 92.
10. Fregoni M. (1981.): *Nutrizione e fertilizzazione della vite*. Itailja: Edagricole
11. Garg M., Sharma N., Sharma S., Kapoor P., Kumar A., Chunduri V., Arora P. (2018.): *Biofortified Crops Generated by Breeding, Agronomy, and Transgenic*

Approaches Are Improving Lives of Millions of People around the world. *Frontiers in Nutrition* : 1-10

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnut.2018.00012/full>

12. Germ M, Stibilj V. (2007.): Selenium and plants. *Acta agriculturae Slovenica*, 89: 65-71.
13. Giordano P.M., Noggle J.C., Mortvedt J.J. (1974.): Zinc uptake by rice as affected by metabolic inhibitors and competing cations. *Plant and Soil*, 41 (3): 637-646.
14. Gluhić D. (2013.): Mikroelementi u funkciji gnojidbe bilja. *Glasnik zaštite bilja* (5): 27-29.
15. Gluhić D., Deklić D. (2018.): Važnost cinka u gnojidbi vinove loze. *Glasnik zaštite bilja* (3): 63-68.
16. Gransee, A., Führs, H. (2013.): Magnesium mobility in soils as a challenge for soil and plant analysis, magnesium fertilization and root uptake under adverse growth conditions. *Plant and Soil* 386: 5-21.
17. Grimme H. (1991): Magnesium in landwirtschaftlichen und forstlichen Ökosystemen. *KALI-BRIEFE* 20:525–538
18. Gupta, M., Gupta, S. (2017): An Overview of Selenium Uptake, Metabolism, and Toxicity in Plants. *Frontiers in Plant Science* 7: 2074.
19. Hartikainen, H. (2005): Biogeochemistry of selenium and its impact on food chain quality and human health. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 18(4): 309– 318.
20. Hodgson J.F., Lindsay W.L., Trierweiler J.F. (1966): Micronutrient cation complexing in soil solution. II. Complexing of zinc and copper in displacing solution from calcareous soils. *Soil Science Society of America Journal* 30: 723-726.
21. Jackson R.S. (2000): *Wine Science: Principle, Practice, Perception*, 145-147.
22. Jug, I., Jug, D., Vukadinović, V., Stipešević, B., Vukadinović, V. (2008.): The influence of the temperature and hybrid on accumulation of dry matter and N, P, K content in maize seedlings in controlled conditions. *Cereal Research Communications*, 36, 2 (S5): 931-934.

23. Kastori, R. (1983): Uloga elemenata u ishrani biljaka. Matica srpska, Novi Sad.
24. Kuznetsov VV, Kholodova VP, Kuznetsov VIV, Yagodin BA. (2003): Selenium regulates the water status of plants exposed to drought. *Doklady Biological Sciences* 390: 266-268.
25. Li, H.F., McGrath, S.P., Zhao, F.J. (2008): Selenium uptake, translocation and speciation in wheat supplied with selenate or selenite. *New Phytologist* 178: 92–102.
26. Lyons M.P., Surai P., Papazyan T.T. (2007): Selenium in food chain and animal nutrition. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences* 20(7): 1135-1155. DOI:[10.5713/ajas.2007.1135](https://doi.org/10.5713/ajas.2007.1135)
27. Maguire M.E., Cowan J.A. (2002): Magnesium chemistry and biochemistry. *BioMetals* 15:203–210.
28. Mengel K. i Kirkby E.A. (1987) : Principles of plant nutrition, International Potash Institute, Basel, Švicarska
29. Miethke M., Marahiel M. (2007): Siderophore-based iron acquisition and pathogen control . *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 71: 413-451.
30. Mikkelsen R (2010): Soil and fertilizer magnesium. *Better Crops* 94: 26–28.
31. Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carriere, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., Marze, S., McClements, D.J., Menard, O., Recio, I., Santos, C.N., Singh, R.P., Vegarud, G.E., Wickhman, M.S.J., Weitschies, W., Brodkorb, A. (2014.): A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. *Food function* 5: 1113-1124.
32. NN, 76/2019
33. Papenfuß K.H., Schlichting E. (1979): Bestimmende Faktoren des Mg-Haushaltes von Böden in der Bundesrepublik Deutschland. *Magnes Bull* 1:12–14.
34. Perrone D., Monteiro M., Nunes C. J. (2015): The Chemistry of Selenium. *Royal Society of Chemistry* : 3-15. DOI:[10.1039/9781782622215-00003](https://doi.org/10.1039/9781782622215-00003)

35. Pilon-Smits, E.A.H., Quinn, C.F. (2010): Selenium metabolism in plants. *Cell Biology of Metals and Nutrients* 17: 225-241, DOI:[10.1007/978-3-642-10613-2_10](https://doi.org/10.1007/978-3-642-10613-2_10)
36. Powel P.E., Szaniszlo P.F. i Reid C.P.P. (1983): Confirmation of occurrence of hydroxiamate siderophores in soil by novel *Escherichia coli* bioassay, *Applied and Environmental Microbiology Journal* 46: 1080-1083.
37. Predojević, Ž. (2016) Zlatno brdo i tisućljetna vinogradarska tradicija. U: *Godišnjak Ogranka Matice hrvatske Beli Manastir*, 12 (2015): 76-100.
38. Raos N. (2008): *Metali života metali smrti*, Školska knjiga, Zagreb.
39. Rayman, MP. (2012) Selenium and human health. *The Lancet*, 379(9822): 1256–1268. DOI: [10.1016/S0140-6736\(11\)61452-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61452-9)
40. Sauerbeck D. (1982): Which heavy metal concentrations in plant should not be exceeded in order to avoid detrimental effects of their growth. *Landw. Forsch. Sonderh*, 39: 108-129.
41. Scheffer F., Schachtschabel P. (2002): *Lehrbuch der Bodenkunde*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
42. Schiavon, M., Nardi, S., dalla Vecchia, F., Ertani, A. (2020): Selenium biofortification in the 21st century: status and challenges for healthy human nutrition. *Plant and Soil* 453 (3): 245-250.
43. Simon, E.W. (1977.): The symptoms of calcium deficiency in plants. *The New Phytologist* 80: 1-15.
44. Soleas G.J., Diamandis E.P., Goldberg D.M. (1997): Wine as a biological fluid: history, production and role in disease prevention. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 11: 287-313.
45. Slavik B. (1974): *Methods of studying plant water relations*. Prague: Czechoslovak academy of science: 21-24.
46. Stevenson F.J., Ardakani M.S. (1972): Organic matter reactions involving micronutrients in soils, U: Luxmoore, R, J.. ur. *Micronutrients in agriculture*. Madison, Wisconsin, USA: Soil Science Society of America :145-186.

47. Terry, N., Zayed, A.M., de Souza, M.P., Tarun, A.S. (2000): Selenium in higher plants. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* 51: 401–432.
48. Van Metre D. C. and R. J. Callan. (2001): Selenium and vitamin E. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 17:373-402.
49. Vukadinović, V. i Vukadinović, V. (2011.): *Ishrana bilja*, Poljoprivredni fakultet u Osijeku.
50. Xue TL, Hartikainen H, Piironen V. (2001): Antioxidative and growth-promoting effects of selenium on senescing lettuce. *Plant and Soil* 237: 55-61.
51. Zahirul Islam, M., Park, B-J., Kang, H-M., Lee, Y-T. (2019): Influence of selenium biofortification on the bioactive compounds and antioxidant activity of wheat microgreen extract. *Food Chemistry* 309: Article 125763.
52. Zorb, C., Senbayram, M., Peiter, E. (2014.): Potassium in agriculture- status and perspectives. *Plant Physiology* 171: 656-669.
53. Prom-u-thai C, Rashid A, Ram H et al (2020) Simultaneous biofortification of rice with zinc, iodine, iron and selenium through foliar treatment of a micronutrient cocktail in five countries. *Frontiers in Plant Science* 11: 2-5.
54. Szerement J., Szatanik-Kloc A., Mokrzycki J., Mierzwa-Hersztek M. (2022.): Agronomic Biofortification with Se, Zn and Fe: An Effective Strategy to Enhance crop nutritional quality and stress defence. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 22 : 1129-1135
55. Zhao, H., Xie, X., Read, P., Loseke, B., Gamet, S., Li, W., & Xu, C. (2020). Biofortification with selenium and lithium improves nutraceutical properties of major winery grapes in the Midwestern United States. *International Journal of Food Science & Technology* 56(2): 825-837. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14726>
56. Mikulić M. (2020): Utjecaj biofortifikacije selenom na neka kvalitativna svojstva sorte vinove loze Regent, Diplomski rad

Internetski izvori:

1. <https://www.agroklub.com/vinogradarstvo/regent-sorta-otporna-na-gljivicne-bolesti/3433/> (25.8.2022.)
2. [Podunavlje - vinacroatia.hr](http://Podunavlje-vinacroatia.hr) (28.8.2022.)
3. [Pravilnik o zemljopisnim područjima uzgoja vinove loze \(nn.hr\)](http://Pravilnik-o-zemljopisnim-podrucjima-uzgoja-vinove-loze.nn.hr) (28.8.2022.)

8. SAŽETAK

Cilj rada bio je utvrditi utjecaj biofortifikacije selenom na ukupne i bioraspoložive koncentracije mikro i makroelemenata u moštu i vinu. Procesom biofortifikacije se pokušava povećati koncentracija hranjivih tvari u jestivim dijelovima biljke. Pokus je proveden na vinskoj sorti Regent prema potpuno slučajnom planu u četiri ponavljanja. Primijenjene su tri razine biofortifikacije selenom (kontrola, biofortifikacija 1 i biofortifikacija 2). Za pokus je korišten Se u obliku natrijevog selenata (Na_2SeO_4), a kao okvašivač je korišten Tween 20. Simulacija probave *in vitro* provedena je prema Minekus i sur. (2014). Ukupne i bioraspoložive koncentracije elemenata u moštu u vinu određene su pomoću ICP-OES i ICP-MS uređaja. Jednofaktorijalnom analizom varijance utvrđen je statistički značajan utjecaj biofortifikacije selenom na ukupne i bioraspoložive koncentracije selenom u moštu i vinu. Utjecaj biofortifikacije selenom utvrđen je i na ukupne koncentracije kalija, željeza i cinka u moštu, ukupne koncentracije K u vinu te bioraspoloživu koncentraciju Zn u moštu.

Ključne riječi: biofortifikacija, selen, Regent, mikroelementi, makroelementi

9. SUMMARY

The aim of the work was to determine the influence of biofortification with selenium on the total and bioavailable concentrations of micro and macro elements in must and wine. The biofortification process attempts to increase the concentration of nutrients in the edible parts of the plant. The experiment was conducted on the Regent wine variety according to a completely randomized design in four replications. Three levels of biofortification with selenium were applied (control, biofortification 1 and biofortification 2). Se in the form of sodium selenate (Na_2SeO_4) was used for the experiment, and Tween 20 was used as a wetting agent. In vitro digestion simulation was performed according to Minekus et al. (2014). Total and bioavailable concentrations of elements in must in wine were determined using ICP-OES and ICP-MS devices. One-factor analysis of variance revealed a statistically significant influence of selenium biofortification on total and bioavailable selenium concentrations in must and wine. The influence of biofortification with selenium was also determined on the total concentrations of potassium, iron and zinc in the must, the total concentration of K in the wine and the bioavailable concentration of Zn in the must.

Keywords: biofortification, selenium, Regent, microelements, macroelements

10. POPIS TABLICA

Tablica 1. Koncentracija i vrijeme primjene tretmana, str. 18.

Tablica 2. Količina otopina potrebnih za pripremu želučanih i crijevnih otopina za 12 uzoraka, str. 19.

Tablica 3. Ukupne koncentracije K, Ca i Mg (mg L^{-1}) u moštu i vinu, str. 22.

Tablica 4. Ukupne koncentracije Se ($\mu\text{g L}^{-1}$), Fe, Zn i Mn (mg L^{-1}) u moštu i vinu, str. 23.

Tablica 5. Bioraspoložive koncentracije K, Ca i Mg u moštu i vinu nakon simulacije probave *in vitro*, str. 24.

Tablica 6. Bioraspoložive koncentracije Se, Fe, Zn i Mn u moštu i vinu nakon simulacije probave *in vitro*, str. 26.

11. POPIS SLIKA

Slika 1. Regent, str. 16.

Slika 2. Trsovi sorte Regent, str. 17.

Slika 3. Odvajanje uzoraka u demižone, str. 18.

Slika 4. Uzimanje uzoraka mošta, str. 19.

Slika 5. Uzorci u vodenoj kupelji, str. 20.

Slika 6. MARS 6 One Touch (CEM) str. 21.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Diplomski rad

Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Sveučilišni diplomski studij Voćarstvo, vinogradarstvo i vinarstvo, smjer Vinogradarstvo i vinarstvo

Ana Šinko

Utjecaj biofortifikacije selenom na koncentracije makro i mikroelemenata u moštu i vinu sorte vinove loze Regent

Sažetak: Cilj rada bio je utvrditi utjecaj biofortifikacije selenom na ukupne i bioraspoložive koncentracije mikro i makroelemenata u moštu i vinu. Procesom biofortifikacije se pokušava povećati koncentracija hranjivih tvari u jestivim dijelovima biljke. Pokus je proveden na vinskoj sorti Regent prema potpuno slučajnom planu u četiri ponavljanja. Primijenjene su tri razine biofortifikacije selenom (kontrola, biofortifikacija 1 i biofortifikacija 2). Za pokus je korišten Se u obliku natrijevog selenata (Na_2SeO_4), a kao okvašivač je korišten Tween 20. Simulacija probave *in vitro* provedena je prema Minekus i sur. (2014). Ukupne i bioraspoložive koncentracije elemenata u moštu u vinu određene su pomoću ICP-OES i ICP-MS uređaja. Jednofaktorijalnom analizom varijance utvrđen je statistički značajan utjecaj biofortifikacije selenom na ukupne i bioraspoložive koncentracije selenom u moštu i vinu. Utjecaj biofortifikacije selenom utvrđen je i na ukupne koncentracije kalija, željeza i cinka u moštu, ukupne koncentracije K u vinu te bioraspoloživu koncentraciju Zn u moštu.

Rad je izrađen pri: Fakultet agrobiotehničkih znanosti

Mentor: izv. prof. dr. sc. Andrijana Rebekić

Broj stranica:

Broj slika i grafikona: 6

Broj literaturnih navoda:

Broj priloga:

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: biofortifikacija, selen, Regent, mikroelementi, makroelementi

Datum obrane:

Stručno povjerenstvo za obranu: 1. izv. prof. dr. sc. Mato Drenjančević, predsjednik
2. izv. prof. dr. sc. Andrijana Rebekić, mentor
3. izv. prof.dr. sc.Vladimir Jukić, član

Rad je pohranjen: u Knjižnici Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek i u digitalnom repozitoriju završnih i diplomskih radova Fakulteta agrobiotehničkih znanosti u Osijeku

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Faculty of Agrobiotechnical sciences Osijek
University graduate study, course Viticulture and enology

Graduate thesis

Ana Šinko

The influence of biofortification with selenium on concentrations of macro and microelements in must and wine of the Regent grape variety

Summery: The aim of the work was to determine the influence of biofortification with selenium on the total and bioavailable concentrations of micro and macro elements in must and wine. The biofortification process attempts to increase the concentration of nutrients in the edible parts of the plant. The experiment was conducted on the Regent wine variety according to a completely randomized design in four replications. Three levels of biofortification with selenium were applied (control, biofortification 1 and biofortification 2). Se in the form of sodium selenate (Na_2SeO_4) was used for the experiment, and Tween 20 was used as a wetting agent. In vitro digestion simulation was performed according to Minekus et al. (2014). Total and bioavailable concentrations of elements in must in wine were determined using ICP-OES and ICP-MS devices. One-factor analysis of variance revealed a statistically significant influence of selenium biofortification on total and bioavailable selenium concentrations in must and wine. The influence of biofortification with selenium was also determined on the total concentrations of potassium, iron and zinc in the must, the total concentration of K in the wine and the bioavailable concentration of Zn in the must.

Thesis performed at: Faculty of Agrobiotechnical Sciences in Osijek

Mentor: izv. prof. dr. sc. Andrijana Rebekić

Number of pages:

Number of figures:

Number of tables:

Number of references:

Number of appendices:

Original in: Croatian

Keywords: biofortification, selenium, Regent, microelements, macroelements

Thesis defended on date:

Reviewers: 1. izv. prof. dr. sc. Mato Drenjančević, president
2. izv. prof. dr. sc. Andrijana Rebekić, mentor
3. izv. prof. dr. sc. Vladimir Jukić, member

Thesis deposited at: Library of Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek and in digital repository of Faculty of Agrobiotechnical Sciences in Osijek