

Utjecaj ektomikorize na kemijski sastav vina 'Portugizac'

Karakaš, Darija

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:204:978983>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-03**



Repository / Repozitorij:

[Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

**UTJECAJ EKTOMIKORIZE NA KEMIJSKI SASTAV VINA
'PORTUGIZAC'**

DIPLOMSKI RAD

Darija Karakaš

Zagreb, lipanj, 2020.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

Diplomski studij:

Vinogradarstvo i vinarstvo

**UTJECAJ EKTOMIKORIZE NA KEMIJSKI SASTAV VINA
'PORTUGIZAC'**

DIPLOMSKI RAD

Darija Karakaš

Mentor:

Prof.dr.sc. Ana Jeromel

Zagreb, lipanj, 2020.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

**IZJAVA STUDENTA
O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI**

Ja, **Darija Karakaš**, JMBAG 0178101226 , rođen/a 17.01.1996. u Zaboku, izjavljujem da sam samostalno izradila/izradio diplomski rad pod naslovom:

UTJECAJ EKTOMIKORIZE NA KEMIJSKI SASTAV VINA 'PORTUGIZAC'

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica/jedini autor ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata/upoznat s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____

Potpis studenta / studentice

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studenta/ice **Darije Karakaš**, JMBAG 0178101226, naslova

UTJECAJ EKTOMIKORIZE NA KEMIJSKI SASTAV VINA 'PORTUGIZAC'

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____, dana _____.

Povjerenstvo:

potpisi:

1. Prof.dr.sc. Ana Jeromel mentor

2. Izv.prof.dr.sc. Marko Karoglan član

3. Doc.dr.sc. Marin Mihaljević Žulj član

Sažetak

Diplomskog rada studenta/ice **Darije Karakaš**, naslova

UTJECAJ EKTOMIKORIZE NA KEMIJSKI SASTAV VINA 'PORTUGIZAC'

Cilj ovog diplomskog rada bio je utvrditi kako primjena ektomikoriznog micelija na korijen vinove loze utječe na kemijski sastav vina 'Portugizac'. Pokus je postavljen u jesen 2016. godine na 3 lokacije na području ZOI Plešivica, kada je provedena i aplikacija cjepiva naziva „Mykoflor“ tvrtke Bio-budućnost d.o.o. iz Zagreba. Cjepivo je aplicirano na 100 trsova sorte 'Portugizac', pri čemu je isti broj trsova poslužio kao kontrola. Analiza kemijskog sastava vina provedena je nakon berbe 2018. godine na Zavodu za vinogradarstvo i vinarstvo Agronomskog fakulteta u Zagrebu prema metodama O.I.V.-a (2001). Tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC) određeni su pojedinačni polifenolni spojevi po metodi Tomaz i Maslov (2016). Također, provedeno je i senzorno ocjenjivanje vina primjenom metode 100 pozitivnih bodova. Rezultati su pokazali povoljan utjecaj mikorize na kemijski sastav vina dobivenih iz zaraženih trsova u odnosu na kontrolna vina. Pozitivan učinak očitovao se u višoj koncentraciji pojedinačnih organskih kiselina, šećera, povećanju sadržaja pepela te smanjenju pH vrijednosti. Aplikacija mikorize pozitivno je djelovala i na polifenolni sastav vina.

Ključne riječi: 'Portugizac', mikoriza, kemijski sastav, polifenoli

Summary

Of the master's thesis – student **Darija Karakaš**, entitled

THE IMPACT OF ECTOMYCORRHIZA ON CHEMICAL COMPOSITION OF 'PORTUGIESER' WINE

The aim of this thesis was to determine how the application of ectomycorrhizal mycelium to the root of grapevine affects the chemical composition of wine 'Portugieser'. The experiment was set up in fall 2016. in 3 locations in the area of ZOI Plešivica, when the application of vaccine called „Mykoflor” of a company named Bio-budućnost d.o.o. from Zagreb was also performed. The vaccine was applied to 100 vines of variety 'Portugieser', with the same number of vines serving as a control. Analysis of chemical composition of wine was carried out after the harvest in 2018. at Department of Viticulture and Enology of Faculty of Agriculture in Zagreb in accordance with the O.I.V. (2001.) methods. By High Performance Liquid Chromatography (HPLC), single polyphenolic compounds were determined according to Tomaz and Maslov (2016.) method. Also, sensory evaluation of wine was performed using the method of 100 positive points. The results showed favorable effect of mycorrhiza on chemical composition of wines obtained from infected vines compared to the control wines. Positive effect was manifested in higher concentration of acids, sugar, increase in ash content and lower pH values. Application of mycorrhiza also had a positive effect on the polyphenolic composition of wine.

Keywords: 'Portugieser', mycorrhiza, chemical composition, polyphenols

Sadržaj

| | |
|---|----------|
| 1. Uvod | 1 |
| 1.1. Cilj istraživanja..... | 2 |
| 1.2. Hipoteza istraživanja | 2 |
| 2. Pregled literature | 3 |
| 2.1. Mikorizne zajednice..... | 4 |
| 2.1.1. Ektomikoriza..... | 4 |
| 2.2. Utjecaj mikorize na vinovu lozu | 6 |
| 3. Materijali i metode | 8 |
| 3.1. Pokusni nasadi..... | 8 |
| 3.2. Klima | 8 |
| 3.2.1. Temperatura | 9 |
| 3.2.2. Vlaga..... | 11 |
| 3.2.3. Svjetlost..... | 12 |
| 3.3. Tlo | 13 |
| 3.3.1. Tlo pokusnih vinograda..... | 15 |
| 3.4. Sorta 'Portugizac' | 15 |
| 3.5. Plan pokusa | 17 |
| 3.6. Metode kemijske analize vina | 18 |
| 3.6.1. Određivanje gustoće i relativne gustoće pri 20 °C..... | 18 |
| 3.6.2. Određivanje alkoholne jakosti | 19 |
| 3.6.3. Određivanje ukupnog suhog ekstrakta..... | 20 |
| 3.6.4. Određivanje reducirajućih šećera | 20 |
| 3.6.5. Određivanje sadržaja šećera | 20 |
| 3.6.6. Određivanje ukupne kiselosti mošta i vina | 21 |
| 3.6.7. Određivanje pojedinačnih organskih kiselina..... | 22 |
| 3.6.8. Određivanje hlapive kiselosti | 22 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 3.6.9. | Određivanje pH vrijednosti | 23 |
| 3.6.10. | Određivanje sumpornog dioksida u vinima | 23 |
| 3.6.11. | Određivanje pepela u vinu | 24 |
| 3.7. | Aromatski profil vina | 25 |
| 3.8. | Polifenolni sastav grožđa i vina | 27 |
| 3.8.1. | Fenolne kiseline | 28 |
| 3.8.2. | Stilbeni | 29 |
| 3.8.3. | Flavanoli | 29 |
| 3.8.4. | Flavonoli | 29 |
| 3.8.5. | Antocijani | 30 |
| 3.9. | Određivanje polifenola u vinu | 30 |
| 3.10. | Senzorno ocjenjivanje vina | 31 |
| 4. | Rezultati i rasprava | 32 |
| 4.1. | Rezultati kemijske analize mošta | 32 |
| 4.2. | Sadržaj pojedinačnih organskih kiselina u trenutku berbe | 33 |
| 4.3. | Rezultati fizikalno-kemijske analize vina | 34 |
| 4.4. | Polifenolni sastav vina | 36 |
| 5. | Zaključak | 40 |
| 6. | Literatura..... | 41 |

Popis slika

| | |
|---|----|
| Slika 1: Shematski prikaz ektomikorize | 6 |
| Slika 2: Utjecaj mikorize na vinovu lozu | 7 |
| Slika 3: Plešivička vinogorja..... | 8 |
| Slika 4: Vinogradarske zone u Republici Hrvatskoj | 9 |
| Slika 5: Odstupanje količina oborina u 2018. godini..... | 12 |
| Slika 6: Mjesečna količina oborina za 2018. godinu, Zagreb-Maksimir..... | 12 |
| Slika 7: Broj sati sijanja Sunca za 2018. godinu izražen u satima, Zagreb-Maksimir | 13 |
| Slika 8: Grozdovi sorte 'Portugizac' | 16 |
| Slika 9: Grožđe iz pokusnih vinograda spremno za primarnu preradu..... | 18 |
| Slika 10: Određivanje alkoholne jakosti metodom destilacije..... | 19 |
| Slika 11: Optički refraktometar i skala za očitavanje | 21 |
| Slika 12: pH metar | 23 |
| Slika 13: Aparatura za određivanje SO ₂ u vinu metodom po Paulu | 24 |
| Slika 14: Određivanje pepela u vinu | 24 |
| Slika 15: Arome vina i njihovo podrijetlo | 25 |
| Slika 16: Dijelovi bobice grozda i smještaj fenolnih spojeva unutar njih..... | 28 |

Popis tablica i grafova

| | |
|--|----|
| Tablica 1. Sadržaj šećera i ukupna kiselost u vinu 'Portugizac', berba 2018. | 32 |
| Tablica 2. Sadržaj pojedinačnih organskih kiselina u trenutku berbe grožđa 'Portugizac', 2018. godine | 33 |
| Tablica 3. Rezultati osnovne kemijske analize vina 'Portugizac', berbe 2018. | 35 |
| Tablica 4. Polifenolni profil vina 'Portugizac', prosječna vrijednost tri berbe, 2017-2019..... | 37 |
| Graf 1. Polifenolni profil vina 'Portugizac', prosječna vrijednost tri berbe, 2017-2019 | 38 |
| Graf 2. Senzorna ocjena vina 'Portugizac', 2017-2019 | 39 |

1. Uvod

Vinova loza (*Vitis vinifera*) jedna je od najstarijih i najrasprostranjenijih kulturnih biljaka, a vinogradarstvo i vinarstvo predstavljaju jedan od glavnih svjetskih ekonomskih sektora. Vinova se loza uzgaja na gotovo svim kontinentima, odnosno u područjima koja se nalaze unutar umjerenog klimatskog pojasa s jasno odijeljena četiri godišnja doba. Približno 66 % ukupne proizvodnje grožđa otpada na vino, 18,7 % na potrošnju grožđa u svježem stanju i preostalih 7,7 % otpada na proizvodnju grožđica (O.I.V., 2005). Obzirom na trendove u poljoprivrednoj proizvodnji, nužna je mogućnost pronalaska održivih uzgojnih praksi koje bi na najmanju moguću razinu svele mineralnu gnojidbu, veliku uporabu vode i primjenu kemijskih pripravaka za zaštitu bilja te samim time doprinijele očuvanju prirodnih resursa. Svijest potrošača o odnosu hrane i zdravlja, zajedno s ekološkom zabrinutošću, dovela je do povećane potražnje za organski proizvedenom hranom koja se smatra znatno boljom i sigurnijom za ljudsko zdravlje. Zbog utjecaja na rast biljke i njezino zdravstveno stanje, sve se više primjenjuje mikoriza koja smanjuje upotrebu umjetnih gnojiva i pesticida što vodi do smanjenja utjecaja štetnih kemijskih tvari na okoliš (Zhang i sur., 2003).

Mikoriza predstavlja simbiozu korijena i micelija mikoriznih gljiva te je odličan primjer suživota biljaka i gljiva. Znanstveno je utvrđeno da mikorizna simbioza igra važnu ulogu u ciklusu hranjivih tvari u ekosustavu i štiti biljku od okolišnih i kulturnih stresova (Barea i Jeffries, 1995). Štoviše, mikoriza uvelike doprinosi ekološkoj stabilnosti tla poboljšavajući njegov agregatni sastav. Poboljšani agregatni sastav djeluje protiv zbijanja samog tla te se smatra vrlo pogodnim za korijen vinove loze budući da teže prodire u takva tla. Česta je pojava i nedostatak hranjiva u tlima koje karakteriziraju nepovoljni uvjeti poput visokog sadržaja karbonata i pH vrijednosti (Ozdemir i sur., 2007). Međutim, primjena mikorize kao prirodnog mehanizma osigurava prednosti obzirom da uspostavlja uravnotežen odnos između biljke i njezinih potreba za određenim hranjivima (Tawarayama, 2003; Gosling i sur., 2006). Mikorizne zajednice dobivaju sve više pažnje zbog svoje uloge u produktivnosti biljaka. Danas je u svijetu sve više znanstvenika uključeno u istraživanje spomenutih zajednica te poticanje primjene istih.

1.1. Cilj istraživanja

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi kako primjena ektomikoriznog micelija naziva „Mykoflor“ tvrtke Bio-budućnost d.o.o. iz Zagreba na korijen vinove loze utječe na kemijski sastav vina 'Portugizac' berbe 2018. godine. Pokus je postavljen u jesen 2016. godine na području ZOI Plešivica na tri lokacije. Aplikacija cjepiva izvršena je u vinogradima OPG-a Ciban, Majcenović i Gregorić.

1.2. Hipoteza istraživanja

Uzimajući u obzir rezultate mnogobrojnih znanstvenih radova o utjecaju mikorize na kvantitetu i kvalitetu grožđa kao i kemijski sastav vina, za pretpostaviti je da će mikoriza pozitivno djelovati na kemijski sastav vina 'Portugizac'. Pretpostavka je da će se poboljšati kvaliteta vina, kako u kemijskom, tako i u senzornom smislu.

2. Pregled literature

Njemački znanstvenik Heinrich Anton de Bary (1887.), prvi je definirao pojam simbioza koju je koristio za označavanje zajedničkog života parazita i domaćina, kao i zajednicu u kojima različiti organizmi pomažu jedni drugima (Smith i sur., 2008). Simbiotske zajednice su česte u prirodi, od bakterija i gljiva koje formiraju bliske veze s korijenom kopnenih biljaka do divovskog morskog crva i sumpor-oksidirajućih bakterija koji žive zajedno u najvećim dubinama oceana. Također, postoji više tipova simbioze ovisno o koristi ili štetnosti za oba organizma. Symbioza tako uključuje mutualizam u kojem oba člana imaju neku korist te su oba člana uspješnija u zajednici nego svaki za sebe (Boucher, 1985). Zatim, postoji komenzalizam u kojoj jedan član zauzima životni prostor drugoga te parazitizam. Najčešći je oblik simbioze upravo mutualizam.

Simbiotska zajednica između korijena biljke i određenih gljiva tla naziva se mikoriza. Ova zajednica se obično smatra mutualnom simbiozom zbog velike ovisnosti jednog partnera o drugome, pri čemu biljka domaćin prima mineralna hranjiva preko micelija gljive dok heterotrofna gljiva dobiva ugljične spojeve iz fotosinteze domaćina (Harley i Smith, 1983; Azcón-Aguilar i Bago, 1994). Mikorizne gljive igraju ključnu ulogu u ciklusu hranjivih tvari u ekosustavu te zaštiti biljke od okolišnih stresova, patogenih gljiva i bakterija u tlu. Uz nekoliko izuzetaka, gljive za opskrbu organskim ugljikom u cijelosti ovise o biljkama (Brundrett, 1991). Dakle, mikorizne gljive nastanjuju korijen biljke domaćina te poboljšavaju usvajanje mineralnih hranjivih tvari iz tla, pretežito fosfora, dušika, kalcija, željeza, bakra i cinka. Osim toga, gljive povećavaju otpornost na biotske (biljni patogeni) i abiotske (suša, salinitet tla, teški metali) stresove, promovirajući rast biljke i njenu produktivnost (Balestrini i sur., 2010; Giovannetti i sur., 2012; Holland i sur., 2014; Radic i sur., 2014).

Najstarije biljke na zemlji bile su suočene s problemom apsorpiranja fosfora koji je neophodan za nastanak nukleinskih kiselina (DNA i RNA) te ATP-a zbog čega su počele stvarati zajednice s mikoriznim gljivama koje su im to uvelike olakšale. Taj se ključan događaj dogodio prije 400 milijuna godina i moguće da je imao glavnu ulogu u sposobnosti biljaka da koloniziraju zemaljska staništa (Attsat, 1991; Newsham i sur., 1995).

Mikorizne zajednice mogu se pronaći u gotovo svim tipovima tala. Isto tako, sve osim nekoliko vaskularnih biljnih vrsta (one koje pripadaju uglavnom porodicama *Cruciferae*, *Chenopodiaceae*, *Cyperaceae*, *Caryophyllaceae* i *Junacaceae*) sposobne su formirati mikorizu. Univerzalnost ove simbioze podrazumijeva veliku raznolikost u taksonomskim značajkama uključenih gljiva i biljaka. Također, uočene su velike razlike u morfologiji mikoriznog tipa, što se ogleda u rezultirajućim fiziološkim odnosima (Gianinazzi-Pearson, 1984; Azcón-Aguilar i Bago, 1994; Smith i sur., 1994).

2.1. Mikorizne zajednice

Sve važne poljoprivredne kulture formiraju simbiozu s gljivama poznatu kao mikoriza. Pojam mikoriza (što doslovno znači gljivično korijenje) introducirao je Albert Bernhard Frank (1885.), koji je bio prilično siguran da su ove simbiotske zajednice nužne za ishranu oba partnera. Danas postoji detaljnija definicija pojma mikoriza koja obuhvaća različite tipove mikorize, dok isključuje druge zajednice između biljaka i gljiva. Dakle, mikoriza je simbiotska zajednica ključna za jednog ili oba partnera, između gljive (specijalizirane za život u tlima i biljkama) i korijena (ili drugog organa koji dodiruje supstrat) žive biljke, koja je primarno odgovorna za prijenos hranjivih tvari (Brundrett, 2003). Njezin doprinos za rast biljke je od ogromne važnosti za produktivnost glavnih usjeva koji služe kao hrana čovječanstvu. Mikorizni status mnogih biljaka nije poznat, ali od 6 507 proučenih vrsta, samo 18 % ne tvori mikorizne simbioze (Pringle i sur., 2011). Iako dio svog životnog ciklusa mogu provesti kao samostalni organizmi, mikorizne gljive uvijek tvore zajednice s korijenom viših biljaka, uključujući šumska drveća, divlje trave i mnoge poljoprivredne kulture. Oba partnera imaju koristi od takve zajednice, mikorizne gljive poboljšavaju nutritivni status biljke domaćina pri čemu utječu i na mineralnu ishranu, unos vode, rast i otpornost na razne bolesti. S druge strane, biljka domaćin je nužna za rast i reprodukciju gljivica koja ih opskrbljuje ugljikohidratima.

Mikorizne gljive koloniziraju alpska i borealna područja, tropske šume, pašnjake i poljoprivredne površine. Imaju važnu ulogu u kruženju hranjiva zbog specifične aktivnosti njihovih micelija koja se odnosi na apsorpciju hranjiva iz tla i opskrbe biljke domaćina istima. Gljivični micelij povećava iskoristivi volumen tla te budući da pojedine hife imaju promjer usporediv s korijenovim dlačicama, one omogućavaju pristup porama tla koje bi inače bile neistražene (Smith i Read, 2008). Dakle, gljive razvijaju opsežnu mrežu hifa u tlu koje mogu povezati čitave biljne zajednice osiguravajući efikasan horizontalni prijenos hranjivih sastojaka. Hife zapravo preuzimaju funkciju široko rasprostranjenog korijenskog sustava zbog čega biljka razvija određenu toleranciju na slana tla i sušne uvjete, uključujući toksičnost teških metala i druge biotske i abiotske stresne faktore (Pozo i sur., 2009).

Prema Smithu i sur. (2008.) mikoriza se dijeli na sedam tipova: arbuskularna (endomikoriza), ektomikoriza, ektoendomikoriza, arbutoidna, monotropoidna, erikoidna i mikoriza orhideja.

2.1.1. Ektomikoriza

Ektomikoriza je simbiotska zajednica između gljive i korijena biljke za koju je karakteristična prisutnost plašta i Hartigove mreže koja se sastoji od labirinta hifa između korijenskih stanica (Frank, 1885; Harley i Smith, 1983). Ektomikorizna infekcija je inicirana iz spora, sklerocija, hifa i/ili rizomorfa gljive. Spore ili hife dolaze u kontakt s aktivno rastućim korijenom te ga napadaju. Ubrzan rast propagula stimuliran je eksudatima korijena kako bi pokrile cijeli vrh korijena s gustim omotačem hifa koji se naziva gljivični plašt. Kod

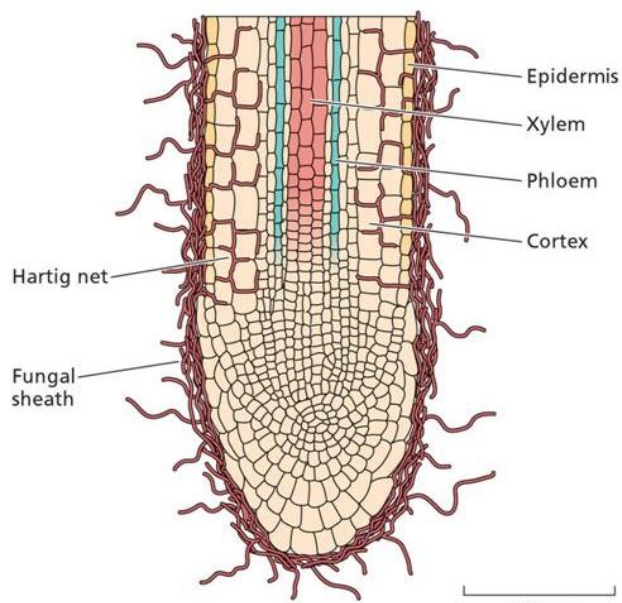
ektomikorize, gljive napadaju primarnu koru korijena domaćina bez da prodiru u njezine stanice. Infekcija ektomikoriznim gljivama često dovodi do promjena na korijenu koje su vidljive golim okom. Korijenje kolonizirano gljivama deblje je i razgranjenije od nekoloniziranog te drugačije obojeno (Habte, 2000). Prilikom formiranja ektomikorize, povećava se područje apsorpcije površine korijena. Korijenove dlačice su odsutne pa je korijen potpuno omotan gljivičnim plaštom duž svoje duljine i vrha.

Plašt može biti gladak ili sa hifama koje ulaze u tlo kako bi povećale apsorpcijsku površinu kratkih korijena. Različite ektomikorizne gljivice formiraju karakteristične plašteve različitih debljina, teksture i boje, s različitim domaćinima. Površina plašta može varirati od tanke do debele, dok tekstura može varirati od glatke pamučne, baršunaste, bradavičaste do zrnaste. Hife s površine plašta mogu biti jednostavne ili razgranate, a boja može biti crna ili u raznim nijansama narančaste, žute ili smeđe boje.

Hartigova mreža koja se sastoji od labirinta hifa između korijenskih stanica karakteristična je struktura za ektomikorizne asocijacije. Korelacija između debljine Hartigove mreže i odgovora rasta domaćina na specifične sojeve inokuliranih gljiva podupiru hipotezu da je upravo Hartigova mreža primarna zona prijenosa hranjivih tvari u ovakvim zajednicama (Burgess i sur., 1994; Dell i sur., 1994). Postoje dvije osnovne morfološke kategorije ektomikorize: (a) asocijacije tipične za kritosjemenjače (*Eucalyptus*, *Betula*, *Populus*, *Fagus* i *Shorea*) s Hartigovom mrežom koja je ograničena na stanice epiderme i (b) one tipične za golosjemenjače poput članova porodice *Pinaceae* kod kojih Hartigova mreža zauzima više slojeva stanica u korteksu korijena (Alexander i Högberg, 1986; Kottke i Oberwinkler, 1986; Massicotte, Ackerley i Peterson, 1987).

Ektomikorizu karakterizira velika raznolikost gljiva koje sudjeluju u njezinom nastanku. Molina i sur. (1992.) procijenili su da između 5 i 6 000 vrsta gljiva tvori ovaj tip mikorize. Ektomikorizne gljive uglavnom pripadaju *Basidiomycetama* (npr. *Amanita muscaria*, *Hebeloma cylindrosporum*, *Paxillus involutus*), ali pripadaju im i neke *Ascomycete* (*Tuber borchii*, *Cenococcum geophilum*) (Zrnić i sur., 2017). Broj domaćina ovih gljiva je prilično malen, ali ova skupina obuhvaća biljke koje su od velikog ekonomskog i globalnog značaja. To su uglavnom višegodišnje drvenaste biljke, drveće i grmlje hladnih, umjerenih borealnih ili planinskih šuma i vrste arktičkih alpskih zajednica grmlja.

Ektomikorizne gljivice biljkama omogućuju veći pristup organskom dušiku vezanom u hitin, proteine i tanine, a one pridonose i ishrani biljke fosforom (Mayor i sur., 2014). Dakle, osim što poboljšavaju unos mineralnih hranjiva u biljkama, one utječu na svoga domaćina na još mnogo načina. Prema Ekwebelamu i sur. (1983.), ektomikoriza može stimulirati fotosintezu, translokaciju produkata fotosinteze do korijena te dovesti do povećanja koncentracija šećera u samom korijenu. Također, lakšim usvajanjem hranjiva moguće je utjecati na kemijski sastav grožđa i vina kroz sastav šećera, organskih kiselina te sintezu polifenolnih spojeva.



Slika 1: Shematski prikaz ektomikorize

Izvor: https://images.slideplayer.com/25/7703450/slides/slide_1.jpg

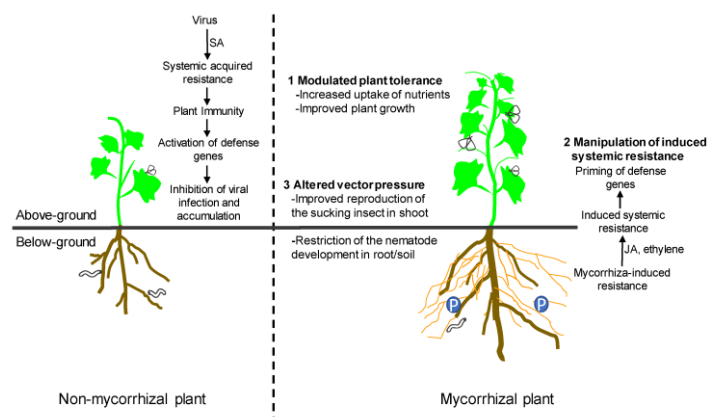
2.2. Utjecaj mikorize na vinovu lozu

Brojna istraživanja pokazuju da vinova loza čiji je korijen inokuliran mikoriznim gljivama raste znatno brže od kontrolnih biljaka. Prema istraživanju Ozdemira i sur. (2010.), mikoriza utječe na vegetativni rast loze. Naime, uočeno je značajno povećanje u dužini i promjeru mladica te povećanje sadržaja fosfora i cinka u listovima loze. Naravno, na povećanje određenih parametara utječe genotip loze, vrsta mikoriznih gljiva pa i podloga vinove loze. Naglašavaju da pozitivan učinak mikoriznih gljivica jako ovisi o intenzitetu uspostavljene simbioze, kao i stopama kolonizacije samog korijena. Analiza sadržaja hranjivih tvari pokazala je da su koncentracije fosfora znatno više u listovima inokuliranih biljaka u odnosu na kontrolne biljke. Biljka usvaja fosfor u obliku topivog anorganskog fosfata Pi (HPO_4^{2-}) koji je rezultat sporog raspada organskih oblika transformiranih od strane mikroorganizama tla. Dostupnost takvog oblika fosfora je općenito niska zbog njegove spore difuzije kroz otopinu tla (Nye i Tinker, 1977). Kod mikorize, ekstraradikalni micelij formira veliku mrežu izvan zone iscrpljivanja korijena, čime se skraćuje udaljenost za difuziju anorganskog fosfata u tlu pa ga biljka samim time i lakše usvaja (Harrison, 1999). Također, istraživanje je pokazalo i znatno povećanje cinka u listovima istraživanih genotipova. Od svih nutritivnih elemenata, cink ima posebnu važnost u fiziologiji biljke. Djeluje kao metalni sastojak esencijalnih enzima, kao i funkcionalan, strukturalan ili regulatorni kofaktor te se povezuje s metabolizmom saharina, fotosintezom i sintezom proteina (Val i sur., 1987).

Od svih elemenata tla koje usvaja korijen vinove loze, dušik je jedini koji najviše utječe i na razvoj loze i na sastav grožđa. Adekvatna opskrba dušikom je važna jer direktno utječe na izgradnju novih stanica u procesu rasta i razvoja svih dijelova trsa (Reynolds, 2010). Poznato je da mikorizne zajednice igraju važnu ulogu i u usvajanju dušika. Mikorizne gljivice su sposobne usvajati i NO_3^- i NH_4^+ oblik kao i anorganski dušik. Osim anorganskog dušika, mikorizne gljivice mogu izvući znatne količine dušika iz raspadnutih organskih materijala (Hodge i Fitter, 2010).

Stanje vode u tlu i njeno korištenje od strane biljke presudno je za rast vinove loze i prinos, a na kraju i za samu kvalitetu grožđa. Međutim, vinogradi su uglavnom smješteni u područjima suhe klime tijekom sezone rasta, pa često dolazi do vodnog deficita. Mikorizne gljivice mogu poboljšati unos vode i hranjiva biljci u isto vrijeme (Kohler i sur., 2008; Adesemoye i sur., 2008). Učinkovit razvoj vanjskog micelija i/ili arbuskula može biti od presudne važnosti u sušnim uvjetima. Iako ne postoji dokaz o direktnom transferu vode biljci preko hifa mikoriznih gljivica, u nekoliko je istraživanja zabilježeno veće korištenje vode kod mikoriznih biljaka, uključujući vinovu lozu. Kod jednogodišnje loze čiji je korijen koloniziran mikoriznim gljivama zabilježena je veća stopa fotosinteze, veća stopa transpiracije, bolja provodljivost ksilema u odnosu na kontrolne biljke, iako nije zabilježeno povećanje u biomasi ili mineralnoj ishrani (Van Rooyen i sur., 2004).

Navodi se kako je mikoriza važna i za zaštitu od biotskih i abiotskih stresova. Većina sorata vinove loze podložna je kriptogramskim bolestima poput plijesni, koja uzrokuje velike gubitke u prinosu i zahtijeva brojne tretmane fungicidima. Fungicidi su često samo djelomično efektivni u borbi protiv ovakvih bolesti, a štetni su za ljudsko zdravlje i okoliš. Biljke mogu razviti bolji obrambeni mehanizam nakon inokulacije mikoriznim gljivama. Ovakva otpornost izazvana mikorizom može pružiti sistemsku zaštitu od širokog raspona biotrofnih i nekrotrofnih patogena, nematoda i određenih člankonožaca (Cameron i sur., 2013).



Slika 2: Utjecaj mikorize na vinovu lozu

Izvor: https://www.mdpi.com/viruses/viruses-11-00534/article_deploy/html/images/viruses-11-00534-g001.png

3. Materijali i metode

3.1. Pokusni nasadi

Pokus je postavljen na području ZOI Plešivica na tri lokacije. Na OPG-u Gregorić, OPG-u Majcenović te OPG-u Cibani. Na svakoj lokaciji cjevivo je aplicirano na 100 trsova sorte 'Portugizac', pri čemu je isti broj trsova poslužio kao kontrola.

Podregija Plešivica smjestila se na južnim, istočnim i zapadnim pristrancima i obroncima Samoborskog gorja. Kroz podregiju se u smjeru istok-zapad proteže Žumberačko gorje, na čijim su istočnim, južnim i zapadnim obroncima smješteni vinogradi (Maletić i sur., 2008). Žumberačka gora za koju su karakteristični obronci koji čine „amfiteatre“ zahvaljujući kojima vinogradi imaju bolju ekspoziciju, štiti od prodora hladnog zraka sa sjevera. Vinogradi se u ovoj podregiji penju i do 400 metara nadmorske visine i u većini su vrlo povoljnih ekspozicija. Prevladava kontinentalna klima s izraženim mikroklimatskim obilježjima, koja pogoduje vinogradarstvu, jer se broj sunčanih sati penje i do 1 900 godišnje, a godišnja količina oborina je najčešće u rasponu od 1 000 do 1 100 mm. Plešivica je poznata po raznolikosti geoloških supstrata i tala koja su se na njima razvila. Najčešći supstrati su dolomiti, pontijski lapori i diluvijalne naslage, a na njima su se razvila slabo, umjereno i jako podzolirana smeđa tla, rendzine te mineralno-karbonatna tla.



Slika 3: Plešivička vinogorja

Izvor: https://plesivica.hr/wp-content/uploads/2017/10/Panorama_1920x500.jpg

3.2. Klima

Vinova loza je vrsta koja se uzgaja u različitim klimatskim zonama u svijetu koje omogućavaju idealne uvjete za proizvodnju visokokvalitetnog grožđa, a samim time i vina. Klima je odlučujući čimbenik u uzgoju vinove loze na određenom području, vinogorju i na pojedinom položaju (Mirošević i sur., 2008). Njezin je uzgoj rentabilan u područjima umjerenog klimatskog pojasa sa srednjim godišnjim temperaturama između 10 i 20 °C (Maletić i sur., 2008). Za postizanje pune zrelosti grožđa i završetak cijelog vegetacijskog ciklusa potrebna je određena suma efektivnih temperatura. Temeljem tih suma Winkler (1974.) je

napravio podjelu svih svjetskih vinogradarskih područja na pet klimatskih zona. Zbog različitosti klimatskih i pedoloških uvjeta, zemljopisna su područja uzgoja vinove loze u Republici Hrvatskoj podijeljena na tri regije: Zapadna kontinentalna Hrvatska, Istočna kontinentalna Hrvatska i Primorska Hrvatska koje korespondiraju s vinogradarskim zonama proizvodnje B, C I i C II. Od 2013. godine vinogradarske zone u Hrvatskoj podijeljene su na: 1. vinogradarska zona B koja obuhvaća područja zasađena vinovom lozom u podregijama Moslavina, Prigorje-Bilogora, Plešivica, Pokuplje i Zagorje-Međimurje; 2. vinogradarska zona C I obuhvaća područja zasađena vinovom lozom u podregijama Hrvatsko Podunavlje i Slavonija; 3. vinogradarska zona C II obuhvaća područja zasađena vinovom lozom u podregijama Hrvatska Istra, Hrvatsko primorje, Dalmatinska zagora, Sjeverna Dalmacija i Srednja i Južna Dalmacija (Prša i sur., 2019). Unutar svake od njih ekološki se izdvajaju manje cjeline, regionalizacijom određene kao podregije. Regionalizacija vinogradarskih područja kao i imena vinogradarskih regija, podregija i vinogorja navedena su u Zakonu o vinu (NN 96/03) i Pravilniku o vinogradarskim područjima (NN 159/04).

Podregija Plešivica stoga spada u vinogradarsku zonu B. Opća klimatska obilježja ove podregije su slična većini onih u sjeverozapadnoj Hrvatskoj. Dakle, klima ovog područja svrstava se u umjereno kontinentalnu. Kontinentalna klima s visokim dnevnim i nižim noćnim temperaturama u vrijeme prije berbe grožđa izrazito je povoljna za proizvodnju svježih, pitkih vina s dobrim sadržajem i sastavom kiselina, izraženih voćnih i cvjetnih primarnih aroma (Uredba 607/09).

Najvažniji klimatski čimbenici za uzgoj vinove loze su temperatura, vlaga i svjetlost.



Slika 4: Vinogradarske zone u Republici Hrvatskoj

Izvor: <https://www.pmf.unizg.hr/news/43752/IVANP-poster-VODICE-2019%20pptx%20-%20kraj.pdf>

3.2.1. Temperatura

Temperatura je jedan od neophodnih uvjeta za razvoj vinove loze. Temperatura i rast vinove loze pod velikim su utjecajem geografske širine koja utječe na periodičnost i intenzitet Sunčevog zračenja. Rast vinove loze podjednako je kontroliran godišnjim temperaturnim

ciklusom (Jackson, 2008). Srednja godišnja temperatura osnovni je pokazatelj i trebala bi se kretati u rasponu od 9 do 21 °C (Maletić i sur., 2008). Za pojedine faze godišnjeg biološkog ciklusa postoje optimalne te minimalne i maksimalne temperature pri kojima pojedini procesi još uvijek mogu teći. Vegetacija u proljeće počinje tek kada srednje dnevne temperature dosegnu 10 °C, a ta se temperatura naziva biološka nula. Otprilike osam tjedana kasnije, kada srednja dnevna temperatura poraste na 20 °C, počinje pupanje te rast i razvoj vegetacije. Nakon toga nastupa cvatnja za koju su optimalne temperature između 20 i 30 °C uz povoljnu vlagu zraka i oplodnja. Niže temperature usporavaju oprašivanje, kao i oslobađanje polena, klijanje i rast polenove cjevčice (Jackson, 2008). Stoljećima je poznato da temperatura izrazito utječe na dozrijevanje i kvalitetu grožđa. Gledajući razine šećera i jabučne kiseline, optimalni temperaturni raspon za dozrijevanje grožđa je između 20 i 25 °C, no za sintezu antocijana pogodnije su nešto niže temperature (Kliwer i Torres, 1972). Iako hladniji položaji mogu biti poželjniji u toplim i vrućim klimatskim područjima, dugotrajno izlaganje temperaturama ispod 10 °C može izazvati nepovratna fiziološka oštećenja, posebice usporeno dozrijevanje (Becker, 1985). Pojava mraza i niskih temperatura može biti vrlo štetna, osobito za vrijeme pupanja i cvatnje. Temperatura od -2 °C može uništiti mlade listiće, dok će temperatura od -4 °C oštetiti pupove koji se tek otvaraju (Jackson i Schuster, 1981). Zbog toga je za područja gdje je veća učestalost mrazova u proljeće potrebno birati sorte s kasnijim kretanjem, odnosno sorte s kraćom vegetacijom.

Također, temperatura ima i značajan utjecaj na sintezu antocijana (Kliwer, 1977) i naknadnu stabilnost boje u vinu. Kod nekih sorata, sintezi antocijana pogoduju više dnevne temperature i hladnije noći (20-25 °C, odnosno 10-15 °C). S druge strane, temperature iznad 35 °C često potiskuju ili inhibiraju sintezu antocijana (Kliwer, 1977; Spayd i sur., 2002). Osim toga, visoke temperature privremeno povećavaju stopu disanja. U prezrelom voću, visoke temperature mogu povećati koncentracije šećera povećanjem gubitka vode. Utjecaj temperature na akumulaciju aromatskih spojeva privukao je malo pažnje. Smatra se da hladniji uvjeti (u područjima tople klime) potiču razvoj arome. Ovo može biti posljedica smanjenog rasta i sporijeg disanja, što vodi do preusmjeravanja hranjivih tvari prema sekundarnim metaboličkim putevima koji su odgovorni za nastajanje većine aromatskih spojeva.

Srednja godišnja temperatura na Plešivici kreće se od 10 do 11 °C, sume temperature od 1 300 do 1 400 °C. Apsolutni se minimumi kreću do -26 °C, dok se maksimumi kreću do 38 °C (Maletić i sur., 2008). Prosječna suma efektivnih temperatura omogućava dozrijevanje sorata II. i III. epohe.

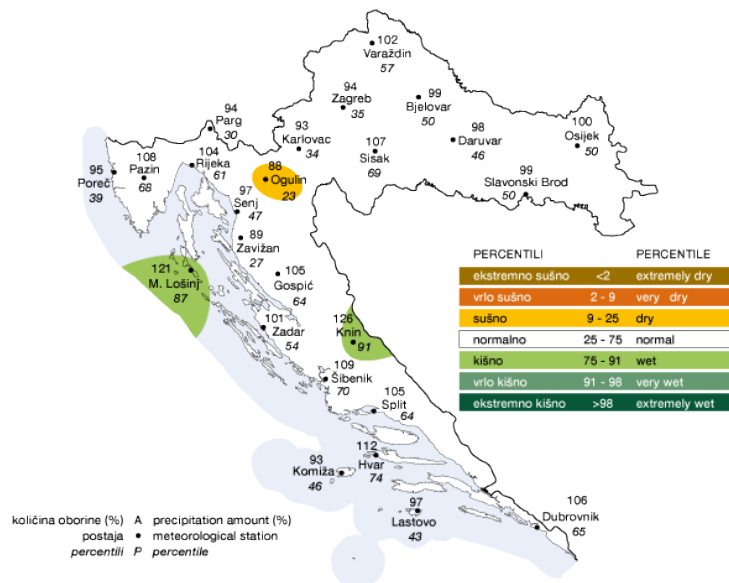
Prema podacima Državnog hidrometeorološkog zavoda (DHMZ) srednja godišnja temperatura zraka za 2018. godinu na području Hrvatske bila je iznad višegodišnjeg prosjeka (1961. – 1990). Cijela je Hrvatska 2018. godine svrstana u kategoriju ekstremno toplo. Gledajući po mjesecima, jedino se izdvaja ožujak koji je gotovo u cijeloj Hrvatskoj bio hladniji od uobičajenog, a temperaturne prilike bile su u kategoriji normalno.

3.2.2. Vlaga

Adekvatna opskrba vlagom je nužna za pravilan tijek svih životnih procesa u vinovoj lozi. Važna je redovita opskrbljenost vodom iz tla, kao i vlažnost zraka. Sadržaj vode u tlu opada kako korijenje izvlači vlagu te ako ta vlaga nije nadoknađena navodnjavanjem ili kišom, loza počinje venuti te dolazi do trajnih oštećenja tkiva. Količina vode koja je potrebna u različitim fazama rasta vinove loze ovisi o sorti i podlozi: međusobnom djelovanju, klimi, tipu i dubini tla, opterećenju usjeva. Navodnjavanje povećava ne samo proizvodnju šećera i fenola u kožici grozda, već i prinos (Matthews i Anderson, 1988). Prinos se općenito brže povećava u odnosu na šećere i fenole. Obzirom da visoki prinos znači nižu kvalitetu grožđa, a naposljetku i vina, količina navodnjavanja ovisi o željenoj kvaliteti krajnjeg proizvoda.

U suhim vinogradarskim područjima mogu se dobiti odlična vina od grožđa s trsova u uvjetima vodnog stresa, sve dok je prinos nizak. Ukoliko se loza uzgaja bez navodnjavanja, ukupna godišnja količina oborina u nekom području, kao i njezin raspored objektivni su klimatski pokazatelj njegove prikladnosti. Količina od 600 do 800 mm oborina na godinu, uz povoljan raspored tijekom vegetacije, potpuno zadovoljava potrebe vinove loze (Maletić i sur., 2008). Prema tome, vrlo je važan raspored kišnih razdoblja tijekom godine. Kiša je potrebna tijekom zime i početkom sezone. Lozi je potrebno osigurati dovoljne količine vode posebno od početka vegetacije do cvatnje te u fazi razvoja zelenih bobica. Međutim, velika količina kiše tijekom ljetnih mjeseci i početkom jeseni u vrijeme berbe može biti štetna jer rezultira u vodenastim grozdovima, pucanjem kožice bobica te zarazom gljivičnim bolestima (plamenjača, pepelnica). Uz to, obilna vlažnost potencira bujan vegetativni rast, pri čemu se asimilati nepotrebno troše na rast mladica umjesto dozrijevanje grožđa i drva. U vlažnijim područjima, suhe godine mogu često rezultirati najboljim berbama (Spellman, 1999).

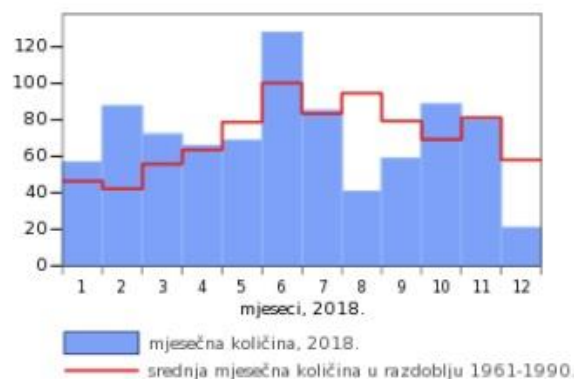
Plešivicu obično karakterizira obilje vlage tijekom cijele godine, a godišnja količina oborina je najčešće u rasponu od 1 000 do 1 1000 mm (Maletić i sur., 2008). Prema podacima DHMZ-a, analiza godišnjih količina oborina izraženih u postotcima (%) višegodišnjeg prosjeka (1961. – 1990.) pokazuje da je u 2018. godini na području Zagreba količina oborina bila jednaka prosjeku. Područje Plešivice svrstano je u kategoriju normalno.



Slika 5: Odstupanje količina oborina u 2018. godini

Izvor: <https://klima.hr/ocjene/2018/2018oborina.gif>

Ukupna godišnja količina oborina za 2018. godinu na području Zagreba iznosila je 1 707,2 mm, dok je ukupna vegetacijska količina oborina iznosila 616,2 mm. Količina je oborina bila optimalna za vinovu lozu. U proljetnim je mjesecima, kada loza ima velike potrebe za vodom, bilo dovoljno oborina čime su zadovoljene njezine potrebe za normalan rast i razvoj. Mjesec s najviše količina oborina bio je lipanj s 127,8 mm i nešto većim količinama od prosjeka, što se povoljno odrazilo na vinovu lozu obzirom da u tom periodu dolazi do rasta i razvoja bobica kada je dovoljna količina vode ograničavajući faktor.



Slika 6: Mjesečna količina oborina za 2018. godinu, Zagreb-Maksimir

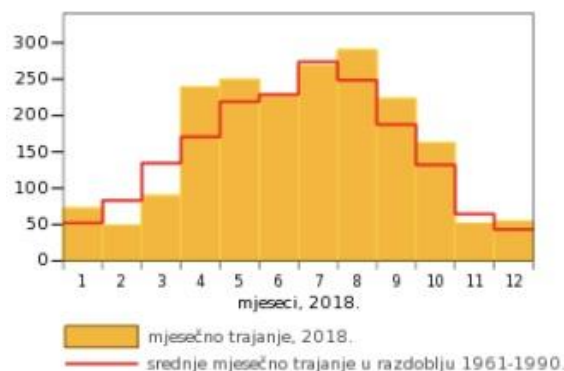
Izvor: https://klima.hr/k2/2018/zagreb_maksimir_12_2018.png

3.2.3. Svjetlost

Kao izvor energije za fotosintezu, Sunčeva svjetlost je bez sumnje najvažniji klimatski čimbenik koji utječe na razvoj bobica. Tereni koji nagnju prema Suncu (prema jugu na

sjevernoj hemisferi i sjeveru na južnoj hemisferi) obično su poželjniji za uzgoj vinove loze u odnosu na ravne terene i one koji nisu okrenuti prema Suncu. Količina je insolacije veća što je teren više nagnut prema Suncu. Insolacija, odnosno broj sati sijanja Sunca uzima se kao mjera svjetlosnih obilježja nekog područja. Sunčevo osvjetljenje neophodno je za pravilno odvijanje svih fenofaza. Direktno je Sunčevo osvjetljenje važno za diferencijaciju rodni pupova jer osvijetljeni pupovi nose veći broj začetaka cvatova što označava veću rodnost u sljedećoj vegetaciji. Visoke količine svjetla neophodne su za dozrijevanje grožđa osiguravajući potreban izvor energije za fotosintezu. Toplo, sunčano vrijeme osigurava brzo zrenje, više šećere i nižu kiselost grožđa, bolji aromatski sastav i obojenost. Za rodnost i kakvoću vinove loze je uz insolaciju važna i valna duljina svjetla. Za fotosintetsku su aktivnost najpovoljnije crvene i plave valne duljine koje potiču rast mladica i lišća te rodnost. Vanjski listovi apsorbiraju veći dio fotosintetski aktivne radijacije zbog čega unutarnji listovi dobivaju znatno manje svjetla koje je lošije kvalitete u smislu fotosinteze, a ona se sastoji od zelenog dijela spektra. Da bi postigli maksimalnu fotosintetsku aktivnost kod većeg broja listova potrebno je raznim ampelotehničkim zahvatima, kao što su zahvati zelenog reza, osigurati bolje osvjetljenje unutrašnjosti trsa. Izlaganje grožđa Suncu je esencijalno za sintezu flavonola, a može utjecati i na sintezu antocijana, izazivajući duboku obojenost crnih sorata (Rojas-Lara i Morrison, 1989). Također, grožđe izloženo Suncu pokazuje višu titracijsku kiselost i koncentracije vinske kiseline u odnosu na grožđe u sjeni (Smith i sur., 1998).

Uzimajući u obzir podatke DHMZ-a za 2018. godinu, na području Zagreba bilo je blizu 2 000 sati sijanja Sunca. Mjesec s najviše sati sijanja Sunca bio je kolovoz i to sa 269 sati. Na slici 6 vidljivo je da je broj sati sijanja Sunca u 2018. godini bio malo viši od višegodišnjeg prosjeka (1961. – 1990).



Slika 7: Broj sati sijanja Sunca za 2018. godinu izražen u satima, Zagreb-Maksimir

Izvor: https://klima.hr/k2/2018/zagreb_maksimir_12_2018.png

3.3. Tlo

Vinova je loza u svijetu raširena na različitim tipovima tala. Uz ostale okolišne čimbenike, i tlo ima važnu ulogu u njezinom uzgoju jer utječe na kakvoću i specifičnost vina

određenog područja. Fizikalna, kemijska i biološka svojstva zemljišta, uključujući topografiju i klimu (vodni, svjetlosni i temperaturni režim), zajednički utječu na gospodarski potencijal tla, a tehnologija (agrotehnika) i znanje ljudi na njegovu produktivnost. Za poljoprivrednu proizvodnju najvažnija je efektivna dubina tla u kojoj korijen nalazi vodu, kisik i neophodna hranjiva uz pomoć korisnih mikroorganizama (rizoflora). Na rast i razvoj vinove loze utječu i tekstura i struktura tla. To su svojstva koja su međusobno čvrsto povezana i predstavljaju vrlo značajan čimbenik rasta biljaka i tvorbe prinosa. Povoljna struktura i tekstura tla označavaju dobru poroznost i dreniranost tla, a to znači dobre uvjete za rast korijena te povoljan vodozračni režim. Važno svojstvo zasnovano na teksturalnom karakteru tla je zadržavanje topline. Na fino teksturiranim tlima, velik dio apsorbirane topline tijekom izlaganja Suncu pretvara se u vodu kako ona isparava. Suprotno tome, kamenita tla obično zadržavaju većinu apsorbirane topline unutar svojih strukturnih komponenata (Jackson, 2008). Od velike je važnosti i struktura tla koja se često odnosi na udruživanje čestica tla u složene agregate. Struktura utječe na prozračnost, kao i dostupnost vode i mineralnih hranjiva. Tla fine strukture zadržavaju više vode u odnosu na tla grube strukture zbog veće površine čestica i mnoštvu kapilarnih pora (Vukadinović, 2018). Kod nestrukturnih, jako zbijenih ili tala zasićenih vodom, nedostaje kisik potreban za disanje korijena (anoksija) i razlaganje organske tvari tla, odnosno mikrobiološku aktivnost. Vinova loza prilično loše podnosi ekscesivnu vlagu u tlu, pa u takvim lošim dreniranim tlima može doći do gušenja korijena. Takva se tla teže zagrijavaju te na njima dolazi do kasnijeg početka vegetacije (Maletić i sur., 2008). Poznato je da vinova loza daje bolju kakvoću na lakšim, škrtijim i kamenitim tlima u odnosu na duboka, bogata tla gdje je loza bujna i visoko produktivna, no grožđe i naposljetku vino nisu visokokvalitetni. Međutim, sposobnost dreniranja tla univerzalna je kvaliteta svih tala koja je primjenjiva na sve tipove klime (Leeuwen i sur., 2006).

Uz navedena fizikalna svojstva tla, za rast i razvoj vinove loze važan je i njegov kemijski sastav, odnosno sadržaj biogenih ili esencijalnih elemenata. Makroelementi koje loza treba u velikim količinama su dušik, fosfor i kalij, dok su od mikroelemenata za njezin opstanak nužni željezo, mangan, bor, kalcij, magnezij i drugi. Na opskrbljenost tla hranjivima možemo značajno utjecati gnojidbom pri čemu ju prilagođavamo potrebama loze u pojedinim razvojnim fazama vodeći računa i o dozaciji (Maletić i sur., 2008).

pH vrijednost tla jedan je od najpoznatijih čimbenika koji utječe na topljivost minerala i samim time njihovu dostupnost. Također, pH je vrlo važno svojstvo tla kojim se izražava stupanj njegove kiselosti ili lužnatosti. Sorte vinove loze na vlastitom korijenu podnose visok sadržaj fiziološki aktivnih karbonata, no to nije slučaj kod američkih vrsta koje se koriste kao podloge. Obzirom da alkalnija tla često susrećemo na vrhunskim vinogradarskim položajima, potrebno je izabrati odgovarajuću podlogu kako bi se ovakva tla mogla koristiti u vinogradarskoj proizvodnji.

U Hrvatskoj nailazimo na raznovrsnost vinogradarskih tala. Prema Faziniću (1997.), vinogradi se na ovom području nalaze na vrlo različitim tlima: na pijescima (otok Susak, Korčula, dio Podravine), degradiranom černoze (Podunavlje), smeđe karbonatnim tlima (Baranja), flišu i laporu (Dalmacija, Istra, Plešivica), podzolu i pseudogleju (zapadno područje kontinentalne Hrvatske) te crvenicama (Dalmacija, Istra).

3.3.1. Tlo pokusnih vinograda

Plešivica je dio jugozapadnog nisko planinskog dijela Žumberačkog gorja, koje pružajući se u smjeru istok-zapad, ovo područje brani od prodora hladnih sjevernih vjetrova. Vinogradi na području Plešivice nalaze se na tlima razvijenim na laporu te na pseudoglejima. Iako tla u smislu plodnosti nisu svrstana u najvišu kategoriju, dobrog su kapaciteta za vodu, što uz južne i jugozapadne ekspozicije terena s čak 1 900 sunčanih sati godišnje, sumom efektivnih temperatura tijekom vegetacije od 1 250 do 1 450 °C i godišnjom količinom oborina od oko 1 070 mm, od čega >55 % padne tijekom vegetacije, čini vrlo pogodne uvjete za vinogradarstvo (Uredba 1308/13).

Sva tla u pokusnim vinogradima su neutralne, slabo alkalne do alkalne reakcije. Nakon aplikacije cjepiva, mikorizne su gljive blago korigirale pH vrijednost tla prema nižim vrijednostima čime se povećala pristupačnost i mogućnost usvajanja mikroelemenata poput bakra, željeza, mangana i cinka. Opskrba tla humusom u početnom uzorkovanju bila je slaba ili vrlo slaba, no analiza tla nakon primjene mikorize pokazala je bolje rezultate u pogledu opskrbljenosti tla humusom. Također, sadržaj glavnih biogenih elemenata dušika, fosfora i kalija u tlu bio je prilično nizak prije primjene mikorize, ali se značajno povećao nakon njezine aplikacije.

3.4. Sorta 'Portugizac'

'Portugizac' je sorta vinove loze pogodna za područja umjerene i hladnije klime gdje daje kvalitetna vina. Sorta je najviše raširena u Njemačkoj, Austriji, Francuskoj, Hrvatskoj, Sloveniji, Mađarskoj, Češkoj Republici, Slovačkoj te Sjevernoj Italiji (Ambrosi i sur., 1994). U Austriji se najviše uzgaja u Niederösterreichu, glavnom austrijskom centru proizvodnje ove sorte. S druge strane, u Njemačkoj se najviše uzgaja u Ahr-u, Rheinhessenu i Pfalz-u. U Mađarskoj ga uglavnom nalazimo u Villány-u gdje je jedna od mnogih sorata dopuštenih u proizvodnji vina Egri Bikaver-legendarnog mađarskog vina „Bikova krv“. U Hrvatskoj, 'Portugizac' je preporučena sorta crnoga grožđa u svim regijama kontinentalne Hrvatske. Najviše je rasprostranjen u sjeverozapadnoj Hrvatskoj (Mirošević i sur., 2008), a najbolje rezultate daje u podregiji Plešivica.

Što se tiče podrijetla ove sorte, postoje različite teorije. U starijoj se literaturi navodi da potječe iz Austrije, iako mu ime sugerira da dolazi iz Portugala. Smatra se da je ovu sortu 1772. godine u svoju domovinu donio austrijski baron von Fries iz Porta te ju zasadio u regiji Vöslau.

Odatle se sorta proširila u nekoliko europskih vinogradarskih područja (Regner i sur., 1999). Ipak, kasnije je razvojem tehnologije DNK analizom dokazano portugalsko podrijetlo ove sorte. Riječ je o sorti *Português Azul* koja se uzgaja u planinskim područjima Portugala, često i na više od 1 000 metara nadmorske visine. Nastala je križanjem dviju sorata, *Blauer Zimmettraube* x *Sylvaner*.

Sorta ima nekoliko sinonima kao što su: „*Voeslauer*“, „*Badner*“, „*Autrichien*“, „*Feslauertraube*“, „*Oporto*“, „*Kekoporto*“, „*Blauer Portugieser*“, „*Modry Portugal*“, „*Portugizac Plavi*“.

Karakterizira ju okrugao list s pet do sedam režnjeva. Grozd je srednje velik s zbijenim okruglim bobicama tamno plave boje, konusnog oblika ponekad s izraženim krilcima. Ova sorta zahtijeva pažljivo održavanje u vinogradu. Osjetljiva je na zimski mraz, *Botrytis* i peronosporu, a veliki problem predstavlja i siva plijesan vinove loze.

'Portugizac' karakteriziraju visoki prinosi koji rezultiraju slabijom kvalitetom vina (niski sadržaj šećera, visok sadržaj kiselina) i slabijem intenzitetu boje grožđa i vina (Gamero i sur., 2014). Obično daje slaba, svijetlo obojena suha crna vina s niskim sadržajem alkohola (oko 11 % vol). Vina obično sadrže 7 g/L ukupne kiselosti, 25 g/L ukupnog ekstrakta, a pH vrijednost vina se kreće oko 3,4 (Nemanič, 1999). Također, vina dozrijevaju vrlo brzo te se konzumiraju mlada, samo nekoliko mjeseci nakon berbe jer nisu pogodna za duže dozrijevanje. Karakterizira ih ugodna kiselost te ugodne arome crvenog ribizla, maline i jagode. Sorta se koristi i za proizvodnju pjenušavih i rosé vina. U Njemačkoj se koristi za proizvodnju posebnog stila rosé vina zvanog *Weißherbst*.



Slika 8: Grozdovi sorte 'Portugizac'
Izvor: Osobni arhiv

3.5. Plan pokusa

Pokus je postavljen na području podregije Plešivica, na tri lokacije. U vinogradima OPG-a Cibani, Majcenović te Gregorić u svrhu utvrđivanja utjecaja ektomikoriznog micelija na korijen vinove loze te kasnije njegovog utjecaja na kemijski sastav vina 'Portugizac'. Istraživanje je provedeno 2018. godine, a fizikalno-kemijska i senzorna analiza vina provedene su na Zavodu za vinogradarstvo i vinarstvo Agronomskog fakulteta u Zagrebu iste godine.

Projekt ovog istraživanja započeo je 2016. godine kada je provedena aplikacija cjepiva naziva „Mykoflor“ tvrtke Bio-budućnost d.o.o. iz Zagreba u vinogradima spomenutih proizvođača. Cjepivo predstavlja živi ektomikorizni micelij, u obliku gela koji je kao takav spreman za trenutnu simbiozu s biljkom. Cjepiva su proizvedena od uzoraka korijena iz odabranih ekosistema divlje loze iz cijele Hrvatske i Europe. U ovom je pokusu mikorizacija izvršena uz pomoć ručnog zemljišnog injektora kojim je aplicirana suspenzija mikorize u korijen biljke. U cjepivu se nalaze živi mikorizni miceliji spremni za trenutno nastanjenje korijenja, koji se nalaze u njegovom dosegu. Mikoriza ima brojne pozitivne utjecaje na vinovu lozu. Prema proizvođačima koji su primijenili ektomikorizna cjepiva u svoje vinograde, ona imaju pozitivan utjecaj na rast vinove loze u uvjetima vodnog stresa, loza je otpornija na sušu, bolesti i patogene korijenskog sustava, a znatno je povećana i kvaliteta vina.

U ovom je pokusu na svakoj od tri lokacije cjepivo aplicirano na 100 trsova sorte 'Portugizac', pri čemu je isti broj trsova poslužio kao kontrola. Grožđe je pobrano u trenutku pune tehnološke zrelosti. Pobralo se oko 200 kg grožđa na način da se pobrao jednak broj trsova mikorize i kontrole. Prilikom berbe pazilo se da trsovi sa kojih je grožđe brano budu reprezentativni. Berba je obavljena rano ujutro kada temperatura nije bila previsoka. Grožđe je potom prevezeno u pokušalište Agronomskog fakulteta Jazbina, gdje je izvršena analiza grožđa prije same primarne prerade. Određena je koncentracija šećera i organskih kiselina u trenutku berbe prema metodama O.I.V.-a (2001). Kakvoćom se izdvojilo grožđe OPG-a Gregorić uslijed visoke koncentracije šećera te relativno dobrog omjera pojedinačnih organskih kiselina. Visoke koncentracije pokazale su se i kod proizvođača Cibani, no obzirom na loše rezultate u prijašnjim godinama, lošeg stanja vinograda i grožđa u trenutku berbe, ovi rezultati nisu pouzdani. Grožđe je prerađeno prema tehnologiji proizvodnje crnih vina. Vinifikacija je provedena uz dodatak pektolitičkog enzima Lalvin HC koji utječe na lakše bistrenje mošta i ekstrakciju komponenti boje i arome iz bobica. Inokulacija je izvršena s komercijalnim sojem kvasca Uvaferm 299 čija je rehidracija provedena uz dodatak hrane za kvasac pod nazivom Goferm Protect. Primijenjena je klasična maceracija masulja u trajanju od 7 dana pri temperaturi od 20 °C radi optimalnog izdvajanja polifenolnih spojeva. Masulj je potom isprešan uz dodatak hrane za kvasac Fermaid koja je osigurala uvjete za daljnju razgradnju šećera. Tijekom cijelog postupka vinifikacije, kontrolirana je temperatura fermentacije koja je u fazi tihog vrenja bila 16 °C. Po završetku fermentacije, sva vina su pretočena te sulfirana dodatkom 5 %-tne otopine sumporaste kiseline te je u njima

provedena fizikalno-kemijska analiza. U svakom je vinu određen alkohol, ukupni ekstrakt, reducirajući šećeri, ekstrakt bez šećera, ekstrakt bez šećera i nehlapivih kiselina, ukupne kiseline, hlapive kiseline, pH vrijednost, ukupni i slobodni SO₂ i pepeo. Također, provedena je analiza polifenolnog sastava vina, kao i senzorna analiza svih varijanti.



Slika 9: Grožđe iz pokusnih vinograda spremno za primarnu preradu
Izvor: Osobni arhiv

3.6. Metode kemijske analize vina

Kemijske analize mošta i vina provode se po istovjetnim postupcima koji su na prijedlog OIV-a (Međunarodne organizacije za lozu i vino sa sjedištem u Parizu) sastavni dio svakog vinskog zakona. U skladu sa standardiziranim metodama analize prema OIV-u, donijet je Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina (NN 106/04) u kojem su propisane fizikalno-kemijske metode za ispitivanje udovoljavanja temeljnim zahtjevima kakvoće, odnosno određivanje gustoće i relativne gustoće pri 20 °C, alkoholne jakosti, ukupnog suhog ekstrakta, reducirajućih šećera, pepela, pH vrijednosti, ukupne kiselosti, hlapive kiselosti, nehlapive kiselosti, slobodnog i ukupnog sumpornog dioksida.

3.6.1. Određivanje gustoće i relativne gustoće pri 20 °C

Gustoća je masa vina ili mošta po jedinici volumena pri temperaturi od 20 °C. Označena je simbolom $P_{20^{\circ}\text{C}}$ i izražava se u gramima po mililitru. Relativna gustoća pri 20C/20 °C, odnosno specifična težina pri 20 °C prikazuje se kao omjer gustoće određenog volumena vina ili mošta pri 20 °C prema gustoći istog volumena vode pri istoj temperaturi (NN 106/04).

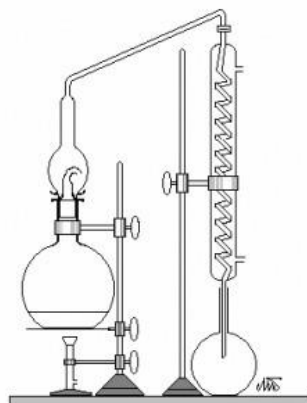
Za mjerenje gustoće i relativne gustoće pri 20 °C na pokusnom uzorku koriste se referentne metode (piknometrija) ili uobičajene metode (hidrometrija ili denzitometrija uporabom hidrostatske vage). Kod referentne metode koristi se piknometar od Pyrex stakla, volumena

oko 100 ml s odvojivim brušenim termometrom koji je kalibriranim na desetinke stupnja od 10 do 30 °C. S druge strane, kod uobičajenih metoda koriste se hidrometri koji svojim dimenzijama i podjelom skale moraju odgovarati ISO standardima ili hidrostatske vage s maksimalnim kapacitetom od najmanje 100 g i osjetljivosti 0,1 mg.

3.6.2. Određivanje alkoholne jakosti

Alkoholna jakost izražena volumenom definira se kao broj litara etanola sadržanog u 100 litara vina, pri čemu su oba volumena mjerena pri temperaturi od 20 °C. Izražava se simbolom »% vol« (NN 106/04). Vina obično sadrže od 7 do 16 % vol. alkohola, iako buteljirana vina sadrže od 10 do 14 % vol. Etanol je nesporno najvažniji alkohol u vinu. Iako nastaju male količine u stanicama grožđa tijekom karbonske maceracije, primarni izvor etanola u vinu je naravno fermentacija kvasca. Etanol je presudan za stabilnost, starenje i senzorna svojstva vina. Nadalje, etanol djeluje kao esencijalni reaktant u nastanku nekoliko važnih hlapljivih spojeva te dodaje svoj osebujni miris. Dva su načina određivanja količine etanola u vinu: pomoću ebulioskopa i metodom destilacije (denzimetrijski). Ebulioskopom se određuje alkohol isključivo u suhim vinima. Za slatka vina to nije moguće jer se pri vrenju u kotliću vino pjenu te izlazi na cjevčicu hladionika.

Metoda destilacije koristi se za precizno određivanje alkohola u vinu, a ona se temelji na odvajanju alkohola od drugih sastojaka vina. Količina alkohola određuje se na osnovu specifične težine destilata na 20 °C, $d(20/20)$ nakon destilacije vina do određenog volumena destilata. Prema određenoj formuli izračuna se težina destilata kod 20 °C te specifična težina destilata prema vodi kod 20 °C, $d_{20/20}$. Količina alkohola se iz izračunatih vrijednosti pomoću odgovarajućih tablica očitava u g/L, a potom iz tih vrijednosti vol % alkohola. Rezultati se dobivaju očitavanjem vrijednosti na Riechardovim tablicama.



Slika 10: Određivanje alkoholne jakosti metodom destilacije

Izvor: <https://www.tehnologijahrane.com/wp-content/uploads/2010/12/Destilacija-vina-za-utvr%C4%91ivanje-alkoholne-ja%C4%8Dine-alkoholometrom.jpg>

3.6.3. Određivanje ukupnog suhog ekstrakta

Pod ukupan suhi ekstrakt ili ukupnu suhu tvar spadaju sve tvari koje nisu hlapive pod specifičnim fizičkim uvjetima. Spomenuti fizički uvjeti trebaju biti takvi da tvari koje čine ekstrakt pretrpe što je moguće manje promjene tijekom izvođenja testa (NN 106/04). Ukupan suhi ekstrakt određuje se pomoću denzitometra, a izračunava se indirektno iz relativne gustoće mošta, a za vino iz relativne gustoće bezalkoholnog vina. On predstavlja količinu saharoze koja, otopljena u 1 litri vode daje otopinu iste relativne gustoće kao mošt ili bezalkoholno vino. Izražava se u g/l na jedno decimalno mjesto.

U vinima se određuju i ekstrakt bez šećera (razlika između ukupnog suhog ekstrakta i ukupnog šećera) te rezidualni ekstrakt koji predstavlja vrijednost ekstrakta bez šećera minus vrijednost nehlapivih kiselina izraženih kao vinska. Ekstrakt treba biti određen unutar najbližih 0,5 g, a izražava se u gramima po litri (NN 106/04). Za kvalitetu vina od velike je važnosti sadržaj ekstrakta u vinu. Vina koja su bogata ekstraktom najčešće su puna i harmonična, a njegov sadržaj uvjetovan je nizom faktora. Prvenstveno, to je sortna karakteristika, ali utjecaj ima način berbe, vinifikacije te zdravstveno stanje grožđa.

3.6.4. Određivanje reducirajućih šećera

Svi šećeri koji imaju keto ili aldehidne funkcionalne skupine nazivaju se reducirajući šećeri. Njihovo je određivanje vezano za redukciju alkalne otopine bakar (II) soli (NN 106/04). Tu spadaju glukoza, fruktoza te pentoze. Pentoze ostaju u vinu po završetku fermentacije obzirom da ih kvasci ne koriste tijekom alkoholne fermentacije.

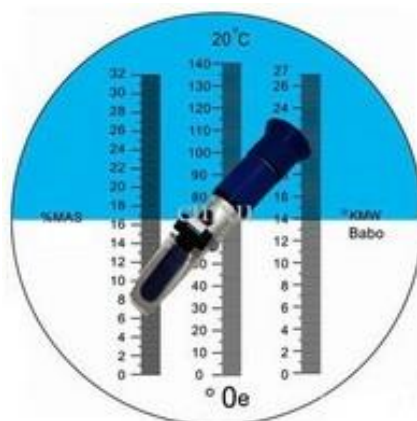
Određuju se po Lane-Eynon i Rebelein metodama koje se temelje na reakciji šećera sa Cu^{++} tartaratom. Titracijom se po završetku reakcije određuje ostatak bakrenih iona što nam daje podatak o sadržaju vezanih iona, a samim time i koncentraciji šećera. Važno je da uzorci koji se analiziraju budu bistri, a crna vina moraju se dekolorizirati. Preporučuje se uklanjanje alkohola, međutim prema nekim autorima nije nužno.

3.6.5. Određivanje sadržaja šećera

Šećer koji u bobicu dolazi u obliku disaharida saharoze hidrolizira se na heksoze (glukozu i fruktozu). Glukoza i fruktoza su glavni šećeri u grožđu, a njihov odnos tijekom dozrijevanja se mijenja, s tim da je u trenutku pune zrelosti najčešće jednak 1. Mogu se pojaviti i drugi šećeri, ali u beznačajnim količinama. Sadržaj šećera varira ovisno o sorti, zrelosti te zdravstvenom stanju grožđa. Također, sadržaj šećera ključan je za rast i metabolizam kvasca. *Saccharomyces cerevisiae* većinu svoje metaboličke energije dobiva od glukoze i fruktoze (Jackson, 2008).

Šećer u moštu određuje se kemijskim i fizikalnim metodama. Pod kemijske metode spadaju metoda po Rebelein-u i metoda po Lane & Eynon-u koje se temelje na kemijskim reakcijama šećera s odgovarajućim reagensima. Iako su kemijske metode preciznije, više su u uporabi fizikalne metode zbog brzine i jednostavnosti te zadovoljavajućih rezultata. Mjere ukupnu toplivu tvar u moštu što je direktni pokazatelj sadržaja šećera, obzirom da šećer predstavlja oko 95 % ukupne toplive tvari mošta. Fizikalne metode podrazumijevaju upotrebu areometra ili moštinih vaga (Babo, Oechsle) i refraktometra.

Sadržaj šećera u ovom istraživanju određen je pomoću refraktometra. To je optički instrument čiji se rad zasniva na prelamanju svjetlosti koja prolazi kroz sloj mošta. Veličina kuta pod kojim se svjetlost lomi zavisi od gustoće mošta. Lom svjetla je veći ako je gustoća veća i obrnuto. Za očitavanje se koriste vrijednosti na granici svijetlog i tamnog polja.



Slika 11: Optički refraktometar i skala za očitavanje
Izvor: https://migros.rs/Asortiman/skala_refraktometar4000.jpg

3.6.6. Određivanje ukupne kiselosti mošta i vina

Ukupnu kiselost čine slobodne organske i neorganske kiseline te njihove soli kao i druge kisele tvari koje se mogu titrirati bazom. Kiselost je jedna od najvažnijih karakteristika vina koja pridonosi ravnoteži okusa. Razina kiselosti ovisi o organskim kiselinama koje su prisutne u grožđu kao što su vinska, jabučna i limunska kiselina te drugim hlapivim kiselinama nastalim tijekom ili nakon alkoholne fermentacije. Vinska i jabučna kiselina čine 70-90 % ukupnih kiselina u grožđu (Jackson, 2002). Ostatak čine druge organske kiseline u različitim koncentracijama (npr. limunska i jantarna kiselina), fenolne kiseline, aminokiseline i masne kiseline.

Kiseline se određuju metodom direktne titracije i metodom potenciometrijske titracije. U ovom je istraživanju korištena metoda direktne titracije koja se bazira na neutralizaciji svih kiselih frakcija otopinom neke lužine. Na osnovi utroška lužine (NaOH) izračunava se ukupna

kiselost pri čemu se bromtimolplavi koristi kao indikator. Ukupna se kiselost izražava u g/L (kao vinska).

3.6.7. Određivanje pojedinačnih organskih kiselina

Organske su kiseline poslije šećera najzastupljeniji spojevi, a najznačajniji predstavnici su vinska, jabučna, limunska i jantarna kiselina. Njihove se koncentracije mijenjaju tijekom dozrijevanja, a u trenutku berbe veći je sadržaj vinske kiseline u odnosu na jabučnu. Spomenute kiseline čine preko 90 % ukupnih kiselina u moštu (Amerine i Joslyn, 1950). Prema tome, ove kiseline imaju značajan utjecaj na pH vrijednost, kao i okus, boju i mikrobiološku stabilnost mošta.

Koncentracije pojedinačnih organskih kiselina određuju se metodom papir kromatografije, tekućinske kromatografije i enzimatski. Kvantitativna analiza organskih kiselina je važna za kontrolu kvalitete vina obzirom da one daju karakterističan okus vinu. U ovom istraživanju korištena je metoda tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC, High Performance Liquid Chromatography). Analiza je provedena uz izokratno eluiranje pri protoku od 0,6 ml/min, temperaturu kolone od 65 °C i detekciju pri 210 nm. Kako bi dobili cjeloviti RI profil (engl. refractive index), vina su direktno injektirana u kolonu bez prethodnog tretiranja uzorka. Kolona koja je korištena bila je kationski izmjenjivač Aminex HPX-87H 300 x 7.8 mm i.d. (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) dok je kao mobilna faza korištena 0.0065 %-tna vodena otopina fosforne kiseline.

3.6.8. Određivanje hlapive kiselosti

Hlapiva kiselost predstavlja homologe octene kiseline prisutnih u vinu u slobodnom obliku ili u obliku soli. Najpoznatije hlapive kiseline prisutne u vinu su octena, mravlja, propionska i maslačna. Nazivaju se hlapivima pošto se mogu organoleptički detektirati. One nastaju tijekom alkoholne fermentacije djelovanjem kvasca *Saccharomyces cerevisiae* ili djelovanjem bakterija iz roda *Lactobacillus*. Pravilnikom o kategorijama proizvoda od grožđa i vina, enološkim postupcima i ograničenjima (NN 114/10) određen je najveći dopušteni sadržaj hlapivih kiselina u vinima prema kojemu sadržaj hlapivih kiselina u crnim vinima izraženih kao octena kiselina ne smije biti veći od 1,2 g/L ili 20 miliekvivalenata po litri.

Metoda određivanja hlapive kiselosti temelji se na njezinom odvajanju iz uzorka putem destilacije u struji vodene pare. Iz uzorka vina najprije se treba izdvojiti SO₂ obzirom da povišen sadržaj može utjecati na točnost rezultata. Dodatkom vodik peroksida uklanja se SO₂ iz uzorka, dok se nastajanje H₂CO₃ iz CO₂ prisutnog u uzorku eliminira degasiranjem samog uzorka prije analize (primjenom vakuuma). Uzorak se prvo destilira vodenom parom, a dobiveni destilat se uz nekoliko kapi fenolftaleina titrira sa 0, 1 N NaOH do pojave svijetlo ružičaste boje koja se mora zadržati barem 30 sekundi. Hlapiva kiselost izražava se u g/L (kao octena).

3.6.9. Određivanje pH vrijednosti

Pod realnom kiselošću mošta ili vina (pH) podrazumijeva se koncentracija slobodnih vodikovih iona u moštu ili vinu. pH vrijednost kod bijelih vina kreće se najčešće između 3,0 i 3,3. Kod crnih vina, pH vrijednost se kreće između 3,3 i 3,6 (Tenorio i sur., 2014). Vrijednost ovisi o stupnju disocijacije pojedinačnih organskih kiselina te koncentraciji kalijevih i natrijevih iona. pH je posebno važan u mikrobiološkom smislu, većina bakterija ne može rasti pri niskoj pH vrijednosti. Također, niske vrijednosti pojačavaju antimikrobna svojstva masnih kiselina.

pH vrijednost mjeri se potenciometrijski pomoću pH metra sa skalom kalibriranom u jedinicama pH tako da omogućava mjerenja do točnosti od najmanje 0,05 pH jedinice. pH metar mora se kalibrirati svakog radnog dana korištenjem dvije pufer otopine koje imaju pH jednak 7,00 i 4,00, ovisno o očekivanom rezultatu mjerenja.



Slika 12: pH metar

Izvor: https://www.frank-adriatic.hr/upload_data/editor/images/edge-HI2002-Beaker_720x720_72_RGB.png

3.6.10. Određivanje sumpornog dioksida u vinima

Primjena SO₂ u vinarstvu seže u daleku prošlost. Stari Rimljani su palili sumporne trake u bačvama, što su kasnije počeli primjenjivati Engleski i Nizozemski trgovci vinima. SO₂ se koristi zbog višestrukih funkcija. Ima antiseptično (baktericidno i fungicidno), koagulacijsko te antioksidativno djelovanje u vinarstvu. Sumporni dioksid danas se koristi kao univerzalno enološko sredstvo oznake E220 ili E202. Na tržištu postoji kao elementarni sumpor (prah i trake sa sumporom), plinoviti sumporni dioksid, 5 %-tna sumporasta kiselina H₂SO₃, enološki čisti kalijev ili natrijev metabisulfit. Europska Unija (EU regulacija n^o 1493/1999 i 1622/2000) propisuje dopuštene količine ukupnog SO₂ u vinima. U Hrvatskoj su dopuštene količine propisane Pravilnikom o enološkim postupcima (NN 114/10). Za crna vina maksimum je 150 mg/L, dok je kod bijelih i rose vina maksimum 200 mg/L.

Sumporni dioksid se u vinima određuje metodom po Ripperu i metodom po Paulu. U ovom je istraživanju sumpor određen metodom po Paulu koja se temelji na oslobađanju sumpornog

dioksida iz zakiseljenog uzorka vina (dodatkom 25 %-tne ortofosforne kiseline) u struji zraka te njegovog vezanja na vodik peroksid pri čemu nastaje sumporna kiselina. Kao indikator koristi se mješavina metilen crvenog i metilen plavog, a titrira se sa 0,01 M NaOH. Količina sumpora se izražava u mg/L.



Slika 13: Aparatura za određivanje SO₂ u vinu metodom po Paulu
Izvor: Osobni arhiv

3.6.11. Određivanje pepela u vinu

Pepeo vina čine mineralne tvari vina (kalijeve, kalcijeve, magnezijeve soli, sumporna, fosforna i ugljična kiselina te oksidi) koje ostaju poslije isparavanja vode te sagorijevanja suhe tvari. Princip metode određivanja pepela temelji se na žarenju uzorka vina na temperaturi između 500 i 550 °C do potpune oksidacije organskih tvari. Najprije se izvrši otparavanje do suha, nakon toga se spaljivanjem karbonizira, a zatim mineralizira žarenjem kod propisane temperature do konstantne težine. Pepeo se mora brzo izvagati jer je vrlo higroskopian. Dobiveni rezultat se množi s 50 kako bi se dobila vrijednost u g/L.

Prema Pravilniku o vinu, crna vina mogu sadržavati od 1,6 do 1,8 g/L pepela ovisno o kategoriji u kojoj se nalaze.

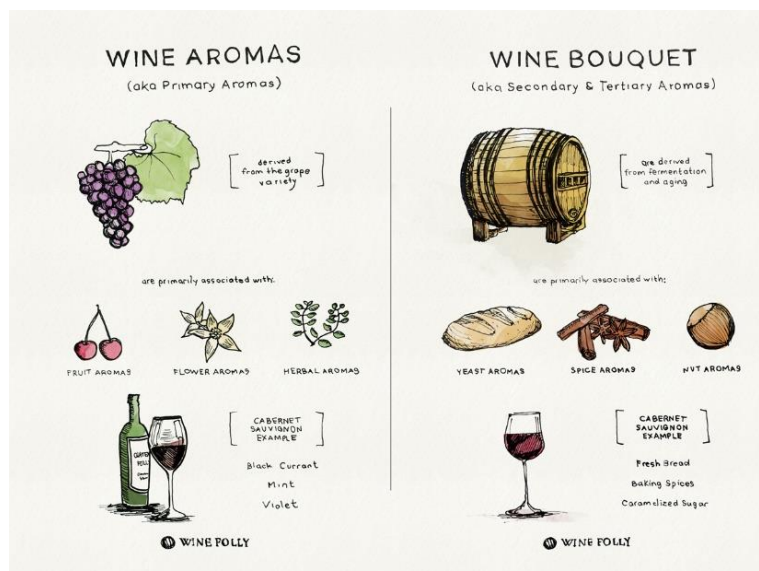


Slika 14: Određivanje pepela u vinu
Izvor: Osobni arhiv

3.7. Aromatski profil vina

Percepcija okusa i arome vina rezultat je mnoštva interakcija između velikog broja kemijskih spojeva i osjetnih receptora. Za aromatski profil vina odgovorni su spojevi koji potječu iz grožđa i tipični su za svaku sortu, zatim spojevi koji nastaju tijekom prerade grožđa, oni nastali tijekom alkoholne i malolaktične fermentacije od strane kvasaca i bakterija te aromatski spojevi koji nastaju tijekom čuvanja i starenja vina (Vilanova i sur., 2010). Sastav grožđa prvenstveno ovisi o sorti i klonskom genotipu vinove loze te interakciji genotipa i fenotipa s mnogim okolišnim čimbenicima, koji se u vinarskom smislu, grupiraju pod koncept „terroir-a“ (makro, mezo i mikroklima, tlo, topografija). Osim toga, za aromu vina važna je i mikroflora, odnosno kvasac odgovoran za fermentaciju koji doprinosi aromatskom profilu preko nekoliko mehanizama. Kvasac koristi spojeve koji se nalaze u soku grožđa za transformaciju u aromu ili spojeve koji utječu na aromatski profil. Također, djeluje na aromu stvarajući enzime koji transformiraju neutralne spojeve grožđa u aromatske, i na kraju sintezom mnogih aromatskih primarnih (etanol, glicerol, octena kiselina, acetaldehid) i sekundarnih (esteri, viši alkoholi, masne kiseline) metabolita.

Aromu vina čini više od 1 000 aromatskih spojeva (Tao i sur., 2009). Terpeni, esteri, metokspirazini i aldehidi odgovorni su za razne arome i okuse u vinu, često su to cvjetne, voćne, arome papra i drvenaste arome. S druge strane, spojevi kao što su glicerol, polisaharidi i manoproteini doprinose viskozitetu i okusu vina u ustima. Antocijani su odgovorni za boju, dok je etanol važan za učinak grijanja u ustima. Interakcije između tako velikog broja kemijskih spojeva određuju konačni okus, aromu i percepciju vina.



Slika 15: Arome vina i njihovo podrijetlo

Izvor: <https://media.winefolly.com/wine-aromas-vs-wine-bouquets.jpg>

Monoterpeni

Monoterpeni su spojevi koji se mogu naći u slobodnom i vezanom glikozidnom obliku u bobicama grožđa. U grožđu i vinu identificirano je oko dvadeset različitih monoterpena; polovina su derivati linalola (Ilc i sur., 2016). Među najvažnije spadaju linalol, geraniol, nerol, citronelol, α -terpeniol. Najčešće su odgovorni za cvjetne i citrusne note u vinima.

Norizoprenoidi

Oni predstavljaju raznoliku skupinu široko rasprostranjenih spojeva dobiveni razgradnjom karotenoida (Schwab, 2008). Identificiran je velik broj ovih spojeva u bobicama grožđa i vinima. Za aromu vina najvažniji su β -ionon, β -damascenon, vitispiran, TPB (E-1-(2,3,6-trimetilfenil)-buta-1,3-dien), TDN (1,1,6-trimetil-1,2-dihidronaftalen) i TCH (2,2,6-trimetilcikloheksanon) (Mendes-Pinto, 2009).

Metokspirazini

Metokspirazini su spojevi za koje su karakteristični izrazito niski mirisni pragovi detekcije (2-16 ng/L u vinima), kao i arome opisane kao zeljaste, zelene, biljne i zemljane. Najzastupljeniji metokspirazin u grožđu i vinu je 3-izobutil-2-metokspirazin (IBMP), spoj koji je odgovoran za karakterističnu aromu zelene paprike. Iza njega slijedi 3-izopropil-2-metokspirazin (IPMP) i 3-sec-butil-2-metokspirazin (SBMP) koji se rijetko javljaju iznad mirisnog praga detekcije u bobicama grožđa (Lei i sur., 2018).

Hlapljivi tioli

Tioli su sumporni spojevi koji sadrže sulfhidrilnu skupinu (-SH) vezanu na C atom. Važni su spojevi koji doprinose sortnoj aromi vina nekoliko sorata, posebice Sauvignona bijelog. Među najvažnije tirole koji su prvotno pronađeni kod Sauvignona spadaju 4-metil-4-sulfanilpentan-2-on (4MSP), 3-sulfanilheksanol (3SH) te 3-sulfanilheksil acetat (3SHA). Njihov je miris prilično jak na višim koncentracijama, a deskriptori koji se koriste uključuju tropsko voće, marakuju, grejp, guavu, ogrozd, list rajčice, crni ribiz.

Viši alkoholi

Alkoholi (lanac ugljika i vodika s najmanje jednom -OH skupinom) su klasificirani kao viši alkoholi kada imaju više od dva atoma ugljika (Jackson, 2008; Zoecklein i sur., 1999). Najvažniji aromatski spojevi nastali od aminokiselina su upravo viši alkoholi te njihovi esteri i hlapive kiseline. Ovi spojevi koji sadržavaju sumpor mogu imati pozitivan ili negativan utjecaj na miris i okus vina. Spojevi poput 3-merkptoheksanola mogu doprinijeti voćnim aromama u vinima. Međutim, viši alkoholi za koje se smatra da imaju najveći senzorni utjecaj su 1-propanol, 2-metil-1-propanol, 2-metil-1-butanol i 3-metil-1-butanol (Pretorius i Lambrechts, 2000).

Esteri

Esteri čine jednu od najvažnijih klasa aromatskih spojeva i velikim su dijelom odgovorni za voćne arome u vinima (Lilly i sur., 2000). Nastaju reakcijom organske kiseline s alkoholom. Glavne skupine estera u vinima su acetatni esteri i etilni esteri. Najvažniji i najistraživaniji ester je etil acetat koji je u nižim koncentracijama poželjan u vinu.

3.8. Polifenolni sastav grožđa i vina

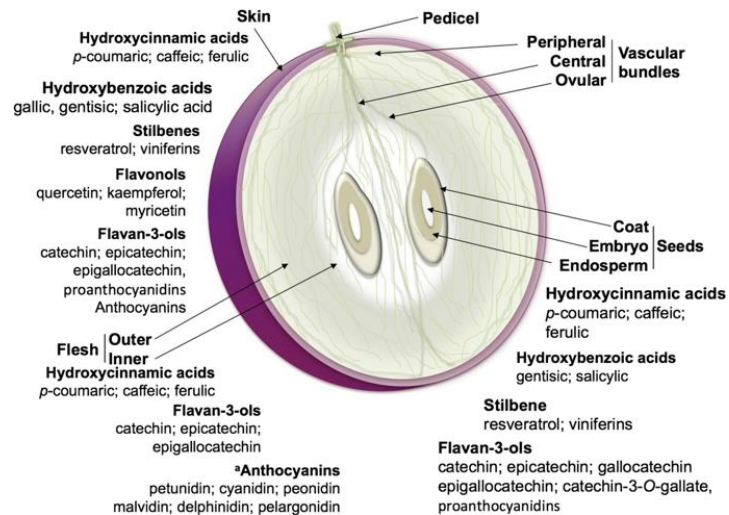
U crnom grožđu, fenoli čine treću najznačajniju skupinu organskih spojeva. Oni ne samo da pridonose boji crnih vina, nego i njihovom karakterističnom okusu. Dakle, fenoli i njima srodni spojevi mogu utjecati na izgled, okus, miris i antimikrobna svojstva vina. Fenolni spojevi čine raznoliku skupinu sekundarnih metabolita biljaka koji su prisutni kako u grožđu tako i u vinu. Ovi spojevi nastaju iz esencijalne aminokiseline fenilalanina preko fenilpropanoidnog biosintetskog puta. Iako fenoli čine samo 1 do 5 % ukupnih sastojaka vina, oni su važni zbog svog pozitivnog utjecaja na izgled (boju vina), okus (gorčinu ili astringenciju) te potencijalnog blagotvornog učinka na ljudsko zdravlje. Fenolni sadržaj u vinu ovisi o brojnim čimbenicima, prvenstveno o sorti i zrelosti grožđa, okolišnim čimbenicima u vinogradu (klima, tlo), tehnologiji proizvodnje vina, kao i uvjetima fermentacije i dozrijevanja (Fang i sur., 2008). Općenito, sadržaj se fenolnih spojeva povećava tijekom dozrijevanja grožđa, a pojam „fenolne zrelosti“ uveden je u literaturu posljednjih godina (Pérez-Magariño i González-San José, 2006). Crna vina su općenito bogatija fenolima, što je potvrđeno i istraživanjem Vrčaka i sur. (2010). Prema spomenutom istraživanju, ukupni fenolni sadržaj crnih vina je otprilike deset puta veći u odnosu na sadržaj zapažen kod bijelih vina. Razlog tome je viši sadržaj antocijana i kondenziranih tanina u crnim vinima, kao posljedica bolje ekstrakcije fenolnih spojeva tijekom fermentacije soka s kožicama i sjemenkama.

Svi se fenolni spojevi baziraju na primarnoj kemijskoj strukturi hidroksibenzena, odnosno fenola. Fenoli u grožđu i vinu mogu se podijeliti u dvije skupine: neflavonoide i flavonoide.

Neflavonoidi imaju C1 ili C6 strukture, što znači da su jedan ili tri C atoma vezana na primarni benzenski prsten. Oni se uglavnom nalaze u staničnim vakuolama kožice i pulpe, a lako se ekstrahiraju tijekom prešanja grožđa. Većinu neflavonoidnih spojeva prisutnih u grožđu čine fenolne kiseline i stilbeni. Drugi neflavonoidni spojevi potječu iz hrasta, i to su hrastovi tanini koji su derivati elaginske (elagitanin) i galne kiseline (galotanin).

Flavonoidi pripadaju skupini kemijskih spojeva koji sadrže osnovnu strukturu od 15 atoma ugljika koji čine dva aromatska prstena povezana preko lanca na kojeg su vezana tri atoma ugljika (C6-C3-C6), koji mogu ili ne biti dio trećeg prstena. Flavonoidi su općenito svrstani u nekoliko grupa koje se razlikuju uglavnom u stupnju oksidacije središnjeg piranskog prstena. Obzirom na veliku kemijsku raznolikost ovih spojeva, u literaturi je pronađeno nekoliko različitih pristupa njihove klasifikacije. Najčešće se prihvaćaju tri kategorije: flavanoli,

antocijani i flavonoli (Lee i sur., 2011). Flavonoide najčešće nalazimo u kožici, sjemenci i (nešto rjeđe) u mesu bobice. Pretpostavka je da je njihova funkcija u grožđu obrana od mikrobioloških patogena, štetnih kukaca i biljojeda.



Slika 16: Dijelovi bobice grozda i smještaj fenolnih spojeva unutar njih

Izvor: https://media.springernature.com/lw685/springer-static/image/art%3A10.1007%2Fs00253-020-10558-3/MediaObjects/253_2020_10558_Fig2_HTML.png

3.8.1. Fenolne kiseline

Fenolne se kiseline obično dijele u dvije glavne skupine: benzojeve kiseline, koje sadrže sedam atoma ugljika (C6-C1) i cimetne kiseline s devet atoma ugljika (C6-C3). Ovi spojevi pretežno postoje kao hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline.

U grožđu i vinu pronađeno je nekoliko hidroksibenzojevih kiselina, a među najvažnije spadaju p-hidroksibenzojeva, galna, siringinska, prokatehinska, salicilna, vanilinska (Baderschneider i Winterhalter, 2001). Galna kiselina nalazi se u sjemenkama gdje tvori estere s katehinima te se smatra najvažnijim fenolnim spojem obzirom da je prekursor svih hidrolizirajućih tanina i sastavni dio kondenziranih tanina. Također, u vinu su pronađeni i etil esteri ovih fenolnih kiselina (Kallithraka i sur., 2009).

S druge strane, hidroksicimetne kiseline spadaju među najreprezentativnije fenolne kiseline koje se nalaze u grožđu i vinu (Baderschneider i Winterhalter, 2001). Najvažnije hidroksicimetne kiseline su kafeinska, p-kumarinska, kaftarinska, ferulinska i sinapinska. Ove cimetne kiseline su glavni fenolni spojevi u bijelim moštovima koji su odgovorni za boju bijelih vina. Također, one su povezane s procesom posmeđivanja vina i prekursori su hlapljivih fenolnih spojeva (Kallithraka i sur., 2009). Postoje u *cis* i *trans* obliku. U grožđu, kaftarinska i ferulinska kiselina nalaze se uglavnom u *trans* obliku. *Trans*-kaftarinska i *trans*-ferulinska

kiselina lokalizirane su u pulpi te se brzo otpuštaju u sok tijekom prešanja. Hidroksicimetne kiseline i njihovi esteri s vinskom kiselinom predstavljaju glavnu skupinu fenola kod bijelih vina i glavnu skupinu neflavonoidnih spojeva kod crnih vina (Vanzo i sur., 2007).

3.8.2. Stilbeni

Stilbeni su spojevi koji se sintetiziraju u bobici kao reakcija biljke na stres. Povećana sinteza stilbena kod vinove loze je poželjna iz dva razloga: povišene razine, posebno u kožici grožđa, vode do viših koncentracija ovih spojeva u vinima za koje se smatra da imaju blagotvoran učinak na ljudsko zdravlje. Isto tako, povišene koncentracije pružat će veći otpor na stresne čimbenike. Najznačajniji stilben je *trans*-resveratrol. Postoje dobri eksperimentalni dokazi za moćne antibakterijske, antigljivične i antinematodne aktivnosti *trans*-resveratrola i njegovih derivata (Chong i sur., 2009). Iako su resveratrol i njegovi derivati pronađeni kod mnogih vrsta vina, obično su u puno višim koncentracijama prisutni u crnim vinima obzirom na dugi proces fermentacije koji uključuje kontakt s kožicama grožđa. Razine resveratrola variraju u zavisnosti od vrste vina, s relativno visokim koncentracijama pronađenih kod vina Pinot crni i Merlot (Stervbo i sur., 2007).

3.8.3. Flavanoli

Flavanoli ili flavan-3-oli su spojevi odgovorni za osjet gorčine i astringencije kod grožđa i vina. Glavni flavan-3-oli koji su pronađeni u kožicama i sjemenkama grožđa i u vinu su (+)-katehin i njegov izomer (-)-epikatehin te u manjoj mjeri ester (-)-epikatehina, (-)-epikatehin-3-O-galat (Su i Singleton, 1969). Katehin je utvđen kao najobilniji flavonoid odgovoran za karakterističan okus kod vina proizvedenih pod posebnim uvjetima, bez produljenog kontakta s kožicama grožđa (Lunte i sur., 1988). Oligomeri i polimeri flavanola nazivaju se kondenzirani tanini ili proantocijanidini. Flavanoli se u kožicama sintetiziraju tijekom nekoliko tjedana nakon cvatnje (Kennedy i sur., 2001). U sjemenkama, maksimalne koncentracije ovih spojeva postižu se nekoliko tjedana nakon šare (Bogs i sur., 2005; Downey i sur., 2003). Flavanoli su posebno važni za crna vina. Provođenje maceracije na niskim temperaturama prije fermentacije povećava razine antocijana i flavanola iz pulpe i kožice.

3.8.4. Flavonoli

Flavonoli su flavonoidni spojevi za koje je karakteristična prisutnost dvostruke veze između C2 i C3 atoma i hidroksilne skupine na C3 atomu zbog čega se često nazivaju 3-hidroksiflavoni. Flavonole u grožđu nalazimo u obliku 3-glukozida, dok su u vinu prisutni kao slobodni aglikoni. Flavonole nalazimo uglavnom u kožici bobice, u staničnim vakuolama epiderme i vanjske hipoderme. Tu su odgovorni za apsorpciju UV-zračenja, istovremeno štiteći unutarnja tkiva od štetnih učinaka istog. Među najpoznatije i najvažnije flavonole spadaju kemferol, kvercetin i miricetin. Istodobna prisutnost ovih aglikona otkrivena je u različitim tipovima crnog vina (Hsu i sur., 2009). Flavonoli su važni kofaktori za poboljšanje boje, a važni

su i zbog zaštite grožđa od UV zračenja. Skloni su međusobnoj interakciji i interakciji s ostalim sastojcima vina poput proteina i polisaharida. Flavonoli su zapravo žuti pigmenti koji utječu na boju bijelih vina, ali mogu pridonijeti i boji crnih vina zbog sposobnosti interakcije s antocijanima. Taj se proces naziva kopigmentacija koja utječe na nijansu te povećava intenzitet i stabilnost boje vina.

3.8.5. Antocijani

Boja je važno obilježje crnih vina koje je izravno povezano s njegovom kvalitetom. Antocijani su glavni spojevi prisutni kod mladih crnih vina odgovorni za intenzivnu crvenu boju. Ovi se pigmenti uglavnom nalaze u kožici bobice, a njihova sposobnost ekstrakcije tijekom proizvodnje vina ovisi o mnogim faktorima, prvenstveno o koncentraciji u vakuolama i interakciji s polisaharidima stanične stijenke, što utječe na njihovu stabilnost i koncentracije u moštu. Na boju antocijanidina i antocijana utječe nekoliko parametara među koje spadaju temperatura i pH, prisutnost iona metala, vrsta otapala, strukturne karakteristike i kopigmentacija (He i sur., 2012). U crnim vinima proizvedenim od grožđa *Vitis vinifera* L., prisutni su 3-O-monoglukozidi ili 3-O-acilirani monoglukozidi pet glavnih antocijanidina: delfinidina, cijanidina, peonidina, petunidina i malvidina. Antocijani sudjeluju i kod promjene boje vina tijekom starenja gdje su prekursori nastajanja novih spojeva. Oni mogu reagirati s flavan-3-olima (katehinski monomeri i kondenzirani tanini) izravno ili neizravno preko aldehida stvarajući nove ljubičaste pigmente koji dalje vode do stvaranja piroantocijanin-katehin spojeva koji pokazuju narančasto obojenje (Pissarra i sur., 2003; Liao i sur., 1992; Rivas-Gonzalo i sur., 1995; Francia-Aricha i sur., 1998).

3.9. Određivanje polifenola u vinu

Za određivanje polifenola u vinima najčešće se primjenjuje tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC). Zbog složenosti fenolnog sadržaja u vinima potrebna je priprema uzoraka prije same analize. Priprema uključuje kiselu hidrolizu glikozida i tekuću ekstrakciju polifenola. Potrebno je i korigirati pH vrijednost uzoraka vina dodatkom klorovodične kiseline. Polifenoli apsorbiraju u vidljivom i ultraljubičastom dijelu spektra, stoga se rutinska detekcija tih spojeva u analizi HPLC-om temelji na mjerenju apsorbancije ultraljubičastog i vidljivog (Vis) zračenja, pomoću UV-Vis detektora. Posebna vrsta UV-Vis detektora je detektor s nizom dioda (DAD) koji ima mogućnost snimanja cijelog UV spektra nekoliko puta tijekom formiranja kromatogramskog pika ispitivanog sastojka.

U svrhu određivanja udjela pojedinačnih fenolnih spojeva, u ovom se istraživanju koristio tekućinskokromatografski sustav (HPLC tvrtke Agilent 1100). Volumen od 2 mL vina se prethodno filtrira kroz PTFE membranski filter veličine pore 0.22 μm u spomenuti tekućinskokromatografski sustav. Analiza je provedena na fenil-heksilnoj koloni (Phenomenex, SAD) uz detektor s nizom dioda. Vrijeme trajanja analize bilo je 65 minuta.

Kromatogrami su istovremeno bilježeni detektorom s nizom dioda pri različitim valnim duljinama i fluorescencijskim detektorom na različitim valnim duljinama ekscitacije i emisije.

DAD: $\lambda=280$ nm (hidroksibenzojeve kiseline), $\lambda=320$ nm (hidroksicimetne kiseline), $\lambda=360$ nm (flavonoli)

FLD: $\lambda_{ex}=225$ nm / $\lambda_{em}=320$ (flavan-3-oli)

Istovremeno su snimljeni i UV-Vis spektri pojedinih sastavnica u rasponu valnih duljina od 200 nm do 650 nm. Identifikacija sastavnica vina provedena je usporedbom njihovih vremena zadržavanja na kromatografskoj koloni te pripadnih UV-Vis spektara i fluorescencije na karakterističnim valnim duljinama ekscitacije i emisije s vremenima zadržavanja, spektrima i fluorescencijom standardnih spojeva. Masene koncentracije identificiranih spojeva određene su pomoću baždarnih krivulja načinjenih analizom vanjskog standarda.

3.10. Senzorno ocjenjivanje vina

Kako bi se utvrdile razlike u intenzitetu i kakvoći boje između varijanti te razlike u strukturi mirisa i njegovoj složenosti, kao i harmoničnosti okusa pojedine varijante vina, provedeno je senzorno ocjenjivanje metodom 100 pozitivnih bodova te metodom redoslijeda. Kod ocjenjivanja vina metodom redoslijeda, ocjenjivač dobije dva vina pri čemu treba izdvojiti vino s većim intenzitetom određenog sastojka te naznačiti uzorak koji je bolje kakvoće. U senzornom ocjenjivanju vina iz ovog istraživanja sudjelovalo je devet ocjenjivača s Agronomskog fakulteta u Zagrebu čiji su rezultati izdvojeni prema vizualnom izgledu (boja i bistroća), intenzitetu i kakvoći mirisa i okusa te postojanosti arome i općem dojmu.

4. Rezultati i rasprava

4.1. Rezultati kemijske analize mošta

Kemijska analiza mošta nakon berbe grožđa 'Portugizac' pokazala je koncentracije nakupljenog šećera i ukupnu kiselost kod svih varijanti. Kao što je vidljivo u tablici 1, kod gotovo svih proizvođača, grožđe s mikoriziranih trsova postiglo je više koncentracije šećera u odnosu na kontrolne trsove. Iznimka su uzorci grožđa proizvođača Majcenović kod kojeg su zabilježene nešto niže koncentracije. Položaj vinograda i nešto veće opterećenje po trsu mogući su razlozi tome. Također, važno je spomenuti kako je cijela Hrvatska prema podacima DHMZ-a za 2018. godinu svrstana u kategoriju ekstremno toplo, što znači da je grožđe dozrijevalo u uvjetima visokih temperatura čime je omogućeno optimalno nakupljanje šećera.

Mikoriza je pozitivno utjecala i na ukupnu kiselost kod svih varijanti. Kod proizvođača Majcenović i Cibana ukupna kiselost kod grožđa s mikoriziranih trsova bila je za čak 0,5 g/L veća u odnosu na ukupnu kiselost zabilježenu kod grožđa s kontrolnih trsova. Uzimajući u obzir problem globalnog zatopljenja koji utječe na otežano nakupljanje optimalnih vrijednosti pojedinačnih kiselina u grožđu i vinu koje kasnije utječu na ukupnu kiselost, veće koncentracije ukupne kiselosti kod trsova inficiranih mikorizom ukazuju na pozitivan utjecaj mikoriznih zajednica.

Tablica 1. Sadržaj šećera i ukupna kiselost u vinu 'Portugizac', berba 2018.

| Uzorak | Šećer °Oe | Ukupna kiselost (g/L) |
|--------------|--------------|--------------------------|
| Gregorić-M | 80 | 5,4 |
| Gregorić-K | 76 | 5,1 |
| Majcenović-M | 64 | 5,4 |
| Majcenović-K | 65 | 4,9 |
| Ciban-M | 82 | 4,7 |
| Ciban-K | 81 | 4,3 |

M- mikoriza; K-kontrola

4.2. Sadržaj pojedinačnih organskih kiselina u trenutku berbe

Odnos između pojedinačnih organskih kiselina definiran je sortom, položajem te klimatskim prilikama tijekom dozrijevanja. Najjača organska kiselina u grožđu je vinska kiselina, pa ona i najviše utječe na pH vrijednost i kiselost mošta. Vinska kiselina nakuplja se primarno u kožici bobice, s nešto nižim koncentracijama relativno ravnomjerno raspoređenim u mesu. Iza nje je po zastupljenosti jabučna kiselina koja na početku dozrijevanja ima vrlo visoke vrijednosti, a prema punoj zrelosti njezina koncentracija opada. Jabučna se kiselina najviše nakuplja u epidermi, nešto manje u hipodermi te na kraju dolazi do povećane sinteze u bobici. Po završetku dozrijevanja, koncentracije jabučne kiseline u kožici mogu nadmašiti one u mesu bobice. Od ostalih organskih kiselina u grožđu u manjoj mjeri nalazimo i limunsku kiselinu, a u vrlo malim količinama i askorbinsku, oksalnu te glikolnu.

Tablica 2. Sadržaj pojedinačnih organskih kiselina u trenutku berbe grožđa 'Portugizac', 2018. godine

| Uzorak | Limunska Kiselina (g/L) | Vinska kiselina (g/L) | Jabučna kiselina (g/L) |
|---------------|-------------------------|-----------------------|------------------------|
| Gregorić-M | 0,14 | 5,0 | 1,30 |
| Gregorić -K | 0,14 | 4,7 | 1,03 |
| Majcenović-M | 0,12 | 4,9 | 1,35 |
| Majcenović -K | 0,11 | 4,6 | 1,10 |
| Ciban-M | 0,14 | 4,6 | 1,21 |
| Ciban-K | 0,13 | 4,2 | 0,92 |

M- mikoriza; K-kontrola

U tablici 2 prikazane su vrijednosti pojedinačnih organskih kiselina u trenutku berbe grožđa 'Portugizac'. Iz tablice je vidljivo da su veće vrijednosti vinske kiseline postignute kod grožđa s trsova zaraženih mikorizom. Najveće su koncentracije izmjerene kod proizvođača Gregorić čije je grožđe s inficiranih trsova nakupilo čak 5,0 g/L vinske kiseline, dok je grožđe s kontrolnih trsova nakupilo 4,7 g/L. Razlike su vidljive i kod ostalih proizvođača koje idu u korist mikorize. Što se tiče jabučne kiseline, veće su vrijednosti ponovno zabilježene kod varijanti s inficiranih trsova. Najviše jabučne kiseline nakupilo je grožđe proizvođača Majcenović. Kod grožđa s mikoriziranih trsova izmjerene su vrijednosti od 1,35 g/L jabučne kiseline, dok su kod grožđa s kontrolnih trsova zabilježene vrijednosti od 1,10 g/L. Kada govorimo o limunskoj kiselini, nisu zabilježene velike razlike između mikoriziranih i kontrolnih trsova, no veće su vrijednosti kod svih proizvođača prisutne kod grožđa s inficiranih trsova.

4.3. Rezultati fizikalno-kemijske analize vina

Poznato je da je vino bogato kemijskim spojevima koji zajedničkim djelovanjem utječu na njegova organoleptična svojstva. U tablici 3 je prikazan kemijski sastav vina 'Portugizac' nakon završene alkoholne fermentacije. Rezultati pokazuju pozitivan utjecaj mikorize posebice na vrijednosti ekstrakta bez šećera, pH te vrijednost pepela. Najveća razlika u vrijednostima ekstrakta bez šećera utvrđena je kod proizvođača Gregorić, gdje je u vinu inficiranog uzorka vrijednost ekstrakta iznosila 21,7 g/L, dok je kod kontrolnog vina vrijednost ekstrakta bez šećera iznosila 20,5 g/L, što znači da se razlikuju za čak 1,2 g/L. Kod ostalih proizvođača nisu uočene tako velike razlike. Naime, kod proizvođača Majcenović vrijednost je veća za 0,5 g/L kod inficiranog uzorka, dok je kod proizvođača Cibana vrijednost veća za tek 0,2 g/L u korist mikorize. Obzirom da je ekstrakt u vinu od velike važnosti za njegovu kvalitetu jer su vina bogata ekstraktom puna i harmonična, dobiveni su rezultati na račun mikorize zadovoljavajući. Iz tablice 3 je također vidljiv i pravilan tijek alkoholne fermentacije jer je došlo do potpune razgradnje šećera te nakupljanja minimalnih vrijednosti hlapive kiseline.

Razlike između varijanti mikorize i kontrole uočene su i u koncentracijama ukupne kiseline i pH vrijednostima. Izdvajaju se uzorci proizvođača Gregorić kod kojeg je vrijednost pH u mikoriznom vinu manja za čak 0,1 jedinicu u odnosu na kontrolno vino. U uzorcima vina Cibana i Majcenović razlike su nešto manje, no ni one nisu zanemarive. Iz tablice 3 je vidljivo kako su navedene pH vrijednosti u pozitivnoj korelaciji s vrijednostima ukupne kiseline. Rezultati ponovno ukazuju na pozitivan utjecaj mikoriznih zajednica obzirom da je pH vrijednost niža kod svih inficiranih vina, a niži pH djeluje na veći intenzitet boje te bolju proteinsku i mikrobiološku stabilnost vina.

Kod inficiranih uzoraka uočen je i pozitivan utjecaj mikorize na vrijednost pepela koji je važan pokazatelj kvalitete vina. Ističu se uzorci proizvođača Gregorić i Cibana kod kojih je utvrđeno povećanje pepela za 0,3, odnosno 0,4 g/L. Kod uzorka vina proizvođača Majcenović, zabilježeno je povećanje za tek 0,1 g/L, no ipak je veća vrijednost u odnosu na kontrolno vino.

Tablica 3. Rezultati osnovne kemijske analize vina 'Portugizac', berbe 2018.

| | Gregorić-K | Gregorić-M | Majcenović-K | Majcenović-M | Ciban-K | Ciban-M |
|---|-------------------|-------------------|---------------------|---------------------|----------------|----------------|
| Specifična težina (20/20°C) | 0,9944 | 0,9965 | 0,9956 | 0,9956 | 0,9939 | 0,9937 |
| Alkohol (g/l) | 86,5 | 86,5 | 68,8 | 69,4 | 94,0 | 94,0 |
| Alkohol (vol%) | 11,0 | 11,0 | 8,70 | 8,80 | 11,90 | 11,90 |
| Ekstrakt ukupni g/l | 23,2 | 28,7 | 19,3 | 19,6 | 24,8 | 24,2 |
| Šećer reducirajući g/l | 3,7 | 8,0 | 3,2 | 3,0 | 4,2 | 3,8 |
| Ekstrakt bez šećera g/l | 20,5 | 21,7 | 17,1 | 17,6 | 21,6 | 21,4 |
| Ekstrakt bez šećera i nehl. kiselina g/l | 16,5 | 17,6 | 13,4 | 13,2 | 16,5 | 16,6 |
| Ukupne kiseline (kao vinska) g/l | 4,4 | 4,6 | 4,2 | 4,7 | 5,1 | 5,4 |
| Hlapive kiseline (kao octena) g/l | 0,30 | 0,37 | 0,41 | 0,24 | 0,28 | 0,26 |
| pH | 3,55 | 3,46 | 3,54 | 3,43 | 3,41 | 3,39 |
| SO₂ slobodni mg/l | 10,0 | 14,0 | 15,0 | 9,0 | 18,0 | 12,0 |
| SO₂ vezani mg/l | 26,0 | 31,0 | 25,0 | 29,0 | 30,0 | 28,0 |
| SO₂ ukupni mg/l | 36,0 | 45,0 | 40,0 | 38,0 | 48,0 | 40,0 |
| Pepeo g/L | 3,14 | 3,44 | 2,47 | 2,58 | 3,09 | 3,53 |

M- mikoriza; K-kontrola

4.4. Polifenolni sastav vina

Ukupni fenolni sadržaj vina se povećava u ranim fazama fermentacije, a do blagog porasta može doći i tijekom starenja vina u drvenim bačvama. U tablici 4 je prikazan polifenolni profil vina 'Portugizac' kao prosječna vrijednost tri berbe (2017-2019). Polifenolni se profil značajno razlikovao obzirom na podrijetlo grožđa. Kod svih uzoraka vina zaraženih mikorizom uočeno je povećanje vrijednosti ukupnih antocijana, posebice glavnog predstavnika malvidin-3-glukozida. Najveće su koncentracije antocijana zabilježene u uzorcima vina OPG-a Gregorić. U prosjeku, kontrolno je vino sadržavalo 320,89 mg/L, dok je inficirano vino sadržavalo 330,69 mg/L ukupnih antocijana. Kod ostala dva proizvođača zabilježene su veće vrijednosti, kako pojedinačnih, tako i ukupnih antocijana u vinima zaraženim mikorizom, što je odličan rezultat obzirom da su antocijani glavni spojevi odgovorni za intenzivnu crvenu boju.

Zabilježen je i porast kod ukupnih flavonola u mikoriznim vinima. Tu se ističu vina proizvođača Cibana kod kojih su uočene najviše koncentracije pojedinačnih, ali i ukupnih flavonola. Kontrolno vino spomenutog proizvođača sadržavalo je 43,15 mg/L ukupnih flavonola, dok je mikorizno vino sadržavalo 43,50 mg/L. Također, došlo je do najvećeg povećanja u vrijednostima kvercetin-3-O-glukozida. Kod proizvođača Majcenović nisu uočene velike razlike u koncentracijama flavonola, no ipak je zabilježen blagi porast kod mikoriznog vina, za gotovo 0,1 mg/L u odnosu na kontrolno vino. S druge strane, kod Gregorića je zabilježen obrnuti trend. Uočene su veće vrijednosti ukupnih flavonola kod kontrolnog vina. Naime, kontrolno je vino sadržavalo 22,25 mg/L, dok je mikorizno vino sadržavalo 20,99 mg/L ukupnih flavonola. Obzirom da su kod gotovo svih proizvođača zabilježene veće vrijednosti ukupnih flavonola kod inficiranih vina, još je jednom potvrđen pozitivan utjecaj mikorize na polifenolni sastav vina jer su veće koncentracije flavonola poželjne u vinima zbog njihovog utjecaja na intenzitet i stabilnost boje kroz interakciju s antocijanima.

Razlike u koncentracijama pojedinačnih polifenolnih spojeva utvrđene su i kod predstavnika fenolnih kiselina. Najveće vrijednosti zabilježene su kod proizvođača Cibana gdje je kontrolni uzorak sadržavao 118,48 mg/L, dok je mikorizni sadržavao 122,05 mg/L ukupnih fenolnih kiselina. Vidljivo je da je došlo do najvećeg povećanja u vrijednostima kaftarinske kiseline, što je uočeno i kod ostalih uzoraka. Kod proizvođača Gregorić i Majcenović rezultati također idu u korist mikorize.

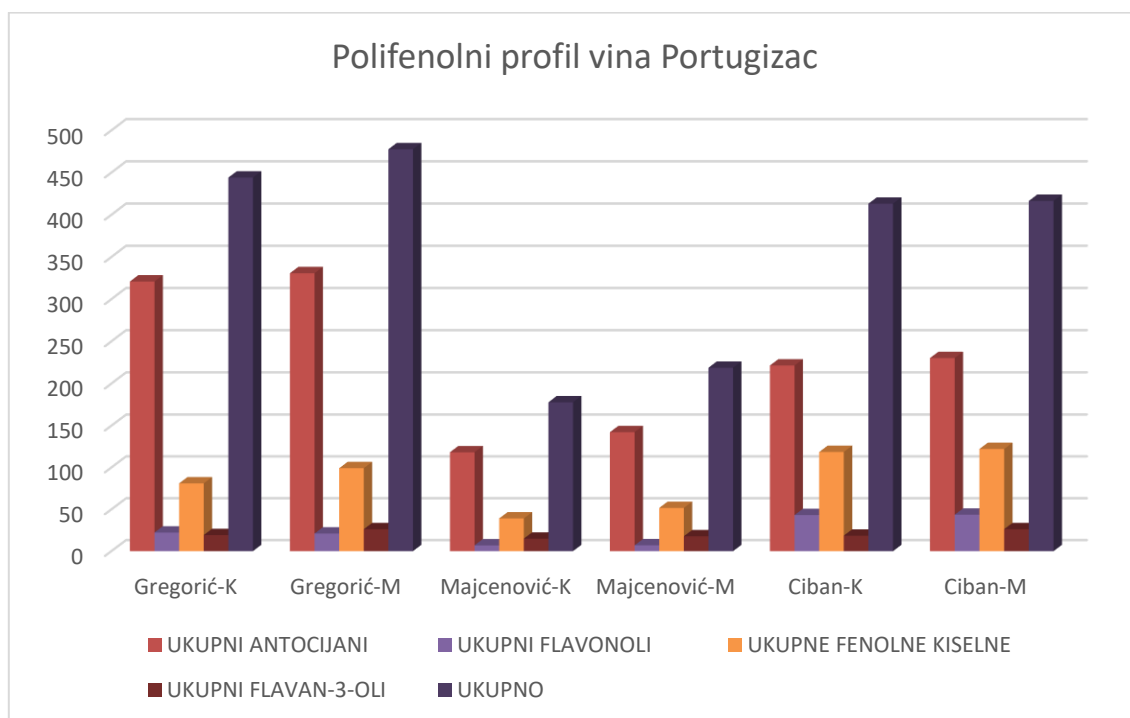
Iz tablice 4 je vidljivo i povećanje u koncentracijama flavan-3-ola kod varijanti mikorize. Najveće su koncentracije zabilježene kod proizvođača Gregorić i Cibana, gdje je uočeno povećanje u vrijednostima flavan-3-ola za približno 7 mg/L u inficiranim uzorcima. Što se tiče pojedinačnih flavan-3-ola, kod svih uzoraka došlo je do najvećeg povećanja u koncentracijama glavnog predstavnika katehina koji je odgovoran za karakterističan okus vina.

Tablica 4. Polifenolni profil vina 'Portugizac', prosječna vrijednost tri berbe, 2017-2019

| | Gregorić- K | Gregorić- M | Majcenović- K | Majcenović- M | Ciban- K | Ciban- M |
|-------------------------------|------------------------|------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------|---------------------|
| Delfinidin-3-glukozid | 9,39 | 5,44 | 0 | 0,15 | 6,27 | 6,07 |
| Cijanidin-3-glukozid | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Petunidin-3-glukozid | 9,38 | 6,53 | 1,04 | 1,41 | 7,15 | 7,40 |
| Peonidin-3-glukozid | 0,18 | 0,20 | 0,16 | 0,19 | 1,49 | 1,36 |
| Malvidin-3-glukozid | 301,92 | 318,51 | 116,92 | 140,495 | 206,40 | 215,35 |
| UKUPNI ANTOCIJANI | 320,89 | 330,69 | 118,12 | 142,13 | 221,31 | 230,18 |
| Mircetin-3-O-glukozid | 9,60 | 9,33 | 0,96 | 0,82 | 14,27 | 13,50 |
| Kvercetin-3-O-glukozid | 6,39 | 5,25 | 2,74 | 2,52 | 26,07 | 26,13 |
| Izoramnetin-3-O-glukozid | 2,10 | 2,61 | 1,06 | 1,26 | 0 | 0 |
| Kvercetin | 0,98 | 1,15 | 0,35 | 0,41 | 2,81 | 3,87 |
| UKUPNI FLAVONOLI | 22,25 | 20,99 | 6,91 | 6,98 | 43,15 | 43,50 |
| Kaftarinska | 59,98 | 76,61 | 25,59 | 36,67 | 90,16 | 92,95 |
| Kafeinska | 4,25 | 4,21 | 3,56 | 3,57 | 4,77 | 5,79 |
| Kutarinska | 12,27 | 14,72 | 6,71 | 8,53 | 16,90 | 16,05 |
| Kumarinska | 2,27 | 1,57 | 1,64 | 1,00 | 1,95 | 2,81 |
| Ferulinska | 0,64 | 0,34 | 0,20 | 0,22 | 0,73 | 0,82 |
| Galna | 1,59 | 1,65 | 1,40 | 1,55 | 3,97 | 3,63 |
| UKUPNE FENOLNE KISELNE | 81,01 | 99,11 | 39,11 | 51,56 | 118,48 | 122,05 |
| Galokatehin | 1,26 | 1,23 | 0,92 | 0,85 | 1,61 | 1,83 |
| Procijandin B1 | 1,61 | 4,09 | 0,83 | 2,55 | 1,45 | 3,25 |
| Katehin | 8,72 | 10,13 | 6,94 | 7,52 | 9,94 | 12,04 |
| Procijanidin B2 | 2,86 | 4,27 | 2,19 | 2,50 | 2,50 | 3,78 |
| Epikatehin | 4,50 | 6,15 | 4,05 | 4,28 | 3,00 | 5,25 |
| UKUPNI FLAVAN-3-OLI | 19,23 | 26,24 | 14,94 | 17,80 | 18,50 | 26,15 |
| Resveratrol glukozid | 0,97 | 1,00 | 0,58 | 0,57 | 1,48 | 1,52 |
| UKUPNO | 444,04 | 477,59 | 177,75 | 218,64 | 413,07 | 416,36 |

M- mikoriza; K-kontrola

Na kraju, što se tiče polifenolnog profila vina, izdvojila su se vina Ciban (prosječna vrijednost tri berbe) koja su imala naglašeno više pojedinačnih i ukupnih polifenola što je i bilo za očekivati obzirom na specifičnosti samog vinograda. Zabilježeni su izrazito niski prinosi, naglašena rehljavost grožđa te naglašeno prosušivanje bobica. Naime, i u takvim uvjetima mikoriza je još jednom pokazala pozitivan utjecaj na polifenolni profil spomenutih vina.



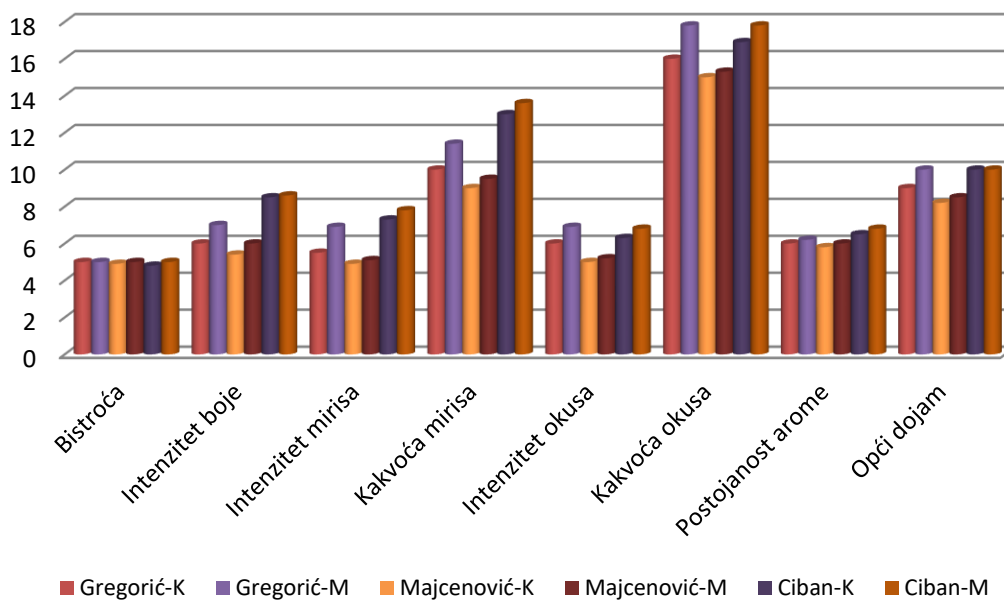
Graf 1. Polifenolni profil vina 'Portugizac', prosječna vrijednost tri berbe, 2017-2019

4.5. Senzorna ocjena vina 'Portugizac'

Organoleptično ocjenjivanje vina metodom 100 pozitivnih bodova izvršeno je početkom 2019. godine u svrhu dodatnog definiranja utvrđenih razlika u kemijskom sastavu određenih varijanti kroz različitosti u vizualnom izgledu, kakvoći boje i njenom intenzitetu te strukturi mirisa i harmoničnosti okusa pojedine varijante. U grafu 2 je prikazana senzorna ocjena vina Portugizac (prosječne vrijednosti tri berbe, 2017-2019). Iz spomenutog grafa može se uočiti da su se boljima pokazala vina dobivena od grožđa s trsova inficiranih mikorizom, pri čemu je najveća razlika uočena u intenzitetu boje posebice kod vina proizvođača Gregorić. Najjačim tonalitetom boje izdvojila su se vina proizvođača Ciban, što je i bilo za očekivati obzirom da su njegova vina nakupila najviše koncentracije pojedinačnih fenola. Najveće su razlike u intenzitetu i kakvoći mirisa ponovno uočene u vinima proizvođača Gregorić, dok su najmanje razlike uočene kod proizvođača Majcenović. Bolja kakvoća i intenzitet mirisa zabilježeni su kod varijanti mikorize oba proizvođača. Najbolju ocjenu dobila su vina OPG-a Gregorić zbog bolje obojenosti te značajno veće harmoničnosti i kompleksnosti okusa.

Najmanja je različitost među varijantama uočena kod vina Ciban. Krajnjem rezultatu pridonijeli su i opći dojam te postojanost arome u ustima, gdje su se u spomenutim svojstvima izdvojila vina proizvođača Majcenović koja su bila dominantnija u odnosu na ostale uzorke. Rezultati senzornog ocjenjivanja dodatno su potvrdili pozitivan učinak mikorize na analizirane parametre vina 'Portugizac'.

Senzorna ocjena vina Portugizac



Graf 2. Senzorna ocjena vina 'Portugizac', 2017-2019

5. Zaključak

Rezultati ovog istraživanja, provedenog 2018. godine na području Plešivice u tri vinograda ukazuju na povoljan utjecaj apliciranog mikoriznog cjepiva na kemijski sastav vina sorte 'Portugizac'. Pozitivan se utjecaj prvenstveno očitovao u porastu sadržaja šećera, ekstrakta bez šećera i ukupne kiselosti nakon provedene kemijske analize svih moštewa. Važno je naglasiti da su kod svih varijanti mikorize uočene više koncentracije pojedinačnih organskih kiselina koje direktno utječu na okus i harmoničnost vina. Također, mikoriza je utjecala i na povećanje sadržaja pepela koji se smatra važnim pokazateljem kvalitete vina. S druge strane, mikorizna je zajednica utjecala na smanjenje pH vrijednosti što je vrlo bitno s obzirom na njezinu važnost u mikrobiološkom smislu. Pozitivne su promjene uočene i u polifenolnom profilu mikoriznih vina. Rezultati analize polifenolnih spojeva pokazali su više koncentracije, kako pojedinačnih, tako i ukupnih polifenola. Posebno je došlo do porasta koncentracije antocijana i flavan-3-ola što je kasnije potvrđeno i senzornom analizom, odnosno intenzitetom boje određenih vina.

Iako se radi o rezultatima jednogodišnjeg istraživanja na jednoj sorti, ali na tri različite lokacije, spomenuti se rezultati mogu smatrati relevantima jer su poduprti rezultatima prijašnjih istraživanja na temu mikorize na drugim lokacijama i sortama. Prema tome, početna se hipoteza može potvrditi. Primjena mikorize pokazala je pozitivan utjecaj na kemijski, ali i na senzorni profil vina. Također, uzimajući u obzir problem globalnog zatopljenja, ekstremnih temperatura i manjka vode u tlu, primjena mikorize pokazuje pozitivan utjecaj zbog uspostave uravnoteženog odnosa između biljke i njezinih potreba za vodom i određenim hranjivima.

I na kraju, može se zaključiti da mikorizne zajednice imaju veliki utjecaj na vinovu lozu zbog čega bi se istraživanja na tu temu trebala nastaviti te potaknuti primjena mikoriznih cjepiva u različitim vinogradarskim područjima te na različitim sortama.

6. Literatura

1. Austrian wine. Blauer Portugieser. <https://www.austrianwine.com/our-wine/grape-varieties/red-wine/blauer-portugieser> (pristupljeno 02.05.20.)
2. Azcón-Aguilar C., Barea J. M. (1997). Applying mycorrhiza biotechnology to horticulture: significance and potentials. *Scientia Horticulturae*. 68: 1-24
3. Ball S. (2008). HPLC analysis of organic acids in wine. Polymer Laboratories, Varian, Inc., Amherst, Massachusetts. http://files.alfresco.mjh.group/alfresco_images/pharma//2014/08/21/13051015-bdfb-4c7c-a5e8-2e56dd0e3610/article-504077.pdf (pristupljeno 05.05.20)
4. Barišić V. (2015). Metode određivanja parametara kakvoće vina. Završni rad. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek
5. Bio-budućnost d.o.o. Mikoriza za vinovu lozu: cjepivo Mykoflor. <http://www.bio-buducnost.com/mikorizavinovaloza.pdf> (pristupljeno 04.03.20.)
6. Bio-budućnost d.o.o. Mikoriza. <http://www.bio-buducnost.com/mikoriza.html> (pristupljeno 07.03.20.)
7. Bonfante P., Genre A. (2010). Mechanisms underlying beneficial plant – fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nature Communications* 1. (4): 48
8. Brundrett M. (2004). Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biological Reviews*. 79: 473-495
9. Coetzee C. (2018). Grape-derived fruity volatile thiols. Adjusting Sauvignon blanc aroma and flavor complexity. *Wines & Vines*. [online] <https://winesvinesanalytics.com/features/article/197002/Grape-Derived-Fruity-Volatile-Thiols> (pristupljeno 30.04.20.)
10. DHMZ (2018) Državni hidrometeorološki zavod. [https://meteo.hr/klima.php?section=klima pracenje¶m=ocjena&MjesecSezona=godina&Godina=2018](https://meteo.hr/klima.php?section=klima_pracjenje¶m=ocjena&MjesecSezona=godina&Godina=2018) (pristupljeno 07.04.20.)
11. Fazinić N., Fazinić M. (1997). Ekologija u službi hrvatskog vinogradarstva. *Agronomski glasnik*. 5-6: 401-418
12. Gabriele M., Gerardi C., Longo V., Lucejko J., Degano I., Pucci L., Domenici V. (2016). The impact of mycorrhizal fungi on Sangiovese red wine production-Phenolic compounds and antioxidant properties. *LWT-Food Science and Technology*. 72: 310-316
13. Garrido J., Borges F. (2013). Wine and grape polyphenols — A chemical perspective. *Food Research International (Ottawa, Ontario)*. 54(2): 1844-1858.
14. Gerdemann J.W. (1968). Vesicular-arbuscular mycorrhiza and plant growth. *Annual Review of Phytopathology*. 6: 397-418
15. Grape Wine Research Development Corporations (GWRDC). Water management for wine grapes in a drying environment. <http://www.foodfuture.com.au/wp-content/uploads/2017/01/Water-management-for-wine-grapes-in-a-drying-environment-LR.pdf> (pristupljeno 16.03.20.)

16. Habte M. (2000). Mycorrhizal fungi and plant nutrition. Plant nutrient management in Hawaii's soils, Approaches for tropical and subtropical agriculture. College of tropical agriculture and human resources, University of Hawaii, Mano, str. 127-131
17. Jackson, R. (2008). Wine science (3rd edition). Academic Press, San Diego
18. Jeromel A. (2016). Interna skripta-vježbe. Agronomski fakultet, Zagreb
19. Joubert, S., Archer, E. (2000). The influence of mycorrhiza on vines. Wynboer. A Technical Guide for Wine Producers. 130: 86-88
20. Kos K. (2019). Utjecaj ektomikorize na kemijski sastav vina Kraljevina. Diplomski rad. Agronomski fakultet, Zagreb
21. Lanyon D. M., Cass A., Hansen D. (2004). The effect of soil properties on vine performance. CSIRO Land and water technical report 34/04
22. Lee J., Tarara J. (2011). An introduction to environmental influences on ripening in grapes: focus on wine grapes and phenolics. Oregon State University Extension Publications. [online] <file:///C:/Users/Korisnik/Downloads/articles.extension.org-AnIntroductiontoEnvironmentalInfluencesonRipeninginGrapesFocusonWineGrapesaNdPhenolics.pdf> (pristupljeno 20.05.20.)
23. Lin J., Massonnet M., Cantu D. (2019). The genetic basis of grape and wine aroma. Horticulture Research. 6: 81
24. Maletić E., Karoglan Kontić J., Pejić I. (2008). Vinova loza. Školska knjiga, Zagreb
25. Marks G. C., Kozłowski T. T. (2012). Ectomycorrhizae: Their ecology and physiology. Academic Press, New York & London
26. Maul E., Röckel F., Töpfer R. (2016). The "missing link" 'Blaue Zimmettraube' reveals that 'Blauer Portugieser' and 'Blaufränkisch' originated in Lower Styria. Vitis. 55: 135-143
27. Ministarstvo poljoprivrede (2017). Vinogradarstvo i vinarstvo. <https://poljoprivreda.gov.hr/vinogradarstvo-i-vinarstvo/193> (pristupljeno 25.03.20.)
28. Mirošević N., Karoglan Kontić J. (2008). Nakladni zavod Globus, Zagreb
29. Morreno-Arribas M. V., Polo M. C. (2009). Wine chemistry and biochemistry. Springer, New York, USA
30. Moss R. (2015). How higher alcohols and volatile phenols impact on key aromas. Oenology research, Winetech Technical. [online] <https://www.wineland.co.za/how-higher-alcohols-and-volatile-phenols-impact-on-key-aromas/> (pristupljeno 12.05.20.)
31. Mukerji K.B., Chamola B. P., Singh J. (2000). Springer, Boston, MA
32. Nylund, J.-E., Wallander H. (1989). Effects of ectomycorrhiza on host growth and carbon balance in a semi-hydroponic cultivation system. New Phytologist. 112: 389-398
33. OIV (2019). International organisation of vine and wine. Compendium of international methods of wine and must analysis. <http://www.oiv.int/public/medias/6619/compendium-2019-en-vol1.pdf> (pristupljeno 28.04.20.)

34. Ozdemir G., Akpinar C., Sabir A., Bilir H., Tangolar S., Ortas I. (2010). Effect of inoculation with mycorrhizal fungi on growth and nutrient uptake of grapevine genotypes (*Vitis spp.*). European Journal of Horticultural Sciences. 75: 103-110
35. Pereira de Freitas V. A., Fernandes A., Oliveira J., Teixeira N., Mateus N. (2017). A review of the current knowledge of red wine colour. OENO One. 51(1) [online] <https://oeno-one.eu/article/view/1604> (pristupljeno 10.05.20.)
36. Poljoprivredna zadruga Plešivica. Plešivička vinogorja. <https://plesivica.hr/plesivicka-vinogorja/> (pristupljeno 02.03.20.)
37. Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina (Narodne novine, br. 96/03)
38. Pravilnik o kategorijama proizvoda od grožđa i vina, enološkim postupcima i ograničenjima (Narodne novine, br. 114/10)
39. Prša I., Brkić R., Vučetić V., Prtenjak M. T., Omazić B., Prša Ž., Karoglan M., Šimon S. (2019). Vinogradarske zone u Republici Hrvatskoj. Zbornik sažetaka 54. hrvatskog i 14. međunarodnog simpozija agronoma, Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet, 17.-22.02.2019., Vodice, Hrvatska, str. 231
40. Rastija V., Medić-Šarić M. (2009). Kromatografske metode analize polifenola u vinima. Kemija u industriji. 58(3): 121-128
41. Regner F., Eiras-Dias J. E., Stadlbauer A., Blahous D. (1999). „Blauer Portugieser“, the dissemination of a grapevine. Ciência e Técnica Vitivinícola. 14(2): 37-44
42. Reščič J., Mikulič-Petkovšek M., Štampar F., Zupan A., Rusjan D. (2015). The impact of cluster thinning on fertility and berry and wine composition of 'Blauer Portugieser' (*Vitis vinifera* L.) grapevine variety. Journal international des sciences de la vigne et du vin. 49(4) [online] <http://oeno-one.eu/article/view/16> (pristupljeno 14.03.20.)
43. Sanders I. R., Croll D. (2010). Arbuscular mycorrhiza: The challenge to understand the genetics of the fungal partner. Annual review of genetics. 44: 271-292
44. Sanz D. T., Cediol I. M. A., Prádena Lóbon J. M., Mata M. G., Pérez Rodríguez M. L., Cuenca A. R., Suárez J. V., Revilla A. Z. (2014). Wine and its analysis. Universidad Complutense de Madrid, Spain
45. Scheiner J. J., Sacks G. L., Vanden Heuvel J. E. (2009). How viticultural factors affect methoxypyrazines. Water levels, cluster shading and temperature all play roles. Wines & Vines. [online] <https://winesvinesanalytics.com/features/article/68769/How-Viticultural-Factors-Affect-%20Methoxypyrazines> (pristupljeno 28.04.20.)
46. Smith S. E., F. Andrew Smith F.A., Jakobsen I. (2003). Mycorrhizal fungi can dominate phosphate supply to plants irrespective of growth responses. Plant Physiology. 133: 16-20
47. Smith S. E., Read D. J. (2008). Mycorrhizal Symbiosis - Third Edition. Academic Press, London
48. Specifikacija proizvoda (Uredba 1308/2013, čl. 93 i 94).
49. Spellman G. (1999). Wine, weather and climate. Weather. 54: 230-239

50. Stuart J. A., Robb E. L. (2013). Bioactive polyphenols from wine grapes. Springer, New York.
51. Styger G., Prior B., Bauer F. (2011). Wine flavor and aroma. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*. 38(9): 1145-59
52. Trouvelot S., Bonneau L., Redecker D., Van Tuinen D., Adrian M., Wipf D. (2015). Arbuscular mycorrhiza symbiosis in viticulture: a review. *Agronomy for Sustainable Development*. 35: 1449-1467
53. Van Leeuwen C., Seguin G. (2006). The concept of terroir in viticulture. *Journal of wine research*. 17: 1-10
54. Vinković Vrček I., Bojić M., Žuntar I., Mendaš G., Medić-Šarić M. (2011). Phenol content, antioxidant activity and metal composition of Croatian wines deriving from organically and conventionally grown grapes. *Food Chemistry*. 124: 354-361
55. Vukadinović V., Vukadinović V. (2018). Zemljišni resursi-Vrednovanje poljoprivrednih zemljišnih resursa. Poljoprivredi fakultet, Osijek.
56. Wine-searcher (2019). Portugieser wine. <https://www.wine-searcher.com/grape-962-portugieser> (pristupljeno 25.03.20.)
57. Zhang Y., Zeng M., Xiong B., Yang X. *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao* (2003). Ecological Significance of Arbuscular Mycorrhiza Biotechnology in Modern Agricultural System.14(4): 613-617
58. Zhu F., Du B., Li J. (2016). Aroma compounds in wine. *Grape and wine biotechnology*. InTech, Rijeka, Croatia, Ch.12 [online] <file:///C:/Users/Korisnik/Downloads/52244.pdf> (pristupljeno 01.04.20.)
59. Zrnić M., Širić I. (2017). Primjena mikorize u hortikulturi. *Journal of Central European Agriculture*. 18(3): 706-732

Životopis

Darija Karakaš rođena je 17. siječnja 1996. godine u Zaboku. Osnovnoškolsko obrazovanje završila je u Osnovnoj školi Đurmanec. Srednju školu upisala je 2010. godine, Opću gimnaziju u Krapini, nakon čega je 2014. godine upisala Agronomski fakultet u Zagrebu, studij Hortikulture.

Preddiplomski studij Hortikulture završava obranom završnog rada pod nazivom *Uloga čipsa u proizvodnji vina*. 2017. godine upisuje diplomski studij Vinogradarstva i vinarstva. Stručnu praksu obavlja u Kaliforniji 2019. godine.

Tijekom osnovne i srednje škole sudjelovala je na školskim natjecanjima iz košarke i rukometa, kao i cross utrkama. U srednjoj je školi trenirala košarku te pjevala u školskom zboru. Također, pohađala je školu stranih jezika Versus u Krapini, zahvaljujući kojoj je položila B2 razinu engleskog jezika u Zagrebu (Cambridge ESOL Level 1 Certificate).