

Usporedba polifenolnog profila klonskih kandidata sorte Plavac mali u pokusnom nasadu Baštica

Balažić, Petra

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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:204:102045>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-26**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

AGRONOMSKI FAKULTET

Hortikultura – vinogradarstvo i vinarstvo

Petra Balažić

USPOREDBA POLIFENOLNOG PROFILA
KLONSKIH KANDIDATA SORTE PLAVAC
MALI U POKUSNOM NASADU BAŠTICA

DIPLOMSKI RAD

Mentor: Doc. dr. sc. Darko Preiner

Zagreb, 2016.

SADRŽAJ

| | |
|---|----|
| 1. UVOD | 2 |
| 1.1. Plavac mali | 2 |
| 1.2. Klonska selekcija | 3 |
| 1.3. Individualna klonska selekcija | 5 |
| 1.3.1. Faze individualne klonske selekcije | 5 |
| 1.4. Pokusni nasad Baštica | 7 |
| 2. POLIFENOLI | 7 |
| 2.1. Svojstva polifenola | 7 |
| 2.2. Osnovna podjela polifenola | 8 |
| 2.2.1. Neflavonoidi | 8 |
| 2.2.2. Flavonoidi | 10 |
| 3. FLOTACIJA | 12 |
| 4. CILJ ISTRAŽIVANJA | 13 |
| 5. MATERIJALI I METODE | 13 |
| 5.1. Analiza sadržaja polifenola u kožici | 14 |
| 6. REZULTATI I RASPRAVA | 16 |
| 6.1. Udio frakcija bobica različitog stupnja zrelosti | 16 |
| 6.2. Sadržaj antocijana | 20 |
| 6.3. Sadržaj flavonola | 22 |
| 6.4. Sadržaj flavanola | 23 |
| 7. ZAKLJUČAK | 26 |
| 8. LITERATURA | 27 |
| 9. ŽIVOTOPIS AUTORA | 29 |

1. UVOD

1.1. Plavac mali

Plavac mali gospodarski je najvažnija, najrasprostranjenija i najpoznatija crna sorta vinove loze u Hrvatskoj. Potomak je Dobričića i Crljenka kaštelanskog (Maletić i sur, 2004.), čija je popularnost u „Novom Svijetu“ pridonijela i popularnosti Plavca izvan granica Hrvatske. Međutim, ono zbog čega se svrstava među sorte ponajboljih proizvodnih značajki su redovita i sigurna rodnost, mala osjetljivost prema bolestima i štetnicima, mali uzgojni zahtjevi i prikladnost za škrta i suha tla. Tipična je južna sorta, rasprostranjena gotovo isključivo u vinogradarskoj podregiji Srednja i Južna Dalmacija. U Sjevernoj Dalmaciji ga nalazimo tek sporadično, u okolici Primoštena i zadarskom zaleđu, dok je u Dalmatinskoj Zagori nešto češći (Vrgorac). Na poluotoku Pelješcu, te otocima Hvaru, Braču, Visu i Korčuli mnogi su vinogradi, poglavito na toplijim položajima, monosortni. U većoj mjeri ga nalazimo još u Kaštelima, Konavlima te makarskom primorju. Izvan Hrvatske u proizvodnim nasadima može se pronaći jedino u Makedoniji.

Kasnog je dozrijevanja, pa zahtijeva položaje vrhunskih klimatskih i edafskih karakteristika, a na takvima obično daje jaka (redovito iznad 13,5 vol.% alkohola) i intenzivno obojena crna vina, zamjetne astrigentnosti. U tim okolinskim uvjetima, grožđe ove sorte i u redovitoj berbi ima 10 – 30 % prosušenih bobica, tzv. suhica, koje doprinose kakvoći i intenzitetu mirisa. Aroma takvih vina se može opisati kao bogata, kompleksna i intenzivna, a mnogi će osjetiti dominirajuće mirise suhih šljiva, prezrelih kupina, trešanja, te drugog zrelog i prezrelog voća. Na okusu su izvanredno puna i bogata, moćna, vrlo postojana i s dugim "završetkom". Ove karakteristike se u pravilu dobivaju na povišenim, prema moru i jugo – jugozapadu okrenutim položajima, koja između ostalog karakterizira i dodatna insolacija – refleksija sunčevih zraka od morske površine. Najviše ih je na poluotoku Pelješcu (Dingač, Postup), te otocima Hvaru (Ivan Dolac, Sv. Nedjelja), Braču (Bol), te Korčuli i Visu. Vina s takvih položaja postižu izvrsne cijene na tržištu, redovito ih nalazimo u vrhunskoj kategoriji, dugog su potencijala starenja, te pripadaju redu ponajboljih crnih vina južnih vinogorja uopće. Plavac mali se

tradicionalno koristio i za proizvodnju proška, a na čuvenim položajima bilo je uspješnih pokušaja dobivanja i kasnih i izbornih berbi dužim ostavljanjem grožđa na trsu, pa se može reći i da je jedna od najpogodnijih sorti za proizvodnju desertnih vina. Vinogradi Plavca malog na ravnim terenima, dubokim i plodnim tlima, te naročito pri intenzivnom uzgoju i visokim prinosima, rezultiraju mnogo nižom kakvoćom. Vina iz takvih nasada su obično srednje jaka, slabije obojena, često neskladna zbog stršeće trpkocće.

Plavac mali vrlo je bogat i polifenolima, tvarima kojima se u posljednje vrijeme pridaje velika pozornost zbog njihova povoljnog utjecaja na zdravlje. Neki od njih su snažni antioksidansi i “hvatači” slobodnih radikala, pa su vrlo važni u prevenciji kardiovaskularnih i nekih kancerogenih bolesti. Najviše su zastupljeni u kožici i sjemenkama crnih sorti, odakle vinifikacijom prelaze u vino.

Posljednjih godina provode se mnoga istraživanja kojima je cilj povećati znanja o Plavcu malom i proširiti mogućnosti njegova iskorištenja, kao što su klonska selekcija i poboljšanje tehnologije uzgoja i vinifikacije.

1.2. Klonska selekcija

Vegetativnim razmnožavanjem (reznicama i cijepljenjem) vjerno se prenose sva svojstva s matičnog trsa na potomstvo. Ipak, dugotrajnim uzgojem pojedine sorte vinove loze, kao u ovom slučaju Plavca malog, dolazi do pojave unutar sorte varijabilnosti koja je najvećim dijelom posljedica mutacija, nasljednih promjena u strukturi DNA. Mutacije su glavna pretpostavka i osnova uspjeha klonske selekcije, metode koja je široko prihvaćena kao način održavanja i poboljšavanja afirmiranih tradicionalnih sorti. Većina mutacija su negativne sa stajališta opće adaptivne vrijednosti organizma, ali i agronomskog stajališta. Neke od njih dovode do krupnijih, čak vitalnih promjena, te su u konačnici letalne. Nama su važnije mutacije manjeg efekta koje rezultiraju određenim morfološkim i fiziološkim promjenama, ali još uvijek fertilnim biljkama. Naime, one su izvor unutar sorte genetske varijabilnosti te predstavljaju osnovu za prirodnu selekciju – evoluciju, ali i umjetnu selekciju, odnosno razvoj novih sorti - klonova. Često te

promjene ne uočavamo, no ako je riječ o nekom svojstvu važnom za proizvodnju poput ranijeg dozrijevanja ili boje kože, takve trsove izdvajamo i pratimo u procesu klonske selekcije te ih u konačnici priznajemo kao zasebne klonove te sorte.

U oplemenjivanju voćaka i vinove loze postoje dva osnovna pristupa rada

1. Razvoj potpuno nove sorte, na koji se odlučujemo rijetko – u slučaju da postojeći sortiment ne zadovoljava, odnosno kad postoji pretpostavka da bi za postojeće proizvodne uvjete bilo moguće stvoriti novu, bolju sortu.
2. Održavanje i poboljšanje postojeće sorte u kojem koristimo metode klonske selekcije, masovne i individualne klonske selekcije. Rezultat ovih selekcija nisu nove sorte, već pročišćena sorta ukoliko je bila riječ o masovnoj selekciji, ili klonovi u slučaju da se radilo o individualnoj klonskoj selekciji.

Klon neke biljke u agronomskom smislu riječi predstavlja populaciju biljaka nastalu sukcesivnim razmnožavanjem od jedne početne, elitne biljke koja je pokazala u postupku individualne klonske selekcije da se signifikantno razlikuje od prosjeka populacije sorte u barem jednom agronomski važnom svojstvu te da je slobodna od gospodarski štetnih virusnih bolesti. Klon ima sve značajke sorte iz koje je izdvojen, stoga ne dobiva novo ime i status nove sorte, već se jednostavno označava šifrom.

U populaciji Plavca malog nalazimo mnogo trsova kod kojih se uočavaju neka promijenjena svojstva. Njih obično nazivamo “tipovima”, a u literaturi se navode primjeri Plavac mali rodni, Plavac mali rani, Plavac mali sitni. Kao ekstreman primjer poznat je mutant Plavac mali sivi, s vrlo slabo izraženom plavkasto sivom bojom kože, pa se od toga grožđa može proizvesti samo bijelo vino. Posljednjih godina znanstvena se i stručna istraživanja usmjeravaju u tom pravcu, pokrenuti su projekti klonske selekcije pa će sve bogatstvo razlika populacije plavca malog ubrzo biti dostupno i tržištu putem klonskoga sadnog materijala.

1.3. Individualna klonska selekcija

Postupak je koji podrazumijeva izdvajanje i razmnožavanje pozitivnih mutanata i njihovo uvođenje u proizvodnju u statusu klona, uzimajući u obzir genetičku i zdravstvenu provjeru odabranih elitnih trsova, te provjeru genetičke stabilnosti svojstava i zdravstvenog statusa klona tijekom najmanje 2 vegetativno razmnožene generacije, kako bismo bili sigurni da su promjene uočene na matičnom trsu stabilne, te da se prenose na potomstvo.

1.3.1. Faze individualne klonske selekcije

Individualna klonska selekcija započinje pretklonskom selekcijom izvornih matičnih elitnih trsova klonskih kandidata, a provodi se u matičnim ili proizvodnim nasadima nakon provedene masovne pozitivne selekcije. Obuhvaća pregled najmanje 10 000 trsova s više različitih položaja, između kojih se fenotipskom selekcijom u prvoj godini odabere 1 – 2 % najbolje ocijenjenih, koje temeljito pratimo u iduće 3 godine. Utvrđuju se njegove ampelografske, biološke i gospodarske značajke, te zdravstveni status. Ova faza selekcije zaključuje se izborom 50 – 100 elitnih trsova po sorti, koji prolaze u sljedeću fazu selekcije. Tijekom ove selekcije određujemo razlikovne elemente novog klonskog kandidata:

- pozitivnom identifikacijom sorte prema metodi OIV deskriptora
- podjelom elitnih trsova iste sorte u skupine po opaženim pozitivnim tehnološkim osobinama (veći urod, viši šećer, otpornost na bolesti, tolerantnost na stresne uvjete)
- određivanje parametara rodnosti i tehnološke vrijednosti uroda (broj pupova na trsu, broj rodni mladica na trsu, broj grozdova na rodnoj mladici, količina uroda po trsu, prosječna masa grozda, sadržaj šećera u moštu, koncentracija ukupne kiselosti u moštu)
- 3 godine se provodi vizualna zdravstvena selekcija na viruse i njima slične bolesti

- provjera zdravstvenog stanja odabranih elitnih trsova u laboratoriju

Elitni trsovi su klonski kandidati, odabrani u prvoj fazi, izvorni su matični trsovi koji će se cijepljenjem na bezvirusnu baznu podlogu razmnožiti u klonske linije. Tako dobiveni cijepovi prva su generacija potomaka matičnih trsova, koji se sade u izolirani selekcijski nasad na djevičanska tla (gdje nije uzgajana loza najmanje 12 godina). Odabrani klonski kandidati razmnožavaju se za podizanje pokusnog nasada za drugi ciklus selekcije. U pokusni nasad uključen je i „standard“ s kojim se uspoređuje klon u priznavanju. „Standard“ je obično jedan od najraširenijih već priznatih klonova te sorte.

Zaključno ispitivanje traje 3 godine, gdje se mjerenja i opažanja počinju raditi prijelazom nasada u puni rod, te se još jednom laboratorijskim metodama provjeri zdravstvena ispravnost svih trsova. Nakon zaključenja trogodišnjeg ispitivanja eksperimentalnih klonova, rezultati pokusa se statistički obrađuju i objedine u oblik izvještaja, odnosno uvjerenja, koji će omogućiti selekcionaru da donese konačne odluke o izboru najperspektivnijih klonskih kandidata, koje će prijaviti za postupak službenog priznavanja i certifikacije, uzimajući u obzir, uz ova obilježja klona, važnost sorte, zahtjeve tržišta, kao i trendove u vinogradarsko – vinarskoj proizvodnji.

Cijeli postupak klasične klonske selekcije traje 18 – 25 godina, a u Hrvatskoj je pod kontrolom nadležnog Ministarstva, a operativno ga provodi Državni zavod za sjemenarstvo i rasadničarstvo. Postupak priznavanja novih sorata i klonova reguliran je Zakonom o sjemenu, sadnom materijalu i priznavanju sorti poljoprivrednog bilja (NN 140/ 2005). Kod trajnica je u nas potrebno posaditi najmanje 30 trsova svakog novog klona, koji se uspoređuje sa „standardom“. Provjera klona je sastavljena iz sortnih pokusa i laboratorijskih analiza i traje najmanje 3 godine na biljkama starijim od 3 godine. Na temelju svih rezultata Zavod sastavlja ampelografski opis klona i izdaje konačnu potvrdu o provjeri klona. Samo one sorte koje su službeno priznate, pa tako i njihovi klonovi, mogu se upisati na državnu sortnu listu (registracija sorte). Nakon registracije novog klona, registrirani proizvođači certificiranog sadnog materijala obavljaju razmnožavanje klona.

1.4. Pokusni nasad Baštica

Vinogradarsko pokušalište Baštica pokraj Zadra podignuto je 2007. godine na površini od 0,7 ha. Razmak u sadnji iznosi 2,2 x 1,1 m. Podloga na koju su cijepljeni svi trsovi je Kober 5 BB. Pokusni nasad ima uspostavljen sustav zaštite od tuče koji uvelike pomaže u očuvanju nasada. Uzgojni oblik je Guyot, sa reznikom od 2 pupa i dugim rodnim drvom sa 10 pupova.

2. POLIFENOLI

Ova velika grupa spojeva prisutnih u grožđu i vinu igra značajnu ulogu u kakvoći vina (boja, okus, astrigencija, gorčina, potencijal starenja) te imaju antioksidacijska svojstva i antikancerogena svojstva. To su organski spojevi kod kojih je hidroksilna grupa (-OH) neposredno vezana na C atom benzenski prsten. Po broju hidroksilnih grupa dijele se na mono, di, tri i polifenole.

2.1. Svojstva polifenola

Glavne karakteristike su topivost i obojenost, polimerizacija (kemijsko svojstvo), vezanje bjelančevina i intenzivna boja, gorčina, trpkost te biološka aktivnost (fiziološko svojstvo). U tehnologiji proizvodnje vina sudjeluju u formiranju senzornih svojstava vina (boja, astrigencija, trpkost), u reakcijama posmeđivanja i u oksidacijskim procesima uz djelovanje enzima polifenol – oksidaze. Značajni su u fizikalno – kemijskoj stabilizaciji vina (taloženje bjelančevina) i biološkoj stabilizaciji (inhibiranje rada mikroorganizama)

2.2. Osnovna podjela polifenola

2.2.1. Neflavonoidi

FENOLNE KISELINE

- C6 – C1: hidroksibenzojeve kiseline

Tri glavne kiseline su: galna, vanilijska i siringinska. Prisutne su još salicilna i gentizinska. U grožđu su najvećim dijelom u glikozidnom obliku u mesu i u obliku estera sa flavan-3-olima u sjemenkama kao galni i elaginski tanini, npr. epikatehin galat. Koncentracije variraju zavisno od kultivara i uvjeta dozrijevanja. Najzastupljenija je galna kiselina. Koncentracije hidroksibenzojeve kiseline su značajno manje u odnosu na hidroksicimetne kiseline.

- C6 – C1: hidroksicimetne kiseline

To su: cimetna, ρ -kumarna, kaverna, ferulična i sinaptična kiselina. Hidroksicimetne kiseline su najzastupljenija skupina fenolnih spojeva u samotočnim frakcijama mošta i vinima bijelih kultivara. Najvećim dijelom su u *trans* obliku te u obliku estera vezane na vinsku kiselinu:

- *trans*-kaftarna (kaverna + vinska)

- *trans*-kutarna (kumarna + vinska)

-*trans*-fertarna (ferulična + vinska)

U grožđu su uglavnom u esterificiranom obliku. U vinu može doći do njihove hidrolize i oslobađanja slobodnih hidroksicimetnih kiselina, a alkoholu su uglavnom bezbojne, sklone kemijskim promjenama:

- a. enzimatski (oksidacija) – prelaze u žute, smeđe tonove
- b. mikrobiološki – *Brettanomyces* – hlapivi fenoli

- c. *Sacchyromyces* sojevi sa izraženom hidroksicinamat dekraboksilazom – vinil fenoli – piranoantocijani

Piranoantocijani su obzirom na svoju strukturu manje osjetljivi na oksidativne procese te promjene pH u odnosu na antocijane. Nastaju u vinu tijekom fermentacije i dozrijevanja u drvetu. Veća je stabilnost boje s obzirom da se ne vežu na SO₂. Glavni predstavnici su: vitisin A, vitisin B, vinilfenol (4-vinilfenol i 4-vinilguaiacol) piranoantocijani.

Hlapivi fenoli su podrijetlom iz drveta (vanilin, siringaldehid, eugenol, guaiakol...). Radom kvasaca (*Saccharomyces* spp. i *Brettanomyces*) iz *p*-kumarne može nastati vinil fenol iz kojeg dalje redukcijom može nastati etil fenol. Iz ferulične, također radom spomenutih kvasaca može nastati vinil guaiakol iz kojeg dalje redukcijom može nastati etil guaiakol.

STILBENI

To su fitoaleksini, niske molekulske mase, skupina antibiotičkih sastavnica nastalih kao dio sustava obrane biljke od bolesti. Posjeduju antimikrobna svojstva i nalaze se u kožici bobice. Najznačajniji i najistraženiji predstavnik stilbena je *trans*-resveratol. U prirodi *resveratol* se nalazi u obliku dva izomera, *cis* i *trans* u slobodnom i vezanom obliku (u vezanom obliku na 3-O-β-D-glukozide). Stilbeni se javljaju i u oligomernim i polimernim oblicima kao viniferini. Sadržaj resveratola u vinu povezan je s duljinom vremena prisutnosti kožica grožđa u procesu fermentacije, stoga su njegove koncentracije u crnom vinu značajno više u odnosu na bijela zbog toga što se kožice odstranjuju ranije tijekom proizvodnje bijelih vina. Pozitivni su učinci resveratrola na zdravlje, ima antikancerogena svojstva.

2.2.2. Flavonoidi

Lat. *flavone* znači žut. Flavonoidna struktura je temeljena na dva benzenska prstena (prsten A i prsten B), povezanih s tri C atoma koji se u većini slučajeva zatvaraju kisikovim atomom tvoreći pritom heterociklički prsten.

FLAVONOLI

Flavonoli su pigmenti žute boje, dijelom definiraju boju bijelih vina. Zanimljivi su zbog izražene antioksidativne aktivnosti i pozitivnog utjecaja na ljudsko zdravlje. U grožđu flavonoli egzistiraju isključivo kao 3 – glikozidi, dok se u vinu nalaze i aglikoni kao rezultat hidrolize u kiseloj sredini. Najznačajniji predstavnici su: kampferol, izorhamnetin, kvarcetin i miricetin. U svim bijelim sortama su prisutni: 3-O-glukozid 3-O-galaktozidi kemferola, kvarcetina i izorhamnetina te 3-O-glukuronozidi kemferola i kvercetina. Rutin je prisutan u tragovima.

FLAVAN- 3- OLI (FLAVANOLI)

To su nabrojniji flavonoidi u grožđu. Imaju značajnu ulogu u organoleptičnim svojstvima vina i u grožđu se nalaze kao monomerni te oligomerni i polimerni oblici. Predstavnici monomera su: katehin i njegov izomer epikatehin, epikatehin-3-galat, galokatehin, epigalokatehin, katehin-3-galat. Ti monomerni flavan-3-Oil utječu na astrigenciju i gorčinu vina. Sudjeluju u procesu polimerizacije pri čemu se sintetiziraju kondenzirajući tanini. U vinu su zastupljeniji oligomerni i polimerni oblici, najčešće zvani tanini. Proantocijanidini ili kondezirajući tanini, zavisno na što hidroliziraju, dijele se na: procijanidine (tanini koji se razlažu na cijanidine, a u svom sastavu imaju katehin i epikatehin), prodelfinidine (tanini koji u svojoj građi imaju galokatehin i epigalokatehin) te delfinidine. Zavisno od tipa veze poznati su A i B tipovi proantocijanidina koji utječu na astrigenciju. Proantocijanidin B1 je glavni oligomer u kožici dok je proantocijanidin B2 najzastupljeniji u sjemenci.

Sadržaj polimernih fenola u mladim bijelim vinima je manji od 1% od ukupnih fenola. U kontaktu s kožom bobice moguće je povećati koncentraciju za 2% - 5%. U

mladim crnim vinima se kreću od 5% do 15% koncentracije ukupnih fenola. Tijekom starenja crnih vina polimerni fenoli se konstantno povećavaju.

U vinima tijekom starenja polimerne forme pigmentata najviše pridonose sintezi crvene boje. Polimeri su stabilniji prema daljnjoj oksidaciji, stoga je promjena boje nakon nekoliko godina starenja usporena. Ljubičasto crvena boja mladih vina je posljedica monomernih antocijana. Starenjem antocijani stvaraju polimerne forme s drugim flavonoidima.

U proizvodnji crnog vina, fenoli se ekstrahiraju maceracijom i tijekom fermentacije. U gotovim crnim vinima ukupnih fenola ima od 1000 – 2000 mg/L GAE (ekvivalent galne kiseline). Rose vina sadrže ukupnih fenola 400 – 800 mg/L GAE (40% - 60% Flavonoidna). Bijela vina sadrže ukupnih fenola od 100 – 400 mg/L GAE, većina fenola su neflavonoidi, ali ima i nešto katehina (flavonoida) u vrijednostima od 20 mg/L do 40 mg/L. Fenoli iz hrastove bačve su uglavnom neflavonoidi (galna i elaginska kiselina), ekstrahirani iz hrastovine tijekom starenja, a nalazimo ih u vrijednostima od tragova do 200mg/L.

ANTOCIJANIDINI

Ime dolazi od grčke riječi *antos* – cvijet i *kyanos* – ljubičasto. Locirani su u kožici grožđa. Izuzetak su bojadiseri koji imaju obojeno i meso bobice. Najvećim dijelom su u vezanom obliku na monoglukozide: malvidin, delphinidin, cijanidin, peonidin, petunidin 3-O-glikozid. Razlika je između *V. vinifera* i *V. labrusca* gdje su antocijanidini u diglikozidnom obliku.

Antocijanidini su aglikoni koje karakterizira manja stabilnost u odnosu na antocijane, glikozide koji nastaju vezanjem antocijanidina sa šećernom komponentom. Antocijani iz kožice bobice vinove loze uglavnom su 3-O-monoglukozidi i 3-O-acilirani monoglukozidi. Do aciliranja dolazi na C-6 atomu glukoze esterifikacijom s očetnom, kumarnom i kava kiselinom (3-O-acetilmonoglukozid, 3-O-kumarilmonoglukozid). Boja antocijana izravno je povezana s pH. U kiselom mediju antocijani su crveni, povećanjem pH gube svoju boju. Najveći gubitak boje zamijećen je pri povećanju pH od 3,2 do 3,5. Iznad pH 4, boja varira od svijetlo ljubičaste do plave, potom blijedi te biva žuta u

neutralnom i alkalnom mediju. Među antocijanima najzastupljeniji je malvidin glikozid. Acetilirane forme su najviše pod utjecajem kultivara pa tako kod nekih i nisu prisutne (npr. Pinot crni). Antocijanski profil je predložen kao jedan od kemotaksonomskih kriterija za karakterizaciju kultivara.

3. FLOTACIJA

Heterogenost bobica je uzrok razlika u zrelosti bobica sa istog grozda, ali i između bobica sa različitih grozdova iste loze (Jackson i Lombard, 1993). Zrelost bobica obično se izražava s razinom šećera, ali je također povezana s mnogim drugim parametrima kvalitete. Postoji nekoliko razloga za razlike u zrelosti bobica sa istog grozda, ali najvažniji su pozicija grozda na trsu, pozicija bobice unutar grozda, pa čak i površina bobica (Chorti et al , 2010 ; Dai et al. 2011 ; Letaief et al. 2008). Neujednačeni razvoj bobica može dovesti do problema u procesu klonske selekcije, jer klonske razlike određene na temelju slučajnih uzoraka bobica mogu na taj način biti krivo ocijenjene. Stoga, bobice mogu biti razvrstane na temelju njihove zrelosti, pomoću jednostavne metode flotacije, u kojoj se koristi razlika u gustoći bobica (Flora i Lane , 1979; . Rolle i sur , 2012 , 2009) .

Flotacija je postupak razdvajanja bobica iz ukupnog uzorka na temelju njihove specifične težine, tj. stupnja dozrelosti. Potopimo sve bobice u tekućinu koristeći različite koncentracije soli ili šećera saharoze. Bobice na ovaj način isplivaju na površinu, te se razvrstaju u nekoliko razreda gustoće (frakcija), unutar kojih možemo naći slično dozrele bobice (Bartulović, 2013.).

Usporedbom frakcija istog stupnja dozrelosti kod različitih klonova, mogu se utvrditi signifikantne razlike u polifenolnom sastavu klonova. Prema različitim istraživanjima unutar sorte varijabilnosti, glavna strategija uzorkovanja je pobrati odgovarajuće klonske kandidate s istog vinograda, isti dan, neovisno o koncentraciji šećera (punoj zrelosti). Na taj način lakše uočavamo razlike između klonskih kandidata koji imaju različiti period ulaska u punu zrelost.

4. CILJ ISTRAŽIVANJA

Utvrđiti razlike u sadržaju polifenolnih spojeva između klonskih kandidata sorte Plavac mali u postupku klonske selekcije korištenjem bobica istog stupnja zrelosti izdvojenih flotacijom.

5. MATERIJALI I METODE

Materijal ovog istraživanja bilo je grožđe sa 10 bezvirusnih klonskih kandidata Plavca malog (PMC 005, PMC 009, PMC 012, PMC 116, PMC 117, PMC 119, PMC 163, PMC 163, PMC 201, PMC 266), a istraživanje je provedeno 2013. godine u pokusnom nasadu Baštica kod Zadra. Ovi klonski kandidati nalaze se u postupku individualne klonske selekcije. Sa navedenih klonskih kandidata u punoj zrelosti nasumično je uzet uzorak od 15 kg grožđa za daljnje analize koje su provedene u Ampleografskom laboratoriju Agronomskog fakulteta u Zagrebu, pokušalištu Jazbina.

Bobice su sa ukupnog broja grozdova uklonjene uz pomoć škarica, zajedno sa jastučićem peteljke, kako ne bi došlo do istjecanja soka. Sve oštećene bobice izbačene su iz daljnjeg postupka. Ovako odvojene bobice kod svakog klona odvajane su prema gustoći, to jest flotacijom, na način da su bile potopljene u dvije otopine saharoze različitih gustoća (Slika 1). Prva otopina imala je koncentraciju saharoze od 220 g/L, a druga 245 g/L. Bobice koje su isplivale u prvoj, najrjeđoj otopini su one najlakše. Nakon toga su potopljene u gušću otopinu čime su odvojene dodatne dvije frakcije. Na taj način, obzirom na gustoću, dobili smo kod svih 10 klonskih kandidata Plavca malog bobice odvojene u 3 različite frakcije. Te kategorije smo označili sa slovima A (<220 g/L), B (220 – 245 g/L), C (>245g/L). Za analizu polifenolnog sastava koristili smo srednju frakciju bobica (B) iz razloga što su navedene ujednačenog stupnja dozrelosti.

Nakon dobivanja frakcija, uslijedila su sljedeće analize:

- tri uzorka mošta iscijedena iz cca. 50-ak bobica po frakciji korištena su za osnovne analize mošta (sadržaj šećera – refraktometrijski, titracijsku kiselost i pH vrijednost)
- tri uzorka od stotinjak bobica iz B frakcije su spremljene u zamrzivač na -20 °C za analizu sadržaja polifenola u kožici.



Slika 1 Postupak flotacije bobica

5.1. Analiza sadržaja polifenola u kožici

Uzorak je do same ekstrakcije i analize čuvan u zatvorenoj PVC vrećici i zamrznut na -20 C°. Ekstrakcija je provedena prema djelomično modificiranoj metodi opisanoj u Flamini i Tomasi (2000). Prije početka same ekstrakcije, kožica je odvojena od mesa dok je bobica bila u smrznutom stanju te su tako odvojene kožice ostavljene da

se odmrznu. Odmrznute kožice su dobro osušene te usitnjene. Svaki uzorak se radio dvostruko.

Na uzorak mase 500 mg doda se 10 mL ekstrakcijskog otapala (70% etanol, 1% mravlja kiselina, 29% voda). Ekstrakcijska se smjesa macerira 24 sata. Ona se potom centrifugira, a dobiveni supernatant se odvoji. Za potrebe HPLC analize potrebno je ukloniti etanol primjenom rotacijskog uparivača, a dobiveni ostatak se prebaci u odmjernu tikvicu od 10 mL i nadopuni otapalom A do oznake. Dobivena otopina se prije HPLC analize filtrira preko PTFE membranskog filtera.

Sadržaj pojedinačnih polifenola u dobivenim ekstraktima iz kožica određen je RP-HPLC metodom (Berente i sur. 2000.) pomoću HPLC instrumenta Agilent 1100 Series (Agilent, SAD). Odvajanje antocijana provedeno je na Phenomenex Luna Phenyl-hexyl koloni (250 x 4,6 mm, Phenomenex, SAD) uz gradijentno eluiranje korištenjem 0,1 % (v/v) vodene otopine fosforne kiseline (otapalo A) dok se kao otapalo B koristila otopina koja je sadržavala acetonitril: vodu: fosforu kiselinu (50:49,5:0,5; v/v/v) s brzinom protoka od 0,9 mL/min. Tijekom analize su korišteni slijedeći uvjeti: volumen ubrizganog uzorka 20 μ L, temperatura kolone 50°C. Hidroksibenzojeve kiseline detektirane su pri valnoj duljini od 280 nm, p-hidroksicimetne kiseline pri 320 nm, flavonoli pri 360 nm te antocijani pri 518 nm. Flavan-3-oli su određeni primjenom fluorescencijskog detektora pri $\lambda_{ex}=225$ nm i $\lambda_{em}=320$ nm. Identifikacija pikova temeljila se na usporedbi vremena zadržavanja komponenti iz uzorka sa vremenima zadržavanja, kao i usporedbom s UV spektrima standarda, dok je za kvantifikaciju korištena metoda vanjskog standarda.

6. REZULTATI I RASPRAVA

6.1. Udio frakcija bobica različitog stupnja zrelosti

Klonski kandidati uključeni u istraživanje razlikovali su se s obzirom na udio pojedinih frakcija bobica različitog stupnja zrelosti (Graf 1). Kako je ranijim istraživanjem (Bartulović, 2013) kod tri klonska kandidata Plavca malog utvrđeno da stupanj zrelosti bobica, koje su flotacijom razdvojene u 4 frakcije, značajno utječe na polifenolni sastav, u ovom istraživanju za usporedbu polifenolnog sastava 10 klonskih kandidata odabrana je jedna frakcija (B) koja je na približno istom stupnju zrelosti kod svih klonskih kandidata (Graf 2). Ova frakcija je odabrana i zbog toga što je prinos bobica bio dovoljan za provedbu analize polifenola, a ujedno se radi o bobicama sa relativno visokim sadržajem šećera što upućuje na to da su na visokom stupnju zrelosti što je u direktnoj vezi sa sadržajem polifenolnih spojeva i općenito fenolnom zrelošću. Najniži sadržaj šećera utvrđen je kod klonskog kandidata PMC266 (Graf 1) kod kojeg je ujedno vidljivo kako je prinos bobica frakcije B bio najniži (Graf 1). Klonski kandidati sa najvećim sadržajem šećera su PMC 099 i PMC117, te su ujedno dali i najveći prinos bobica frakcije B. Među ostalim klonskim kandidatima nisu utvrđene signifikantne razlike u sadržaju šećera, kao ni u prinosu bobica frakcije B.



Slika 2¹ Klonski kandidat PMC 099

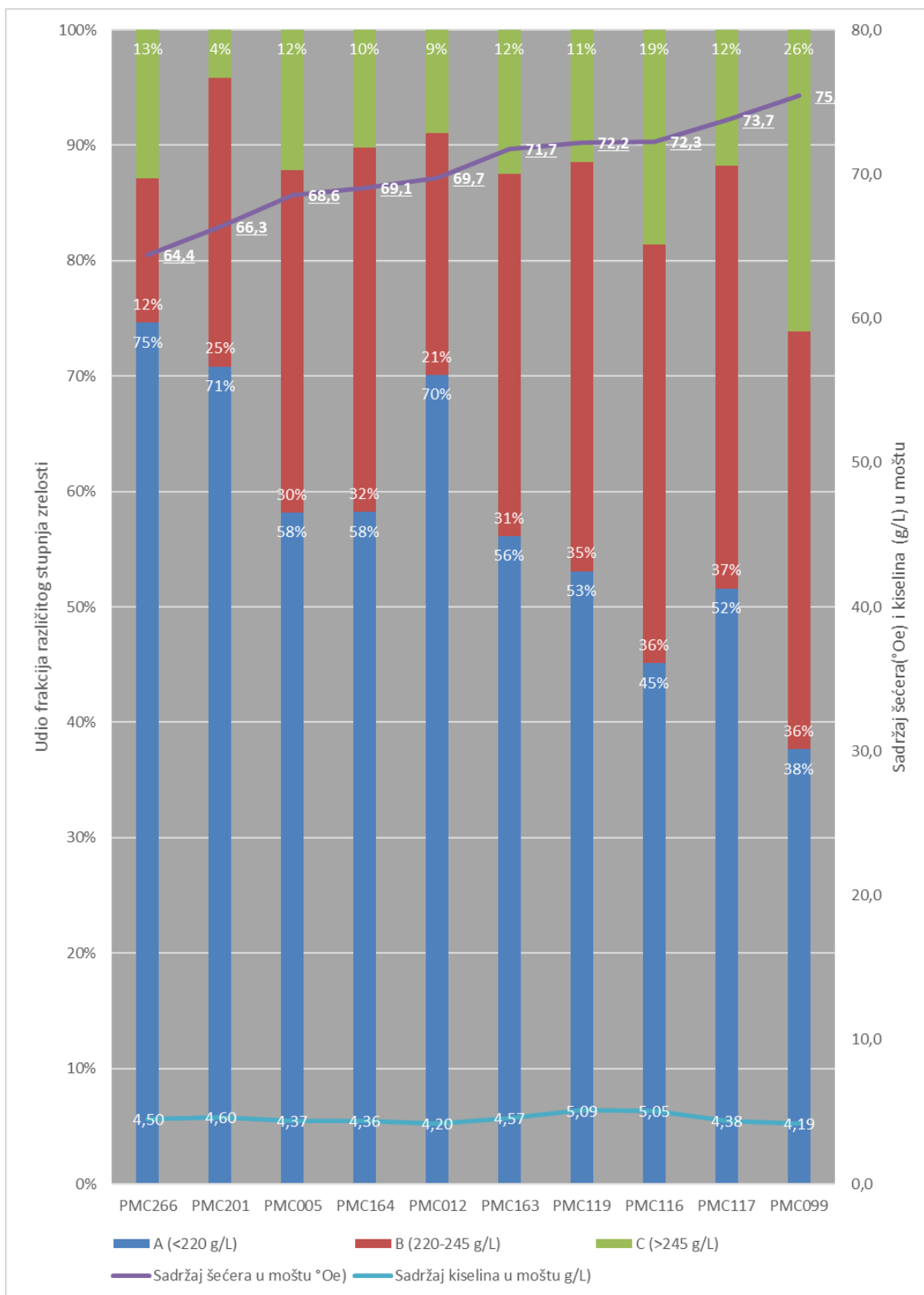


Slika 3¹ Klonski kandidat PMC 117

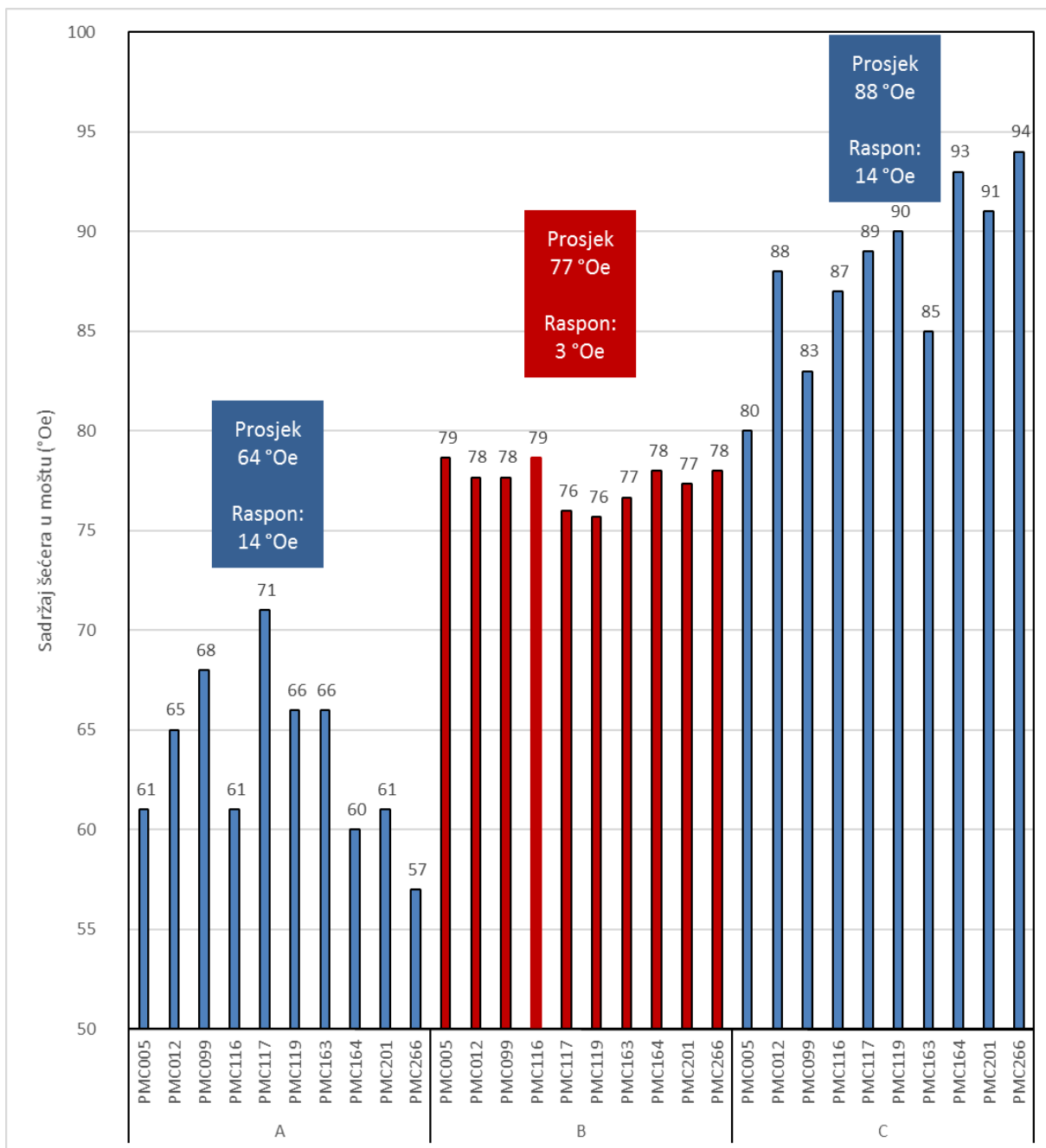


Slika 4¹ Klonski kandidat PMC 266

¹ Autor slika 2, 3 i 4 Darko Preiner



Graf 1 Udio frakcija bobica razdvojenih flotacijom (korištenjem otopine saharoze), sadržaj šećera i kiselina u moštu kod 10 klonskih kandidata sorte Plavac mali.



Graf 2 Sadržaj šećera kod triju frakcija bobica izdvojenih flotacijom kod 10 klonova sorte Plavac mali (A <220 g/L, B 220-245 g/L i C >245 g/L) – unutar B frakcije analizom varijance nije utvrđena statistički značajna razlike sadržaja šećera u moštu

6.2. Sadržaj antocijana

Ukoliko uzmemo u obzir da je za analizu korištena frakcija B, koja kako je već opisano ranije, ima najujednačeniji stupanj zrelosti bobica, posebno su zanimljive signifikantne razlike u sadržaju antocijana kod ispitivanih klonova (Tablica 1). Klonski kandidat PMC 099 istaknuo se sa signifikantno najvišim sadržajem svih pojedinačnih antocijana. Signifikantno nižu vrijednost delphinidina od ostalih klonskih kandidata imali su PMC 012, PMC 164 i PMC 266, dok se PMC 117 istaknuo vrijednošću višom od ostalih (osim PMC 099).

Signifikantno niže vrijednosti cijanidina od PMC 099 imaju klonski kandidati PMC 012, PMC 119 i PMC 266, dok se sa višim vrijednostima istaknuo PMC 116, ali opet signifikantno nižu od PMC 099. Najnižu vrijednost petunidina imaju klonski kandidati PMC 012 i PMC 266, dok se ostali statistički signifikantno razlikuju. Klonski kandidati PMC 119, PMC 012 i PMC 266 signifikantno se razlikuju od ostalih sa najnižom vrijednosti antocijana peonidina, a najnižu vrijednost malvidina ima PMC 012.

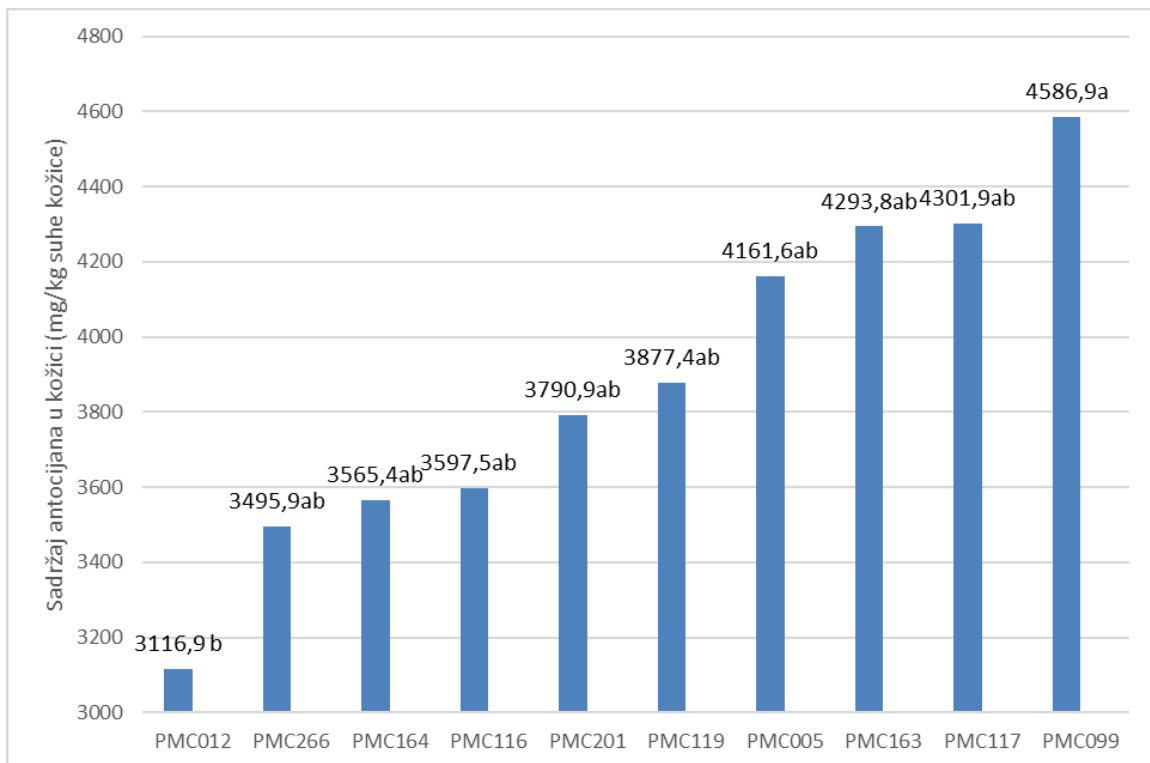
Kod dvogodišnjeg istraživanja (2009. – 2010.) sadržaja antocijana (Preiner, 2012) unatoč postojanju određenih razlika, nisu utvrđene signifikantne razlike u sadržaju malvidina i petunidina kod istih klonskih kandidata sorte Plavac mali, međutim klonski kandidati PMC 099 i PMC 117 imali su viši sadržaj oba navedena spoja u odnosu na ostale kandidate. Kod sadržaja delphinidina i peonidina utvrđene su signifikantne razlike između klonskih kandidata, slično kao i u ovom istraživanju.

Analizom pojedinih antocijana kod 10 klonskih kandidata Plavca malog, utvrđene su signifikantne razlike u vrijednostima pojedinih antocijana što je također vidljivo i u slučaju ukupnih antocijana (Graf 3). Najnižu vrijednost ima PMC 012, najvišu PMC 099, a ostali se signifikantno ne razlikuju prema sadržaju ukupnih antocijana.

Tablica 1 Usporedba srednjih vrijednosti sadržaja antocijana kod 10 klonskih kandidata sorte Plavac mali u frakciji bobica izdvojenih flotacijom pri gustoći otopine saharoze od 220 – 245 g/L

| Klon | Delfinidin* | Cijanidin | Petunidn | Peonidin | Malvidin |
|--------|----------------|--------------|---------------|---------------|----------------|
| PMC005 | 451,78ab** | 23,3 abc | 488,8abc | 94,3 ab | 3103,4ab |
| PMC012 | 358,10b | 13,6c | 378,9c | 63,8cde | 2302,4b |
| PMC099 | 619,74a | 31,8a | 600,2a | 105,4a | 3229,7a |
| PMC116 | 415,12b | 27,7ab | 434,6bc | 86,6ab | 2633,5ab |
| PMC117 | 522,54ab | 24,6abc | 543,8ab | 90,1ab | 3120,7ab |
| PMC119 | 449,67ab | 14,3c | 468,1abc | 60,2e | 2885,1ab |
| PMC163 | 481,55ab | 19,9bc | 504,6abc | 81,7bcd | 3205,9a |
| PMC164 | 387,08b | 20,5bc | 422,8bc | 82,5bc | 2652,5ab |
| PMC201 | 437,16ab | 19,5bc | 461,1abc | 78,1bcde | 2795,1ab |
| PMC266 | 392,99b | 13,9c | 412,0bc | 60,9de | 2616,0ab |

*u obliku 3-o-glikozida, ** srednje vrijednosti označene različitim slovima su signifikantno različite (*Duncan's multiple range test* uz $p < 0,05$)



Graf 3 Usporedba srednjih vrijednosti sadržaja ukupnih antocijana u kožici kod 10 klonskih kandidata sorte Plavac mali (u frakciji bobica izdvojenih flotacijom pri gustoći otopine saharoze od 220-245 g/L)*srednje vrijednosti označene različitim slovima su signifikantno različite (*Duncan's multiple range test* uz $p < 0,05$)

6.3. Sadržaj flavonola

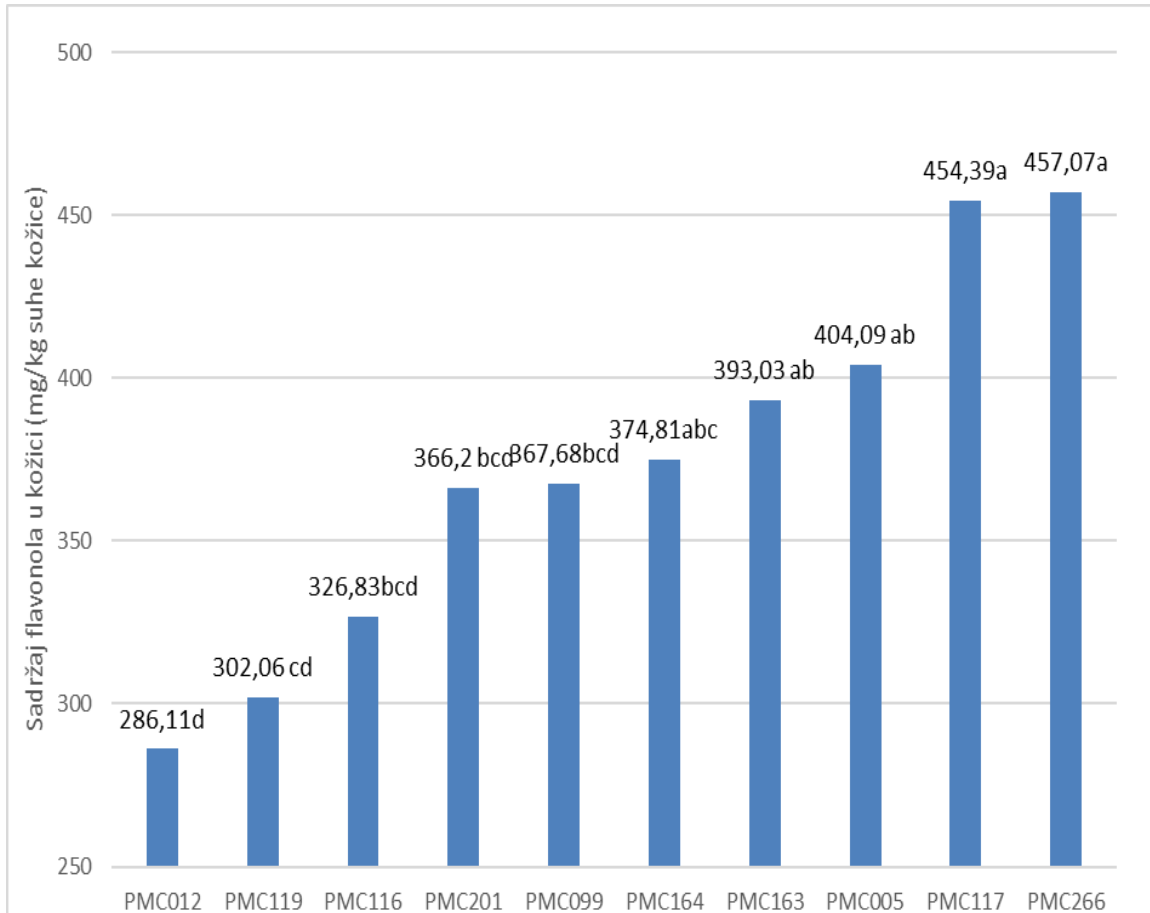
U tablici 2 prikazane su prosječne vrijednosti flavonola utvrđene kod klonskih kandidata. Vidimo kako se vrijednosti signifikantno razlikuju po pojedinačnim spojevima, odnosno, u pojedinom slučaju nisu utvrđeni (rutin kod PMC 012). Najniža vrijednost rutina ustanovljena je kod PMC 116 i signifikantno se razlikuje od vrijednosti drugih kandidata. Statistički, najvišu vrijednost ovog flavonola imao je PMC 266. Signifikantne razlike u sadržaju hiperozida vidljive su kod PMC 005, 163, 164 i 266, koji ujedno imaju i najviše vrijednosti. Najniži sadržaj utvrđen je kod PMC 119. Kod miricetin-3-o-glikozida, signifikantno se razlikuje PMC 116 zbog najniže vrijednosti, dok najviši sadržaj ima PMC 266. Najviši sadržaj kvercetin-3-o-glikozida ima PMC 266, zatim PMC 117 te se oni signifikantno razlikuju od ostalih klonova. Najniža vrijednost ustanovljena je kod PMC 119. Vrijednosti kamferol-3-o-glikozida variraju od PMC 164, koji ima najvišu vrijednost, do PMC 119 sa statistički najnižom vrijednosti. Ostali se klonovi statistički signifikantno razlikuju. Kod izoramnetin-3-o-glikozida PMC 012, PMC 116 i PMC 201 signifikantno se razlikuju po nižim vrijednostima od ostalih. Najviši sadržaj ovog flavonola imao je PMC 117.

Tablica 2 Usporedba srednjih vrijednosti sadržaja flavonola kod 10 klonskih kandidata sorte Plavac mali u frakciji bobica izdvojenih flotacijom pri gustoći otopine saharoze od 220-245 g/L

| klon | Rutin | Hiperozid | Miricetin-3-o-glikozid | Kvercetin-3-o-glikozid | Kamferol-3-o-glikozid | Izoramnetin-3-o-glikozid |
|--------|--------|-----------|------------------------|------------------------|-----------------------|--------------------------|
| pmc005 | 15,4b* | 33,5ab | 56,8a | 229,7ab | 36,8bc | 31,8a |
| pmc012 | 0 | 21,9c | 49,8a | 162,6c | 24,8d | 26,8ab |
| pmc099 | 15,5b | 28,2b | 56,8a | 214,2abc | 29,2cd | 23,7b |
| pmc116 | 8,7c | 28,5b | 25,24b | 200,7bc | 34,4bc | 29,1ab |
| pmc117 | 15,9b | 36,7a | 62,7c | 258,3a | 45,7a | 34,9a |
| pmc119 | 13,5bc | 20,8c | 52,0a | 160,7c | 23,1d | 31,9a |
| pmc163 | 14,4b | 30,5ab | 61,9a | 215,8abc | 36,3bc | 33,9a |
| pmc164 | 16,2b | 31,6ab | 60,1a | 192,9bc | 40,3ab | 33,4a |
| pmc201 | 16,2b | 27,7b | 59,8a | 199,7bc | 32,7bc | 29,9ab |
| pmc266 | 24,4a | 31,1ab | 67,2a | 262,8a | 36,8bc | 34,7a |

* srednje vrijednosti označene različitim slovima su signifikantno različite (*Duncan's multiple range test* uz $p < 0,05$)

Usporedimo li vrijednosti ukupnih srednjih vrijednosti flavonola, zaključujemo da signifikantno najvišu vrijednost ovih polifenola ima PMC 266, te nešto nižu vrijednost PMC 117, dok je vidljivo najnižu vrijednost imao PMC 012 (Graf 4).



Graf 4 Usporedba srednjih vrijednosti sadržaja ukupnih flavonola u kožici kod 10 klonskih kandidata sorte Plavac mali (u frakciji bobica izdvojenih flotacijom pri gustoći otopine saharoze od 220-245 g/L)

6.4. Sadržaj flavanola

Analizom sadržaja flavanola ustanovljene su sljedeće razlike (Tablica 3). Procijanidin B2 i procijanidin B4 pronađeni su jedino kod klona PMC 099. Najvišu vrijednost procijanidina B1 ima PMC 201, nesignifikantno niži sadržaj ustanovljen je kod PMC 005, dok se ostali klonski kandidati signifikantno razlikuju. Najnižu vrijednost ima PMC 012. Najvišom se vrijednosti signifikantno razlikuje PMC 266 u sadržaju

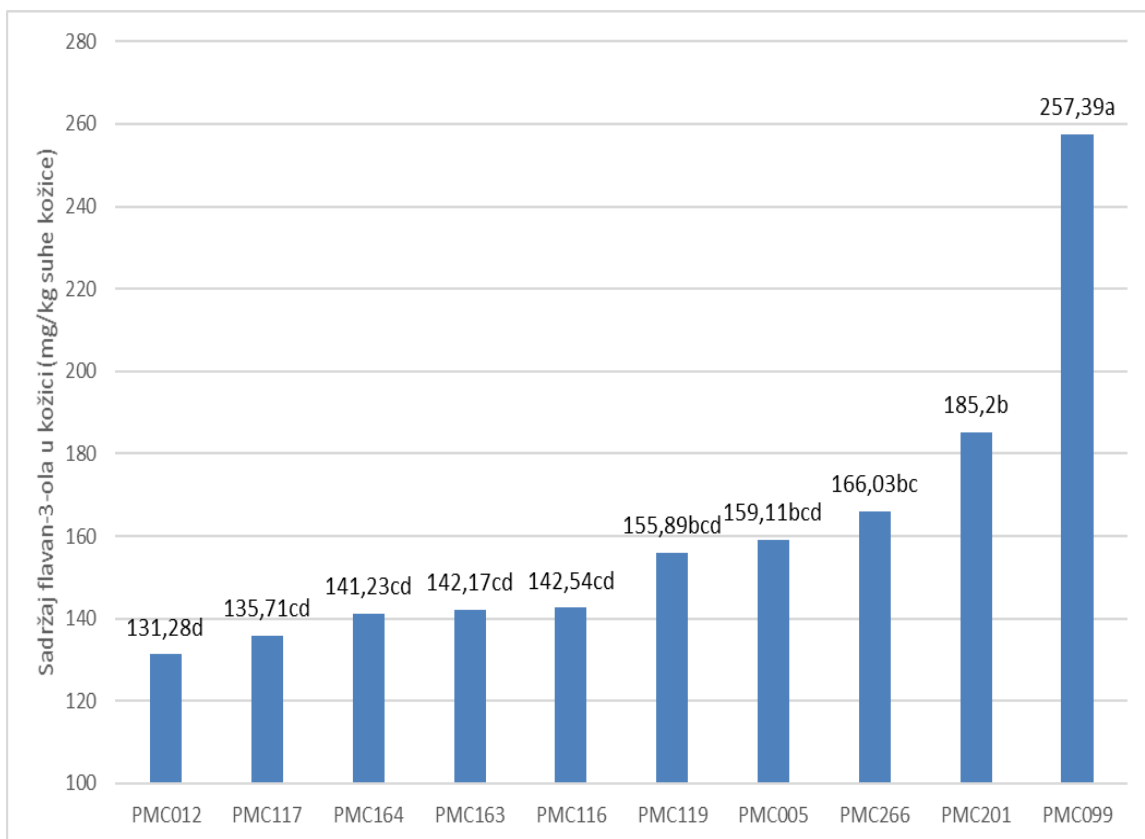
galokatehina i katehina, a statistički najniži sadržaj katehina ima PMC 005, dok je u slučaju galokatehina to PMC 012. Epikatehin je pronađen u svega 3 klon, PMC 099, PMC 117 i PMC 201 (ovaj klon ima ujedno i najviši sadržaj ovog polifenola). Klon PMC 099 ima najviši sadržaj epigalokatehina te se signifikantno razlikuje od ostalih. Suprotno tome, najnižu vrijednost ovog polifenola ima PMC 117.

Tablica 3 Usporedba srednjih vrijednosti sadržaja flavanola kod 10 klonskih kandidata sorte Plavac mali u frakciji bobica izdvojenih flotacijom pri gustoći otopine saharoze od 220-245 g/L

| klon | Epigalokatehin | Epikatehin | Galokatehin | Katehin | Procijanidin B1 | Procijanidin B2 | Procijanidin B4 |
|--------|----------------|------------|-------------|---------|-----------------|-----------------|-----------------|
| pmc005 | 48,8abcd* | 0 | 7,33bcd | 11,8d | 91,18a | 0 | 0 |
| pmc012 | 45,87bcd | 0 | 5,35d | 16,8bc | 63,18c | 0 | 0 |
| pmc099 | 63,1a | 21,4a | 6,09cd | 19,9bc | 83,55ab | 37,66 | 25,53 |
| pmc116 | 46,12bcd | 0 | 6,44bcd | 16,2bcd | 66,19c | 0 | 0 |
| pmc117 | 34,1d | 19,6c | 7,96bc | 15,7cd | 64,76c | 0 | 0 |
| pmc119 | 62,04ab | 0 | 5,45d | 21,1ab | 67,35c | 0 | 0 |
| pmc163 | 51,4abc | 0 | 6,5bcd | 17,2bc | 66,88c | 0 | 0 |
| pmc164 | 43,9cd | 0 | 8,15b | 17,8bc | 66,54c | 0 | 0 |
| pmc201 | 52,6abc | 22,6a | 7,65bc | 18,1bc | 91,54a | 0 | 0 |
| pmc266 | 57,2abc | 0 | 10,56a | 25,2a | 72,98bc | 0 | 0 |

* srednje vrijednosti označene različitim slovima su signifikantno različite (*Duncan's multiple range test* uz $p < 0,05$)

Kako je i statistički ustanovljeno, signifikantno najveći sadržaj flavanola ima klon PMC 099, kod kojeg su jedino pronađeni svi istraživani flavanoli. U odnosu na njega, signifikantno najnižu ukupnu srednju vrijednost ima kod klon PMC 012, koji je i u analizi pojedinih flavanola pokazao niže vrijednosti od ostalih kandidata. Unutar ova dva ekstrema, pronađene su signifikantne razlike između klonova PMC 117, PMC 164, PMC 163 i PMC 116, sa nešto višim sadržajem flavanola od najniže vrijednosti, odnosno kod PMC 119, PMC 005 i PMC 266. Klonski kandidat PMC 201 sadrži nešto manje od pola vrijednosti ukupnih flavanola od PMC 099.



Graf 5 Usporedba srednjih vrijednosti sadržaja ukupnih flavanola u kožici kod 10 klonskih kandidata sorte Plavac mali (u frakciji bobica izdvojenih flotacijom pri gustoći otopine saharoze od 220-245 g/L)

*srednje vrijednosti označene različitim slovima su signifikantno različite (*Duncan's multiple range test* uz $p < 0,05$)

7. ZAKLJUČAK

Na kraju ovog istraživanja možemo zaključiti kako unutar, a tako i između klonova, postoji značajna varijabilnost bobica koja je u direktnoj vezi sa sadržajem šećera u njima, a time i sa njihovim stupnjem dozrelosti. Brojni su razlozi postojanja ove varijabilnosti, a ovim istraživanjem je dokazano kako ona varira i zavisno o klonu neke sorte, tj. da u ovom svojstvu također postoji značajna unutarSORTNA varijabilnost. Rezultati su pokazali flotaciju kao dobar alat odvajanja bobica po zrelosti za kvalitetniju usporedbu klonskih kandidata. Također, utvrđeno je kako klon PMC 099 ima signifikantno najviši sadržaj antocijana i flavanola, dok mu je sadržaj flavonola signifikantno niži od klona PMC 266, koji ih sadrži najviše. Klon PMC 012 sadrži signifikantno najmanji udio svih istraživanih skupina polifenola.

Rezultati ovog istraživanja ukazuju nam na to da je tijekom uzorkovanja potrebno paziti na stupanj dozrelosti pojedinih klonova, odnosno, samim izlaskom na teren ne možemo sa sigurnošću reći da će pojedini klon biti u punom potencijalu posebno u uvjetima u kojima kao sorta nema mogućnost postizanja pune zrelosti. Tu dolazimo do flotacije, metode za dobivanje uzoraka bobica na relativno ujednačenom stupnju zrelosti te daljnjim analizama takvog uzorka procjenjujemo gospodarsku vrijednost pojedinog klona.

8. LITERATURA

1. Bartulović Luka, 2013. Polifenolni sastav klonova kultivara Plavac mali (V. vinifera L.) ovisno o stupnju zrelosti bobica. Diplomski rad, Zagreb Agronomski fakultet
2. Berente, B., De la Calle García, D., Reichenbacher, M., Danzer, K. 2000. Method development for the determination of anthocyanins in red wines by high-performance liquid chromatography and classification of German red wines by means of multivariate statistical methods. *Journal of Chromatography A*, 871(1), 95-103.
3. Chorti, E., Guidoni, S., Ferrandino, A., Novello, V., 2010. Effect of Different Cluster Sunlight Exposure Levels on Ripening and Anthocyanin Accumulation in Nebbiolo Grapes. *American Journal of Enology and Viticulture* 61, 23–30.
4. Dai, Z.W., Ollat, N., Gomès, E., Decroocq, S., Tandonnet, J.-P., Bordenave, L., Pieri, P., Hilbert, G., Kappel, C., van Leeuwen, C., Vivin, P., Delrot, S., 2011. Ecophysiological, Genetic, and Molecular Causes of Variation in Grape Berry Weight and Composition: A Review. *American Journal of Enology and Viticulture* 62, 413–425
5. Favretto, D., Flamini, R. 2000. Application of electrospray ionization mass spectrometry to the study of grape anthocyanins. *American Journal of Enology and Viticulture*, 51(1), 55-64.
6. Flora, L.F., Lane, R.P., 1979. Effects of Ripeness and Harvest Date on Several Physical and Compositional Factors of Cowart Muscadine Grapes. *American Journal of Enology and Viticulture* 30, 241–246
7. Jackson, D.I., Lombard, P.B., 1993. Environmental and Management Practices Affecting Grape Composition and Wine Quality - A Review. *American Journal of Enology and Viticulture* 44, 409–430.

8. Maletić, E., Karoglan Kontić, J., Pejić, I. 2008. Vinova loza: ampelografija, ekologija i oplemenjivanje. Školska knjiga, Zagreb
9. Maletić, E., Pejić, I., Karoglan Kontić, J. 2009. Plavac mali. Znanje, Zagreb
10. Maletić, E., Pejić, I., Kontić, J. K., Piljac, J., Dangl, G. S., Vokurka, A., Meredith, C. P. (2004). Zinfandel, Dobrić, and Plavac mali: The Genetic Relationship among Three Cultivars of the Dalmatian Coast of Croatia. *American journal of enology and viticulture*, 55(2), 174-180.
11. Mirošević N., Karoglan Kontić J. 2008. Vinogradarstvo, nakladni zavod Globus, Zagreb
12. Preiner, D. 2012. Učinkovitost masovne pozitivne selekcije unutar populacija autohtonih sorata vinove loze (*V. vinifera* L.) u Dalmaciji, doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet
13. Rolle, L., Torchio, F., Zeppa, G., Gerbi, V., 2009. Relationship between Skin Break Force and Anthocyanin Extractability at Different Ripening Stages. *American Journal of Enology and Viticulture* 60, 93–97.

9. ŽIVOTOPIS AUTORA

Petra Balažić rođena je 26. 03. 1991. u Zagrebu. Osnovnu školu pohađa u Velikoj Gorici, a prirodoslovno – matematičku gimnaziju završava 2009. godine u V. gimnaziji u Zagrebu. Iste godine upisuje preddiplomski sveučilišni studij na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, smjer Hortikultura. Akademski naziv Sveučilišnog prvostupnika stječe 2012. godine obranom završnog rada pod nazivom „Vinogradarske regije za proizvodnju predikatnih vina“. Diplomski sveučilišni studij Hortikultura – vinogradarstvo i vinarstvo upisuje akademske godine 2012./2013. Tijekom diplomskog studija aktivno sudjeluje u radu Ampelografske grupe pod mentorstvom prof. dr. sc. Edija Maletića i doc. dr. sc. Darka Preinera. Dobitnica je stipendije Hrvatske Školske Zaklade pod pokroviteljstvom Miljenka Grgića, čime joj je dodijeljena 2014. godine stručna praksa u trajanju od tri mjeseca u vinariji „Opolo“ u Kaliforniji, SAD. Godine 2015. obavlja praksu u vrijeme berbe i prerade grožđa u vinariji „Saints Hills“ na poluotoku Pelješcu, Hrvatska.