

UNIVERZA V NOVI GORICI  
VISOKA ŠOLA ZA VINOGRADNIŠTVO IN VINARSTVO

**VPLIV TRETIRANJA VINSKE TRTE  
S PLINSKIM OZONOM IN UVB-SVETLOBO  
NA VSEBNOST FENOLNIH SNOVI V GROZDJU SORTE  
'CABERNET SAUVIGNON' (*VITIS VINIFERA* L.)**

DIPLOMSKO DELO

**Rok JEŽ**

Mentorja: Melita Sternad Lemut, *univ. dipl. inž. živ. tehnol.*,  
dr. Kajetan Trošt

Nova Gorica, 2013

## **ZAHVALA**

Zahvaljujem se ge. Meliti Sternad Lemut in dr. Kajetanu Troštu za mentorstvo ter za trud in čas, ki sta ga namenila nastajanju te diplomske naloge.

Iskreno se zahvaljujem tudi družini Škrlj iz Vrhpolj, ki nam je prijazno odstopila vinograd za opravljanje terenskega poskusa.

Hvala tudi sodelavcem iz podjetja TRS-GRO, ki so potrpežljivo prenašali moje usklajevanje študijskih in delovnih dolžnosti.

Nazadnje še hvala vsem mojim, še posebej Nevi, Marcelu in Aniki, brez vas bi bilo veliko težje.

## POVZETEK

Mnoge raziskave poročajo o škodljivem vplivu povečane intenzitete UV-svetlobe in povečane koncentracije ozona na rast kmetijskih pridelkov in na njihovo končno kakovost. Fenolne spojine grozdja so, poleg tega, da so vključene v mnoge pomembne biološke procese vinske trte, odločilne tudi za nekatere kakovostne značilnosti grozdja in vina (barva, vonj, okus). V grozdju *Vitis vinifera* najdemo v kožicah in pečkih predvsem tri prevladujoče razrede fenolov (antociani, flavonoli in flavan-3-oli). Antociani so primarno odgovorni za rdečo barvo vina, flavonoli pa ščitijo rastlino pred UV-sevanjem. V okviru diplomskega dela smo opazovali reakcijo vinske trte, sorte 'Cabernet Sauvignon' (*Vitis vinifera* L.), na umetno sprožen abiotski stres. V vinogradu v vasi Vrhpolje smo v letu 2010 opazovali trse, tretirane s plinskim ozonom in s povečano intenziteto UVB-svetlobe. Analitsko smo ovrednotili, kako povzročen stres vpliva na osnovne parametre in na vsebnost nekaterih tehnološko pomembnejših fenolnih spojin v grozdju. Osnovne kakovostne parametre (vsebnost skupnih kislin, vrednost pH, sladkorna stopnja) in osnovne količinske parametre (masa 100 jagod) smo spremljali s standardnimi metodami. Vsebnost skupnih fenolov smo določili spektrofotometrično, profile antocianov in flavonolov pa smo določali s pomočjo HPLC-UV/VIS tehnike v metanolnih ekstraktih grozdnih kožic. Rezultati so nakazali upad mase 100 jagod pri vzorcih, tretiranih z UVB-svetlobo, kakor tudi pri vzorcih, tretiranih z ozonom v primerjavi s kontrolo. Sprožen abiotski stres pa je povzročil tudi mnoge spremembe v kvantitativnih in kvalitativnih profilih flavonolov in antocianov.

Ključne besede: 'Cabernet Sauvignon', fenoli, flavonoli, antociani, ozon, UVB-svetloba

## SUMMARY

Many research studies are reporting about adverse impact of increased intensity of UV light and ozone concentrations on the growth of agricultural crops and their final quality. Beside enrolment into many important biological processes, phenolic compounds are crucial in the determination of grape and wine quality attributes (color, aroma, taste). Three dominant classes of phenolics (anthocyanins, flavonols and flavan-3-ols) are found mainly in the skins and seeds of *Vitis vinifera* grapes. Anthocyanins are primarily responsible for the red wine color, while flavonols are known to protect the plant from UV radiation. In our work, we have observed the reaction of grapevine 'Cabernet Sauvignon' (*Vitis vinifera* L.) to artificially induced abiotic stress. In the vineyard of village Vrhpolje, we observed (in vintage 2010) the group of selected vines, treated with gaseous ozone and with the increased intensity of UV-B light. Analytical assessment was given in order to demonstrate the stress-induced effect on the basic quality parameters as well as the content of phenolic compounds in grapes. Basic quality parameters (total acidity, pH, sugar level) and basic quantitative parameters (mass of 100 berries) were assessed using standard procedures. Total phenolics contents were determined spectrophotometrically, while profiles of anthocyanins and flavonols were determined using HPLC-UV/VIS techniques on the methanol extracts of grape skins. The results suggested a decrease in mass of 100 berries in both, samples treated with UV-B light, as well as samples treated with ozone, in comparison with the control. Initiated abiotic stress also led to many changes in the qualitative and quantitative profiles of flavonols and anthocyanins.

Key words: 'Cabernet Sauvignon', phenols, flavonols, anthocyanins, ozone, UV-B light

## KAZALO VSEBINE

ZAHVALA.....	II
POVZETEK .....	III
SUMMARY .....	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
SEZNAM TABEL.....	VII
SEZNAM SLIK.....	VIII
OKRAJŠAVE.....	X
SIMBOLI.....	XI
1 UVOD.....	1
1.1 Povod za delo .....	1
1.2 Delovna hipoteza .....	2
2 TEORETIČNE OSNOVE .....	3
2.1 Sorta 'Cabernet Sauvignon'.....	3
2.1.1 Botanični opis.....	3
2.1.2 Agrobiotične značilnosti.....	4
2.2 Kemijska sestava grozdja .....	5
2.2.1 Primarni metaboliti.....	5
2.2.1.1 Sladkorji .....	5
2.2.1.2 Organske kisline .....	5
2.2.2 Sekundarni metaboliti.....	6
2.2.2.1 Fenoli.....	6
2.2.2.1.1 Flavonoidi.....	7
2.3 UV-sevanje.....	8
2.3.1 UVB-sevanje .....	9
2.4 Ozon .....	10
2.4.1 Onesnaženost zraka z ozonom.....	11
3 EKPERIMENTALNI DEL .....	13
3.1 Materiali .....	13
3.1.1 Rastlinski material.....	13

3.1.2	Poskusni vinograd .....	13
3.1.3	Zasnova poskusa.....	14
3.1.4	Vzorčenje.....	16
3.2	Metode.....	16
3.2.1	Priprava vzorcev .....	16
3.2.1.1	Priprava grozdnih jagod/groznega soka za merjenje osnovnih kakovostnih parametrov grozdja .....	16
3.2.1.2	Ekstrakcija fenolnih komponent iz kožic grozdnih jagod .....	17
3.2.1.3	Priprava vzorcev za HPLC analize.....	17
3.2.2	Analitski postopki.....	17
3.2.2.1	Analiza osnovnih kakovostnih parametrov v grozdnem soku.....	17
3.2.2.2	Določanje mase 100 jagod.....	19
3.2.2.3	Spektrofotometrična analiza skupnih fenolov v grozdnih kožicah .....	19
3.2.2.4	HPLC analiza antocianov in flavonolov.....	20
3.3	Obdelava podatkov .....	22
4	REZULTATI IN RAZPRAVA .....	23
4.1	Osnovni kakovostni in količinski parametri grozdja.....	23
4.1.1	Vsebnost suhe snovi (sladkorna stopnja) .....	23
4.1.2	Vsebnost skupnih titracijskih kislin.....	25
4.1.3	pH-vrednost .....	26
4.1.4	Masa stotih jagod.....	27
4.2	Vsebnost fenolnih snovi v jagodni kožici .....	28
4.2.1	Vsebnost skupnih fenolov .....	28
4.2.2	Vsebnost skupnih flavonolov .....	29
4.2.3	Vsebnost posameznih flavonolov.....	31
4.2.4	Vsebnost skupnih antocianov .....	32
4.2.5	Vsebnost posameznih antocianov.....	34
5	ZAKLJUČKI .....	35
6	VIRI.....	36

## SEZNAM TABEL

Tabela 1: Zbirna tabela osnovnih parametrov meritev vsebnosti ozona za merilno mesto Nova Gorica od leta 2002 do 2010 (PMK – povprečna mesečna koncentracija, MAX – najvišja koncentracija, > OV – število primerov s preseženo opozorilno vrednostjo, >AV – število preseženih alarmnih vrednosti, AOT40 – parameter za zaščito rastlin, >CV – število dni s preseženo ciljno vrednostjo).....	11
Tabela 2: HPLC-UV/VIS analitski pogoji za analizo antocianov oziroma flavonolov .	21
Tabela 3: Prikaz koncentracije posameznih flavonolov (mg/kg) v grozdju ob trgatvi pri kontrolnem obravnavanju (K); obravnavanju, tretiranim s plinskim ozonom nižje koncentracije (O3n); obravnavanju, tretiranim s plinskim ozonom višje koncentracije (O3V); obravnavanju, tretiranim daljši čas z nižjo intenziteto sevanja UVB-svetlobe (UV Dn); ter pri obravnavanju, tretiranim krajši čas z višjo intenziteto sevanja UVB-svetlobe (UV kV). V tabeli je ob povprečni vrednosti prikazan še standardni odklon meritev.....	31
Tabela 4: Prikaz koncentracije posameznih antocianov (mg/kg) v grozdju ob trgatvi pri kontrolnem obravnavanju (K); obravnavanju, tretiranim s plinskim ozonom nižje koncentracije (O3n); obravnavanju, tretiranim s plinskim ozonom višje koncentracije (O3V); obravnavanju, tretiranim daljši čas z nižjo intenziteto sevanja UVB-svetlobe (UV Dn); ter pri obravnavanju, tretiranim krajši čas z višjo intenziteto sevanja UVB-svetlobe (UV kV). V tabeli je ob povprečni vrednosti prikazan še standardni odklon meritev.....	34

## SEZNAM SLIK

<i>Slika 1: 'Cabernet Sauvignon' (Hrček in Korošec - Koruza, 1996, str. 109) .....</i>	4
<i>Slika 2: Antocianidinski skelet glavnih antocianov v grozdju (Margalit, 2004, str. 45)..</i>	7
<i>Slika 3: Poskusni vinograd sorte 'Cabernet Sauvignon' v Vrhpolju, Vipavska dolina (Foto: Melita Sternad Lemut, 2010).....</i>	13
<i>Slika 4: Eksperimentalna shema terenskega poskusa .....</i>	15
<i>Slika 5: Trsi, obsevani z UVB-svetlobo (Foto: Melita Sternad Lemut, 2010).....</i>	15
<i>Slika 6: Tretiranje izbranih trsov s plinskim ozonom (Foto: Melita Sternad Lemut, 2010).....</i>	16
<i>Slika 7: Avtomatski titrator s pH-elektrodo (Titrino 848 plus, Metrohm; Švica) (Foto: Rok Jež, 2012) .....</i>	18
<i>Slika 8: Tehnica KERN ABJ 120-4M (Foto: Rok Jež, 2012) .....</i>	19
<i>Slika 9: Določanje skupnih fenolov s spektrofotometrom (Foto: Rok Jež, 2012) .....</i>	20
<i>Slika 10: Primer HPLC-UV/VIS kromatograma ekstrakta grozdnih kožic sorte 'Cabernet Sauvignon' pri 520 nm z identifikacijo posameznih antocianov.....</i>	22
<i>Slika 11: Primer HPLC-UV/VIS kromatograma ekstrakta grozdnih kožic sorte 'Cabernet Sauvignon' pri 360 nm z identifikacijo posameznih flavonolov oz. njihovih derivatov.....</i>	22
<i>Slika 12: Prikaz koncentracije suhe snovi (°Brix) v grozdju ob trgatvi pri: kontrolnem obravnavanju (K); obravnavanju, tretiranim s plinskim ozonom nižje koncentracije (O3n); obravnavanju, tretiranim s plinskim ozonom višje koncentracije (O3V); obravnavanju, tretiranim daljši čas z nižjo intenziteto sevanja UVB-svetlobe (UV Dn); ter pri obravnavanju, tretiranim krajši čas z višjo intenziteto sevanja UVB-svetlobe (UV kV). Na stolpcih so prikazani standardni odkloni meritev.....</i>	23
<i>Slika 13: Poškodbe listov, tretiranih z višjo intenziteto sevanja UVB (tretiranje UV kV) .....</i>	24
<i>Slika 14: Prikaz koncentracije skupnih titracijskih kislin (g/L) v grozdju ob trgatvi pri kontrolnem obravnavanju (K); obravnavanju, tretiranim s plinskim ozonom nižje koncentracije (O3n); obravnavanju, tretiranim s plinskim ozonom višje koncentracije (O3V); obravnavanju, tretiranim daljši čas z nižjo intenziteto sevanja UVB-svetlobe (UV Dn); ter pri obravnavanju, tretiranim krajši čas z višjo intenziteto sevanja UVB-svetlobe (UV kV). Na stolpcih so prikazani standardni odkloni meritev.....</i>	25
<i>Slika 15: Vrednost pH v grozdnem soku ob trgatvi pri: kontrolnem obravnavanju (K); obravnavanju, tretiranim s plinskim ozonom nižje koncentracije (O3n); obravnavanju,</i>	



tretiranim s plinskim ozonom višje koncentracije (O3V); obravnavanju, tretiranim daljši čas z nižjo intenziteto sevanja UVB-svetlobe (UV Dn); ter pri obravnavanju, tretiranim krajši čas z višjo intenziteto sevanja UVB-svetlobe (UV kV). Na stolpcih so prikazani standardni odkloni meritev..... 26

Slika 16: Povprečna masa 100 jagod v grozdju ob trgatvi pri kontrolnem obravnavanju (K); obravnavanju, tretiranim s plinskim ozonom nižje koncentracije (O3n); obravnavanju, tretiranim s plinskim ozonom višje koncentracije (O3V); obravnavanju, obsevanim daljši čas z nižjo intenziteto sevanja UVB-svetlobe (UV Dn); ter pri obravnavanju, tretiranim krajši čas z višjo intenziteto sevanja UVB-svetlobe (UV kV). Na stolpcih so prikazani standardni odkloni meritev..... 27

Slika 17: Vrednosti absorbance po metodi skupnih fenolov (AU) v ekstraktih jagodnih kožic ob trgatvi pri kontrolnem obravnavanju (K); obravnavanju, tretiranim s plinskim ozonom nižje koncentracije (O3n); obravnavanju, tretiranim s plinskim ozonom višje koncentracije (O3V); obravnavanju, tretiranim daljši čas z nižjo intenziteto sevanja UVB-svetlobe (UV Dn); ter pri obravnavanju, tretiranim krajši čas z višjo intenziteto sevanja UVB-svetlobe (UV kV). Na stolpcih so prikazani standardni odkloni meritev. 28

Slika 18: Prikaz koncentracije skupnih flavonolov (mg/kg) v grozdju ob trgatvi pri kontrolnem obravnavanju (K); obravnavanju, tretiranim s plinskim ozonom nižje koncentracije (O3n); obravnavanju, tretiranim s plinskim ozonom višje koncentracije (O3V); obravnavanju, tretiranim daljši čas z nižjo intenziteto sevanja UVB-svetlobe (UV Dn); ter pri obravnavanju, tretiranim krajši čas z višjo intenziteto sevanja UVB-svetlobe (UV kV). Na stolpcih so prikazani standardni odkloni meritev..... 29

Slika 19: Prikaz koncentracije skupnih flavonolov ( $\mu\text{g}/\text{jagodo}$ ) v grozdju ob trgatvi pri kontrolnem obravnavanju (K); obravnavanju, tretiranim s plinskim ozonom nižje koncentracije (O3n); obravnavanju, tretiranim s plinskim ozonom višje koncentracije (O3V); obravnavanju, tretiranim daljši čas z nižjo intenziteto sevanja UVB-svetlobe (UV Dn); ter pri obravnavanju, tretiranim krajši čas z višjo intenziteto sevanja UVB-svetlobe (UV kV). Na stolpcih so prikazani standardni odkloni meritev..... 30

Slika 20: Prikaz koncentracije skupnih antocianov (mg/kg) v grozdju ob trgatvi pri kontrolnem obravnavanju (K); obravnavanju, tretiranim s plinskim ozonom nižje koncentracije (O3n); obravnavanju, tretiranim s plinskim ozonom višje koncentracije (O3V); obravnavanju, tretiranim daljši čas z nižjo intenziteto sevanja UVB-svetlobe (UV Dn); ter pri obravnavanju, tretiranim krajši čas z višjo intenziteto sevanja UVB-svetlobe (UV kV). Na stolpcih so prikazani standardni odkloni meritev..... 32

Slika 21: Koncentracija skupnih antocianov ( $\mu\text{g}/\text{jagodo}$ ) v grozdju ob trgatvi pri kontrolnem obravnavanju (K); obravnavanju, tretiranim s plinskim ozonom nižje koncentracije (O3n); obravnavanju, tretiranim s plinskim ozonom višje koncentracije (O3V); obravnavanju, tretiranim daljši čas z nižjo intenziteto sevanja UVB-svetlobe (UV Dn); ter pri obravnavanju, tretiranim krajši čas z višjo intenziteto sevanja UVB-svetlobe (UV kV). Na stolpcih so prikazani standardni odkloni meritev..... 33

## OKRAJŠAVE

UV-sevanje = ultravijolično sevanje

UVB-sevanje = ultravijolično sevanje B (valovna dolžina 280–320 nm)

HPLC = angl. high performance liquid chromatography (tekočinska kromatografija visoke ločljivosti)

PMK = povprečna mesečna koncentracija ozona v zraku

MAX = najvišja koncentracija ozona

> OV = število primerov s preseženo opozorilno vrednostjo

> AV = število primerov s preseženo alarmno vrednostjo

AOT40 = parameter za zaščito rastlin

> CV = število dni s preseženo ciljno vrednostjo

O3V = oznaka tretiranja s plinskim ozonom\_visoka koncentracija

O3n = oznaka tretiranja s plinskim ozonom\_nizka koncentracija

UV Dn = oznaka tretiranja z UVB\_daljši čas\_nizka intenziteta

UV kV = oznaka tretiranja z UVB\_krajši čas\_visoka intenziteta

K = kontrola

SA = skupni antociani

SF = skupni flavonoli

SP = skupni (poli)fenoli

BBCH = skala razvojnih faz vinske trte

BBCH 83 = obdobje napredujočega barvanja jagod (= faza veraison)

T = temperatura

## **SIMBOLI**

$O_3$  = ozon



# 1 UVOD

## 1.1 Povod za delo

Posebno v grozdih rdečih vinskih sort so fenoli izredno pomembne spojine. Moštu in pozneje vinu prispevajo barvo, okus in odločilno vplivajo na stabilizacijo in zorenje. Njihova prisotnost močno vpliva na samo kakovost vina (Downey in sod., 2006). Vsebnost fenolnih snovi v grozdju je odvisna predvsem od sorte, rastnih razmer, ampelotehničnih del v vinogradu in postopkov vinifikacije. Najštevilčnejše so zastopani flavonoidi, ki jih najdemo pretežno v kožici in pečkah grozdne jagode. V grozdju prevladujejo tri vrste flavonoidov, in sicer antociani, flavonoli in flavan-3-oli. Zlasti akumuliranje flavonolov je v veliki meri odvisno od tega, v kolikšni meri so bili grozdi izpostavljeni svetlobi (Price in sod., 1995; Downey in sod., 2004). Za antociane pa Haselgrove s sodelavci (2000) poroča, da se njihov metabolizem odziva tako na spremembe v temperaturi kot tudi na spremembe v osvetljenosti. Na primeru sorte 'Malbec' je Berli s sodelavci (2008) zaznal, da so se antociani oziroma njihova sinteza najbolj odzivali na povišano UVB-sevanje. Zlasti flavonoli pa naj bi imeli pomembno funkcijo pri zaščiti rastlin pred UVB-sevanjem.

Znano je, da se UVB-sevanje na Zemlji povečuje zaradi problema večanja t. i. ozonske luknje, kar vpliva na delovanje živih organizmov. Na delovanje organizmov vpliva tudi povišana koncentracija ozona, ki ima med drugim potrjeno škodljiv vpliv na kmetijske pridelke in zdravje ljudi. Visoke koncentracije ozona so največkrat povezane z vročim in sončnim podnebjem ter se pojavljajo na vedno večjih kmetijskih področjih.

Poznavanje odziva vinske trte na izpostavljenost večjim koncentracijam ozona v ozračju in povečanemu UVB-sevanju so nujne tako za oceno tveganja oziroma določitev kritične koncentracije kot tudi za iskanje morebitnih rešitev, če bi prišlo do prevelikih vplivov na kakovost grozdja in s tem posledično tudi na zdravje potrošnika.

## 1.2 Delovna hipoteza

V diplomski nalogi smo raziskovali odzivanje vinske trte sorte 'Cabernet Sauvignon' na izpostavljenost večjim koncentracijam ozona v ozračju in povečanemu UVB-sevanju, saj se vse bolj zavedamo problema zmanjševanja koncentracije stratosferskega ozona in s tem vedno močnejšega UV-sevanja, manj pa poznamo posledice le-tega za kakovost grozdja in vina. V našem poskusu smo tako opazovali reakcijo vinske trte na umetno sprožen abiotski stres (povzročen s tretiranjem z  $O_3(g)$  in UVB-svetlobo), in sicer v njenem naravnem okolju (vinograd). Glavni cilj diplomske naloge je bilo oceniti, kako vplivata povečana UVB-osvetljenost trt in povečana koncentracija plinskega ozona na osnovne kakovostne parametre in vsebnost fenolnih spojin v grozdju sorte 'Cabernet Sauvignon'.

Na podlagi zbrane strokovne in znanstvene literature smo izoblikovali naslednje hipoteze:

1. Povečana izpostavljenost UVB-sevanju bo povzročila določene spremembe v sintezi nekaterih primarnih in/ali sekundarnih (zaščitnih) metabolitov.
2. Povečana izpostavljenost ozonu bo povzročila določene spremembe v sintezi nekaterih primarnih in/ali sekundarnih metabolitov.
3. Zaradi abiotskega stresa se lahko zmanjša količina pridelka na obravnavanjih, tretiranih z ozonom in UVB-svetlobo.

## 2 TEORETIČNE OSNOVE

### 2.1 Sorta 'Cabernet Sauvignon'

'Cabernet Sauvignon' (*Vitis vinifera* L.) je rdeča sorta vinske trte, križanec sort 'Cabernet franc' in 'Sauvignon'. Izvira iz področja Bordeaux v Franciji, raste pa v vseh vinorodnih deželah zmerne klime in je ena izmed svetovno najbolj razširjenih rdečih vinskih sort. V Sloveniji raste povsod, največ pa jo gojimo na Primorskem (Hrček in Korošec - Koruza, 1996). V letu 2010 je delež trsov sorte 'Cabernet Sauvignon' znašal 2,86 odstotka vseh posajenih trsov v Sloveniji (Rusjan in sod., 2012). Hrček in Korošec - Koruza (1996) jo glede na ekološko-geografski vidik porekla uvrščata v zahodnoevropsko ekološko skupino (*Proles occidentalis*). Vinifikacija grozdja te sorte je precej zahtevna, daje pa odlična sortna in zvrstna vina z intenzivno barvo, specifično sortno aromo in dokaj visoko vsebnostjo alkohola. Zato ta sorta počasi zori in se stara ter šele pri svojem vrhuncu, med 3. in 10. letom, doseže izjemno kakovost (Hrček in Korošec - Koruza, 1996).

#### 2.1.1 BOTANIČNI OPIS<sup>1</sup>

Trta sorte 'Cabernet Sauvignon' požene mladike z belkasto rdečimi in volneno obraslimi vršički. Listi so zelo značilni, srednje veliki, okroglaste oblike, praviloma pet- do sedemdelni. Po površini so valovito nabrani in imajo globoke stranske zgornje sinuse z okroglastimi odprtini. Na zgornji strani so temnejše zelene barve, spodnja stran deluje pajčevinasta. Pecelj je kratek in praviloma rdečkaste barve.

Grozd je zbit, majhen in cilindričen, včasih s krilcem. Pecelj je srednje dolg in srednje debel, grozdne jagode pa so drobne z dokaj debelo kožico in pravilno okrogle oblike. Rozga je srednje debela, trda, s srednje dolgimi internodiji.

---

<sup>1</sup> Povzeto po Hrček in Korošec - Koruza (1996) in Cindrič s sod. (1994).



*Slika 1: 'Cabernet Sauvignon' (Hrček in Korošec - Koruza, 1996, str. 109)*

### **2.1.2 AGROBIOTIČNE ZNAČILNOSTI**

Sorta 'Cabernet Sauvignon' ima dokaj bujno rast. Uvrščamo jo med poznejše sorte. Grozd tehta od 50 do 90 gramov (60–70 g po Cindrić in sod., 1994). Sorta ne obrodi obilno, pridelek je sorazmerno nizek, če pa jo preobremenimo, kakovost pridelka pada.

Sorta je občutljiva za oidij, odpornejša pa na peronosporo in sivo plesen kot tudi na nizke temperature (pozeba). Kuljaj (2005) navaja, da je ta sorta odporna tudi na sušo in je za tla od vseh najplemenitejših sort še najmanj zahtevna.



## **2.2 Kemijska sestava grozdja**

### **2.2.1 PRIMARNI METABOLITI**

Primarni metaboliti so prisotni v vseh rastlinskih vrstah. Neposredno so vpleteni v osnovne življenjske procese rastline, saj sodelujejo pri rasti, razvoju, razmnoževanju, fotosintezi in tudi pri dihanju (Ali in sod., 2010; Croteau in sod., 2000).

Največji delež primarnih metabolitov v grozdni jagodi imajo sladkorji (17–25 %), sledi delež organskih kislin (0,4–1,2 %), aminokislin (0,3–0,6 %) in mineralov (0,01 %). Preostali delež predstavlja voda, in sicer kar 75–85 % (Winkler in sod., 1974; Margalit, 2004).

#### **2.2.1.1 Sladkorji**

V grozdu prevladujeta monosaharida glukoza in fruktoza. Razmerje med njima se spreminja glede na dozorevanje. Ob začetku dozorevanja prevladuje glukoza (le četrtna je fruktoze), v polni zrelosti je razmerje praviloma 1 : 1, po polni (tehnološki) zrelosti pa se začne razmerje spreminjati v korist fruktoze (Bavčar, 2006; Margalit, 2004).

#### **2.2.1.2 Organske kisline**

Najbolj zastopane kisline v grozdu so vinska, jabolčna in citronska kislina. Glavni kislini v grozdu in moštu sta vinska in jabolčna (Margalit, 2004). Skupaj predstavljata od 70 do 90 odstotkov vseh prisotnih organskih kislin. V začetni fazi dozorevanja se vinska kislina akumulira v kožici jagode in v mesu takoj pod njo. Z dozorevanjem njena koncentracija praviloma ne pada, odvisna pa je od sorte in končnega volumna grozdne jagode ob trgatvi (Bavčar, 2006).

Jabolčna kislina se nahaja predvsem v mesu blizu pečk. Njena koncentracija se z dozorevanjem grozdja niža, saj zamenja fruktozo kot substrat v zadnjih fazah zorenja. Padec jabolčne kisline je odvisen tudi od visokih temperatur, saj njena koncentracija pada ob višjih temperaturah (toplejša vinorodna področja oz. toplejši letniki) (Bavčar, 2006).

Citronsko kislino v grozdju najdemo v koncentracijah od 150 do 300 mg/L, le v redkih primerih njena koncentracija presega 700 mg/L. V primerih, ko je koncentracija te kisline v vinu večja od 800 mg/L, je bila najverjetneje dodana (Margalit, 2004).

## **2.2.2 SEKUNDARNI METABOLITI**

Sekundarni metaboliti so spojine, ki niso nujne za rast rastlin in vzdrževanje celičnih funkcij, ampak se v glavnem sintetizirajo za zaščito pred mikroorganizmi med stacionarno fazo rastnega cikla (Croteau in sod., 2000; Passamonti in sod., 2009; Ali in sod., 2010).

Čeprav jih načeloma smatramo kot spojine, ki niso vključene v življenjsko pomembne funkcije celice, so sekundarni metaboliti za rastlino pomembni, saj sodelujejo pri procesih zaščite rastline ob različnih stresih (biotskih in abiotskih) (Ali in sod., 2010; Eliašová in sod., 2004). Ali s sod. (2010) ter Passamontijeva s sod. (2009) zatrjujejo, da sekundarni metaboliti sodelujejo tudi v procesih zaščite človeškega organizma pred različnimi stresi (boleznimi), kar je tudi temelj zanimanja za njihovo nadaljnje raziskovanje.

Najpomembnejša skupina sekundarnih metabolitov v grozdju in vinu so fenoli.

### **2.2.2.1 Fenoli**

Ob sladkorjih in kislinah so fenoli najbolj zastopana sestavina v grozdju. Količina skupnih fenolov v grozdju je odvisna predvsem od sorte (in klona), klime in okolja ter ampelotehničnih del. Okrog 65 % skupnih fenolov se nahaja v pečkah, 30 % v jagodni kožici in od 4 do 5 % v mesu (Margalit, 2004).

Fenolne spojine so pomembne, saj dajejo grozdju oz. vinu barvo, vplivajo na okus in so osnova za staranje vin. Obenem delujejo kot antioksidanti in naravni konzervansi ter izkazujejo antimikrobno delovanje (posledično nižja potreba po žveplu) (Bavčar, 2006; Ali in sod., 2010).

Kemijsko so fenoli ciklične benzenske spojine z eno ali več hidroksilnimi skupinami, delimo pa jih v grobem na dve skupini:

- Neflavonoide – njihov osnovni skelet vsebuje polihidroksibenzojsko skupino (C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>) ali cimetovo skupino (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>),
- Flavonoide – njihovo osnovno strukturo opredeljuje flavonoidna skupina (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>).

Polihidroksibenzenova skupina (C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>) označuje sistem fenolnega obroča šestih aromatičnih ogljikov plus en ogljik. Enak pomen in zapis velja za ostali dve skupini. Cimetna skupina (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>) predstavlja aromatični obroč in verigo treh ogljikov ter flavonoidna skupina (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>), kjer sta dva aromatična obroča povezana z verigo treh ogljikov (Margalit, 2004).

V naši raziskavi smo se osredotočili na skupino flavonoidov, zato bo v nadaljevanju podrobneje predstavljena.

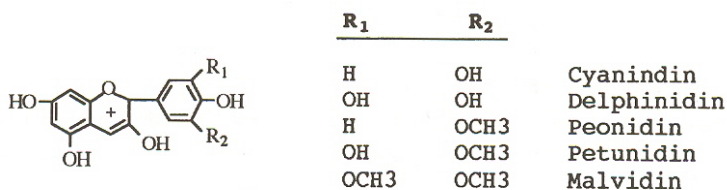
#### 2.2.2.1.1 Flavonoidi

Flavonoidi so tipična spojina rdečih vin, saj zavzamejo kar 85 odstotkov vseh prisotnih fenolov. Najdemo jih tudi v belih vinih, vendar predstavljajo le 20-odstotni delež (Bavčar, 2006).

Najbolj pogosti flavonoidi so: antociani, flavonoli in flavan-3-oli oziroma flavanoli (katehin, epikatehin in procianidini). Lahko jih najdemo v prosti obliki ali pa so vezani na druge flavonoide, neflavonoide ali sladkorje (Bavčar, 2006).

V naši raziskavi smo se osredotočili na fenolne spojine, ki so prisotne v jagodni kožici; to pa so predvsem antociani in flavonoli.

Barvo rdečim vinom pogojujejo pigmenti – **antociani**, ki se nahajajo v kožici grozdne jagode. V njih se nahajajo praviloma kot monoglukozidi, to pomeni, da sta med seboj povezana fenolna spojina antocianidina in ena molekula glukoze (Bavčar, 2006).



**Slika 2: Antocianidinski skelet glavnih antocianov v grozdju (Margalit, 2004, str. 45)**

Biosinteza antocianov se začne ob začetku zorenja (veraison). Na začetku se sintetizirajo samo cianidin in peonidin, ki jim sledijo še delfinidin, petunidin in malvidin (Downey in sod., 2005).

Downey in sod. (2005) navajajo, da na sintezo antocianov lahko vpliva več dejavnikov, in sicer svetloba, temperatura, nadmorska višina, struktura in tekstura zemlje, razpoložljivost z vodo, dostopnost hranil, sorta, ampelotehnična dela v vinogradu itd. Isti avtorji poudarjajo, da povečano UVB-sevanje povzroča povečano sintezo antocianov in drugih fenolov v grozdju.

Sinteza flavonolov se praviloma opazno poveča v dveh fazah dozorevanja grozdja: prvič v času cvetenja vinske trte, drugič pa v času povečane sinteze antocianov (faza veraison ali faza obarvanja grozdnih jagod) (Downey in sod., 2003). Akumuliranje flavonolov je v veliki meri odvisno od klimatskih pogojev – predvsem pa od tega, v kolikšni meri so bili grozdi izpostavljeni svetlobi (Price in sod., 1995; Downey in sod., 2004).

## **2.3 UV-sevanje**

Ultravijolično valovanje je elektromagnetno valovanje z valovno dolžino, ki je krajša od valovne dolžine vidne svetlobe. Ultravijolični spekter je glede na valovno dolžino žarkov razdeljen na:

- UVC-skupino, ki zajema kratkovalovne žarke z valovno dolžino 220–280 nm, ki se popolnoma zadržijo že v zgornjem delu ozračja in nas ne dosežejo;
- UVB-skupino, ki zajema srednjevalovne žarke z valovno dolžino 280–320 nm, ki se večinoma vpijejo v višjih plasteh ozračja, le manjši del doseže tla. Ta del žarkov nam je najbolj nevaren;
- UVA-skupino, ki zajema dolgovalovne žarke z valovno dolžino 320–400 nm, ozonska plast jih ne zadrži, zato v celoti prodrejo do tal (Mpoloka, 2008).

V nadaljevanju sledi podrobnejša obravnava UVB-sevanja, saj je poznavanje njegovih lastnosti najpomembnejše za razumevanje rezultatov našega terenskega poskusa.

### 2.3.1 UVB-SEVANJE

UVB-sevanje se v večini absorbira v stratosferskemu ozonu in atmosferskih plinih. Majhna količina doseže Zemljino površje. UVB-sevanje je za rastline potencialno škodljivo, saj lahko poškoduje njihov DNK in negativno vpliva na različne fiziološke procese. Poročajo pa tudi o učinku na produktivnost rastlin (zmanjšanje biomase) (Cuadra in sod., 2004). Stopnja škodljivosti je odvisna od vrste rastline in dnevne koncentracije sevanja. Za zaščito pred UVB-sevanjem so za rastlino zelo pomembni flavonoidi, saj rastlino ščitijo pred omenjenimi poškodbami (Berli in sod., 2008; Andersen in Markham, 2006). Ko so rastline izpostavljene UVB sevanju, se koncentracije flavonoidov povečajo, zaradi česar velja prepričanje, da imajo rastline sposobnost sprožiti fitokemijske obrambne mehanizme za zaščito pred škodljivimi sevanji (Cuadra in sod., 2004). V skladu s poročanji lahko površinski flavonoidi absorbirajo UVB oziroma zmanjšajo njihovo epidermalno penetracijo in tako zaščitijo občutljivejša rastlinska tkiva v notranjosti pred poškodbami, ne da pri tem vplivali na fotosintetsko aktivnost same rastline (Samantha in sod., 2011). Kvercetin je eden najbolj pogostih flavonoidov v naravi. Ta flavonol je močan antioksidant in kelator kovinskih ionov, zaradi česar naj bi bil zmožen določene zaščite pred UV-sevanji (Svoboda in sod., 2004). Antociani imajo dva maksimuma absorpcije, enega med 270 in 290 nm in drugega med 500 in 550 nm. V kombinaciji z organskimi kislinami se njihova absorbtivnost še poveča ob dodatnem absorpcijskem maksimumu 310-320 nm (Woodal in Stewart, 1998). Ta njihova močna absorpcijska sposobnost in ugotovitve, da se njihova koncentracija v primeru povečanega sevanja UVB poveča, sta pripeljali do hipotez, da imajo antociani med drugim tudi funkcijo zaščite rastline pred tovrstnimi stresi (Anderson in Markham, 2006).

Povečano UVB-sevanje pomeni za rastlino abiotski stres, zato lahko pričakujemo, da bodo nekatere rastline, ki jih v kmetijstvu uporabljamo za pridelavo, reagirale z nepričakovano kakovostjo in nižjimi pridelki ter ostalimi nezaželenimi učinki stresa (Mpoloka, 2008).

## 2.4 Ozon

Ozon ( $O_3$ ) je visoko reaktiven plin, ki ga sestavljajo trije atomi kisika. Je močan oksidant in pomemben sekundarni onesnaževalec zraka. Razporeditev ozona po višini ni enakomerna. Največ ozona je v stratosferi, približno 90 %. Ta ozon imenujemo stratosferski ozon in je posledica naravnega procesa tvorbe ozona. V stratosferi je ozonska plast, ki se razširja do višine 50 km, največ ozona pa je na višinah med 18 in 25 km. Stratosferski ozon predstavlja naravni ščit, saj nas ščiti pred nevarnim UV-sevanjem. V drugi polovici 19. stoletja je industrija začela proizvajati snovi, ki škodujejo ozonski plasti v stratosferi. Posledica pomanjkanja ozona v stratosferi pa je povečano UV-sevanje pri tleh (Planinšek, 2008; Ashmore, 2005).

Za nastajanje »škodljivega« ozona pri tleh (t. i. troposferski ozon) pa so krive emisije onesnaževal, ki so posledica človekove dejavnosti. Nastanek troposferskega ozona je posledica zapletenih fotokemijskih reakcij med predhodniki ozona ob pomoči sončne svetlobe (Planinšek, 2008).

Koncentracije ozona pri tleh imajo v Sloveniji zelo značilen letni in dnevni potek. Emisije predhodnikov se sicer ne spreminjajo veliko, pogoji za nastanek ozona pa so najugodnejši od maja do konca julija. Koncentracije ozona so močno odvisne tudi od vremena. Najvišje koncentracije se pojavljajo na Primorskem, predvsem ob situacijah, ko piha veter z južne oz. jugozahodne smeri. To kaže na prenos ozona prek meje iz Italije. Raven onesnaženosti zraka z ozonom je v zadnjih letih na večini merilnih mest Agencije Republike Slovenije za okolje (v nadaljevanju ARSO), tudi na podeželju in v višjih legah, nad ciljno in dolgoročno naravnano vrednostjo, marsikje pa je presežena tudi opozorilna vrednost (ARSO, 2012).

Glede vpliva na zdravje ljudi sta najpomembnejša dejavnika raven koncentracije ozona in trajanje izpostavljenosti. Številne epidemiološke študije kažejo povezavo med učinki na zdravje in izpostavljenosti organizma ozonu. Ozon je seveda škodljiv tudi za živali in rastline. Rastline so različno odporne na visoke koncentracije ozona. Visoke koncentracije ozona lahko vplivajo na manjši prirast biomase, lahko pa pride tudi do poškodb rastline, kar pa pomeni gospodarsko škodo (Planinšek, 2008).

Uredba o ozonu v zunanjem zraku (Ur.l. RS, št. 8/03) predpisuje za zaščito zdravja opozorilno in alarmno urno koncentracijo ter ciljno vrednost najvišje 8-urne dnevne

koncentracije, za varstvo rastlin in gozdov sta določeni mejni vrednosti faktorja AOT40 za čas vegetacije, od maja do julija oz. od aprila do septembra, za zaščito materialov pa je določena mejna letna vrednost. AOT40 je parameter, ki se izraža v  $\mu\text{g}/\text{m}^3 \cdot \text{h}$  in se za določeno obdobje izračuna kot vsota razlike med urno koncentracijo in vrednostjo  $80 \mu\text{g}/\text{m}^3$  urnih koncentracij, ki presegajo  $80 \mu\text{g}/\text{m}^3$  in so izmerjene med 8. in 20. uro.

Za varstvo rastlin je torej predpisana vrednost AOT40 (izračunana iz urnih vrednosti), ki v obdobju maj–julij ne sme preseči  $18.000 \mu\text{g}/\text{m}^3 \cdot \text{h}$  v povprečju petih let. Pri tem za vegetacijo v obdobju maj–julij ne sme biti presežena vrednost AOT40  $6.000 \mu\text{g}/\text{m}^3 \cdot \text{h}$ , za gozdove v obdobju april–september pa vrednost AOT40  $20.000 \mu\text{g}/\text{m}^3 \cdot \text{h}$  (Uredba o ozonu v zunanjem zraku, 2003).

#### 2.4.1 ONESNAŽENOST ZRAKA Z OZONOM

V nadaljevanju bo podan pregled stanja onesnaženosti zraka z ozonom v Vipavski dolini oz. na Goriškem. Podatki o ozonu so merjeni na avtomatski merilni postaji v Novi Gorici in v celoti pridobljeni s spletne strani ARSO.

**Tabela 1: Zbirna tabela osnovnih parametrov meritev vsebnosti ozona za merilno mesto Nova Gorica od leta 2002 do 2010 (PMK – povprečna mesečna koncentracija, MAX – najvišja koncentracija, >OV – število primerov s preseženo opozorilno vrednostjo, >AV – število preseženih alarmnih vrednosti, AOT40 – parameter za zaščito rastlin, >CV – število dni s preseženo ciljno vrednostjo)**

Merilno mesto Nova Gorica	LETO	1 ura				8 ur	
	PMK ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )	MAX ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )	>OV	>AV	AOT40 ( $\mu\text{g}/\text{m}^3 \cdot \text{ure}$ )	MAX ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )	>120 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ >CV
2002	45	219	26	0	-	209	36
2003	58	244	102	1	77134	221	105
2004	47	210	27	0	40977	198	46
2005	48	200	33	0	42893	191	43
2006	50	228	34	0	50702	205	55
2007	47	210	19	0	44426	186	51
2008	43	172	0	0	28941	155	25
2009	44	167	0	0	32345	153	33
2010	46	179	0	0	39050	162	43

Iz tabele lahko razberemo, da je bila povprečna mesečna koncentracija ozona v obdobju 2002–2010 največja v letu 2003. Po tem letu se je stanje izboljševalo. Nov porast zasledimo v letu 2006. V ostalem obdobju je bilo stanje zmerno. Opazimo lahko, da je bila v vseh letih prekoračena mejna vrednost faktorja AOT40 za zaščito vegetacije in gozdov.



### **3 EKSPERIMENTALNI DEL**

#### **3.1 Materiali**

##### **3.1.1 RASTLINSKI MATERIAL**

Kot rastlinski material v našem poskusu smo uporabili trte in grozdje sorte 'Cabernet Sauvignon' letnika 2010.

##### **3.1.2 POSKUSNI VINOGRAD**

Poskusni vinograd smo izbrali v vasi Vrhpolje v Vipavski dolini. Vinograd leži na nadmorski višini 109 metrov. Trte sorte 'Cabernet Sauvignon' (klon 337, podlaga SO<sub>4</sub>) so bile zasajene leta 2002 na površini 0,22 ha (skupna površina vinograda znaša 0,7 ha). Skupno število trsov v vinogradu je 1450, gojeni so v obliki enojni guyot, razdalja zasaditve med vrstami znaša 1,8 metra, med trsi pa 0,8 metra. Vinograd ima ravninsko lego in je vključen v integrirano pridelavo. Vrste v vinogradu so orientirane od vzhoda proti zahodu.



*Slika 3: Poskusni vinograd sorte 'Cabernet Sauvignon' v Vrhpolju, Vipavska dolina (Foto: Melita Sternad Lemut, 2010)*

### 3.1.3 ZASNOVA POSKUSA

V okviru poskusa smo obravnavali 15 naključno izbranih zdravih in normalno razvitih trt znotraj izbranih treh vrst v sredini poskusnega vinograda (ob izločitvi trt v začetku in koncu vrste).

Z vsemi tretiranci smo pričeli v času začetka barvanja jagod, to je v fenološki fazi veraison (BBCH 83), in sicer smo:

I. (2 x) 3 trte tretirali z UVB-žarnico 4 ure/dan:

a) 3 trte: 5 dni z  $\approx 100\%$  povečano intenziteto glede na dejansko izmerjeno ob 11h dan pred poskusom\* (= **kratak čas / višja intenziteta sevanja (UV kV)**); (dejansko izmerjena intenziteta v območju grozdja 5 enot\*; po postavitvi žarnice 9,9 enot\* (v povprečju treh meritev)).

b) 3 trte: 21 dni z  $\approx 20\%$  povečano intenziteto glede na dejansko izmerjeno ob 11h dan pred poskusom\* (= **dolg čas / nižja intenziteta sevanja (UV Dn)**); (po postavitvi žarnice 5,9 enot\* (v povprečju treh meritev)).

*\* (Meritve so bile izvedene s pomočjo detektorja v lastni izdelavi, umerjenega s standardiziranim Atlasovim UV-merilcem (Atlas, ZDA), in sicer na naslednji način: 25,0 enot na našem UV-detektorju je enako  $20,5 \text{ W/m}^2$  na Atlasovem detektorju, torej je 1,0 enota na našem detektorju sorazmerna z  $0,82 \text{ W/m}^2$  na Atlasovem.*

Za tretiranje smo uporabili komercialno dostopno UVB-žarnico Sankyo Denki G15T8E (Japonska).

II: Nadaljne (2 x) 3 trte smo tretirali 4 ure/dan (od 11<sup>h</sup> do 15<sup>h</sup> ob pomoči avtomatskega časovnika) s plinskim ozonom, in sicer:

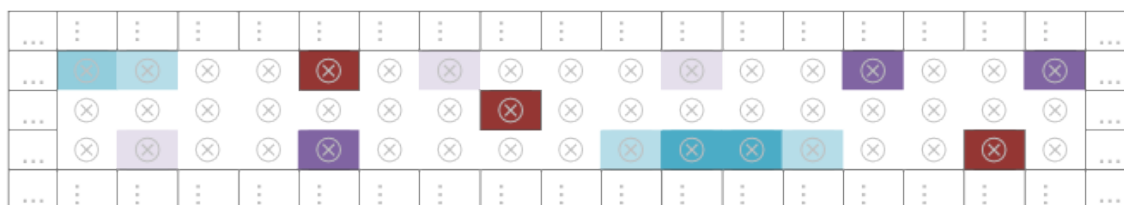
a) 3 trte: 5 dni s koncentracijo 100 mg/h\*\* (= **O<sub>3</sub> nižja koncentracija (O3 n)**)

b) 3 trte: 5 dni s koncentracijo 200 mg/h\*\* (= **O<sub>3</sub> višja koncentracija (O3 V)**)

**\*\*** Za ozoniranje v predelu grozdov smo uporabili Generator ozona OZX-300AT (Enaly, Kitajska), metoda proizvodnje ozona: corona (ozonska cev); vir za proizvodnjo O<sub>3</sub>: zunanji zrak

III: Zadnje tri naključno izbrane trte smo pustili netretirane ter jih uporabili kot kontrolo.

Vse trte so bile ampelografsko enako tretirane in v skladu z vsakoletno prakso vinogradnika – lastnika. Shema položaja izbranih in označenih trt za obravnavo je razvidna na Sliki 4.



Legenda:

⊗		vinska trta
⊗	UV V <sub>k</sub>	TRETIRANJE Z UVB / ↑ intenziteta in ↓ čas
⊗	UV nD	TRETIRANJE Z UVB / ↓ intenziteta ↑ čas
⊗	O <sub>3</sub> V	TRETIRANJE Z O <sub>3</sub> / ↑ koncentracija in ↓ čas
⊗	O <sub>3</sub> n	TRETIRANJE Z O <sub>3</sub> / ↓ koncentracija in ↑ čas
⊗	kontrola	NETRETIRANE TRTE

**Slika 4: Eksperimentalna shema terenskega poskusa**



**Slika 5: Trsi, obsevani z UVB-svetlobo (Foto: Melita Sternad Lemut, 2010)**



*Slika 6: Tretiranje izbranih trsov s plinskim ozonom (Foto: Melita Sternad Lemut, 2010)*

### **3.1.4 VZORČENJE**

Ob trgatvi smo ločeno pobrali grozde vseh obravnavanih trt ter jih zamrznili ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) do analitske obravnave.

## **3.2 Metode**

### **3.2.1 PRIPRAVA VZORCEV**

#### **3.2.1.1 Priprava grozdnih jagod/grozdnega soka za merjenje osnovnih kakovostnih parametrov grozdja**

Grozde smo razpecljali, stehtali maso 100 jagod, 200 naključno izbranim jagodam pa stisnili sok, ga precedili skozi cedilo (da smo odstranili večje trdne delce) in ga

uporabili za določitev osnovnih kakovostnih parametrov grozdja (vsebnost skupnih titracijskih kislin, pH-vrednost mošta in sladkorno stopnjo).

### **3.2.1.2 Ekstrakcija fenolnih komponent iz kožic grozdnih jagod**

Za določitev opazovanih fenolnih spojin (antocianov, flavonolov) smo jagode olupili (opazovani fenoli se nahajajo v jagodni kožici) ter iz njih pripravili metanolne ekstrakte v skladu z objavljeno metodo (Mattivi s sod., 2006).

Najprej je bilo potrebno jagode oddeliti od peclja, stehtati (KERN ABJ 120-4M) 3 x po 20 zamrznjenih grozdnih jagod za vsako obravnavanje ter jih nato hitro (še ohlajene) olupiti. Fenole iz kožic smo nato izlužili s pomočjo metanola: v 100 mL metanola (Sigma, Nemčija) smo kožice ekstrahirali 24 ur. Raztopino prve ekstrakcije smo odtočili v pripravljene in označene temne stekleničke ter kožicam dodali novih 50 mL metanola in jih izluževali še nadaljnji 2 uri. Raztopini obeh ekstraktov smo nato združili v temnih steklenih posodah in jih shranili pri  $-20^{\circ}\text{C}$  vse do izvedbe analiz (Mattivi s sod., 2006).

### **3.2.1.3 Priprava vzorcev za HPLC analize**

Pripravljene metanolne ekstrakte jagodnih kožic smo pred tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (ali HPLC analiza) antocianov razredčili z 1 % trifloroacetno kislino v vodi (v razmerju 1 : 9/V : V) (da smo boljše ohranili simetrijo kromatografskih vrhov) ter jih pred injiciranjem prefiltrirali skozi 0,45  $\mu\text{m}$  filter, kot je opisano v Sternad Lemut in sod. (2011). Tako pripravljene vzorce smo analizirali s pomočjo HPLC-UV/VIS tehnike pri pogojih, kot jih prikazuje Tabela 1.

## **3.2.2 ANALITSKI POSTOPKI**

### **3.2.2.1 Analiza osnovnih kakovostnih parametrov v grozdnem soku**

Skupne sladkorje oz. koncentracijo suhe snovi smo analizirali s pomočjo digitalnega refraktometra (ATAGO WM-7). Za odčitek sladkorjev v vzorcih grozdnega soka smo uporabili skalo v  $^{\circ}\text{Brix}$ . Uporabljeni refraktometer samodejno upošteva korekcijo na temperaturo vzorca.

Koncentracijo titracijskih kislin smo določali z volumetrično metodo ob uporabi končne točke titracije pri pH 7, in sicer s pomočjo avtomatskega titratorja s stekleno elektrodo (Titrino 848 plus, Metrohm; Švica).



***Slika 7: Avtomatski titrator s pH-elektrodo (Titrino 848 plus, Metrohm; Švica) (Foto: Rok Jež, 2012)***

Vrednost pH v soku smo določili s pomočjo avtomatskega titratorja s stekleno elektrodo (Titrino 848 plus, Metrohm; Švica).

Vse analize smo izvajali v treh paralelkah.

### 3.2.2.2 Določanje mase 100 jagod

Od svežih, ločeno pobranih grozdov smo naključno odstranili 3 x po 100 jagod in jih stehitali s pomočjo tehnice KERN ABJ 120-4M.



*Slika 8: Tehnica KERN ABJ 120-4M (Foto: Rok Jež, 2012)*

### 3.2.2.3 Spektrofotometrična analiza skupnih fenolov v grozdnih kožicah

Koncentracijo skupnih fenolov v jagodnih kožicah oz. njihovem ekstraktu smo določili na podlagi redukcije fosfovolframove in fosfomolibdenove kisline (Fiolin-Ciolcalteau reagent) ter oksidacijo fenolov v modre pigmente v alkalni raztopini (Di Stefano in Guidoni, 1989), ob manjši prilagoditvi metode po Waterhouse in sod., 2002. Uporabljen protokol je prilagojen majhnim količinam vzorca. Reakcija je potekala neposredno v 2 mL kivetah. V vsako kiveto smo dodali 1,58 mL destilirane vode, za tem pa 100  $\mu$ L reagenta Fiolin-Ciolcalteu. Sledilo je mešanje. Zaradi časovno omejene reakcije smo najkasneje v osmih minutah v vse kivete dodali 300  $\mu$ L nasičene raztopine natrijevega karbonata, premešali ter pustili 2 uri pri sobni temperaturi. Sledila je spektrofotometrična analiza pri 765 nm (Waterhouse, 2002). Rezultate smo izrazili na enoto absorbance (AU). Vse analize smo izvajali v treh paralelkah.



*Slika 9: Določanje skupnih fenolov s spektrofotometrom (Foto: Rok Jež, 2012)*

#### **3.2.2.4 HPLC analiza antocianov in flavonolov**

Identifikacija posameznih **antocianov** je temeljila na osnovi podatkov iz literature (Sternad Lemut in sod., 2011) ter na osnovi ujemanja z retenzijskimi časi komercialno dostopnih standardov. Potrdili smo naslednje prisotne antociane: delfinidin 3-glukozid (Del-3-Glu), cianidin 3-glukozid (Cy-3-Glu), petunidin 3-glukozid (Pet-3-Glu), peonidin 3-glukozid (Peo-3-Glu), malvidin 3-glukozid (Mal-3-Glu), delfinidin 3-acetilglukozid (Del-3-AcetGlu), cianidin 3-acetilglukozid (Cy-3-AcetGlu), petunidin 3-acetilglukozid (Pet-3-AcetGlu), peonidin 3-acetilglukozid (Peo-3-AcetGlu), malvidin 3-acetilglukozid (Mal-3-AcetGlu), peonidin 3-kumarilglukozid (Peo-3-CoumGlu) in malvidin 3-kumarilglukozid (Mal-3-CoumGlu).

Vsebnost opazovanih antocianov smo določili z integracijo površin kromatografskih pikov ter jih izrazili kot ekvivalente malvidin 3-glukozida na maso jagod (in na posamezno jagodo). Koncentracijo skupnih antocianov smo izračunali kot vsoto posameznih identificiranih antocianov oz. njihovih glukozidiranih oblik. Vse analize smo izvajali v treh paralelkah.

Identifikacijo posameznih **flavonolov** smo izvedli ob uporabi standardnega dodatka kvercetin 3-glukozida in glede na predhodne objave tekočinske kromatografije z masno



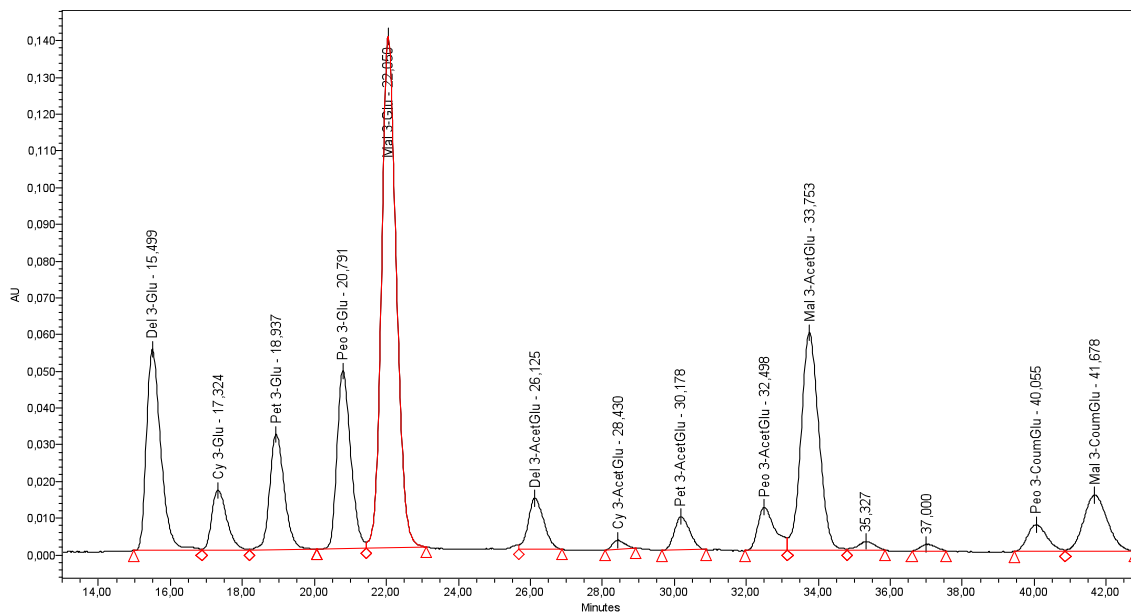
detekcijo (Cho in sod, 2004). Potrdili smo prisotnost naslednjih flavonolov oz. njihovih derivatov: derivate kvercitina (Qu Derivates), kampferol 3-glukozid (K 3-glu), siringetin 3-glukozid (Si 3-glu) in izoramnetin 3-glukozid (Iso 3-glu).

Za kvantitativno določitev koncentracije posameznega flavonola smo uporabili umeritveno krivuljo kvercitin 3-glukozida ( $k = 40231$ ,  $R_2 = 99,47\%$ ,  $DL = 0,2 \text{ mg/l}$ ,  $QL = 0,6 \text{ mg/l}$ ) in kampferol 3-glukozida ( $k = 40231$ ,  $R_2 = 99,76\%$ ,  $DL = 0,3 \text{ mg/l}$ ,  $QL = 1 \text{ mg/l}$ ).

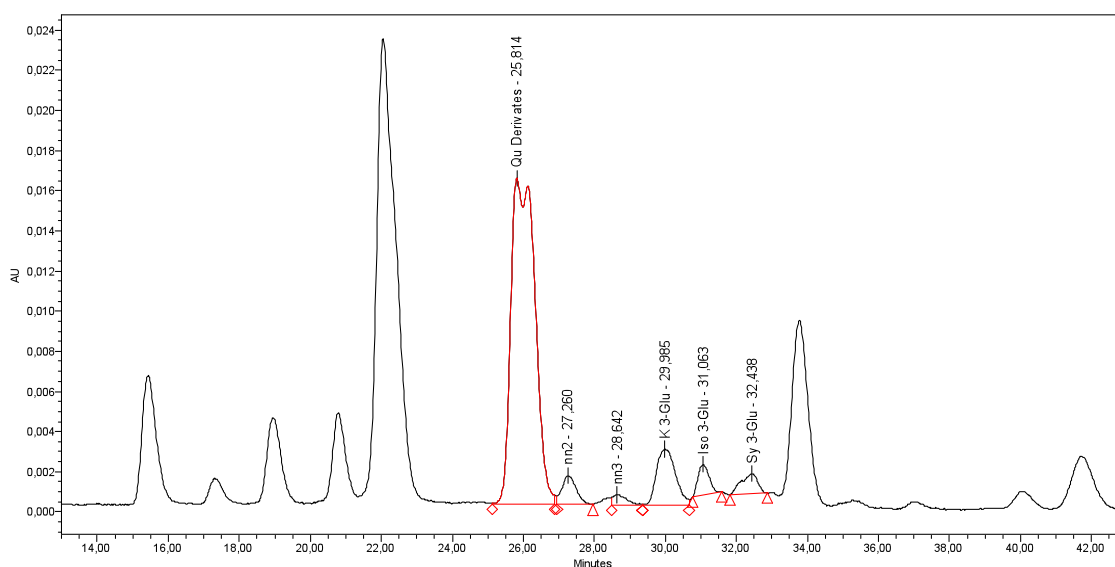
Koncentracijo skupnih flavonolov smo izračunali kot vsoto posameznih identificiranih flavonolov. Vse analize smo izvajali v treh paralelkah.

**Tabela 2: HPLC-UV/VIS analitski pogoji za analizo antocianov oziroma flavonolov**

Inštrument	Waters sistem z binarno črpalko (510), avtomatskim podajalnikom vzorcev (717+) in UV/VIS detektorjem (2487)
Kolona	Phenomenex Luna php, C18, 4,6 × 250 mm, 5µm
Pretok	1 mL/min
Volumen iniciranja	20 µL
Detekcija	UV/VIS (520 nm za antociane in 365 za flavonole)
Mobilni fazi	A = H <sub>2</sub> O + 0,2 vol. % triflorocetne kisline B = CH <sub>3</sub> OH + 0,2 vol. % triflorocetne kisline CH <sub>3</sub> OH = metanol
Gradientna Ločba	0 min (20 % B), 20 min (45 % B), 30 min (55 % B) in 40 min (70 % B)



**Slika 10: Primer HPLC-UV/VIS kromatograma ekstrakta grozdnih kožic sorte 'Cabernet Sauvignon' pri 520 nm z identifikacijo posameznih antocianov**



**Slika 11: Primer HPLC-UV/VIS kromatograma ekstrakta grozdnih kožic sorte 'Cabernet Sauvignon' pri 360 nm z identifikacijo posameznih flavonolov oz. njihovih derivatov**

### 3.3 Obdelava podatkov

V poskusu zbrane podatke smo obdelali in uredili s pomočjo programske opreme Microsoft Office Excel. Rezultati so podani kot povprečne vrednosti s standardnim odklonom.

## 4 REZULTATI IN RAZPRAVA

Pri prikazu rezultatov se uporablja naslednje oznake tretiranih trt (oz. njihovega grozdja):

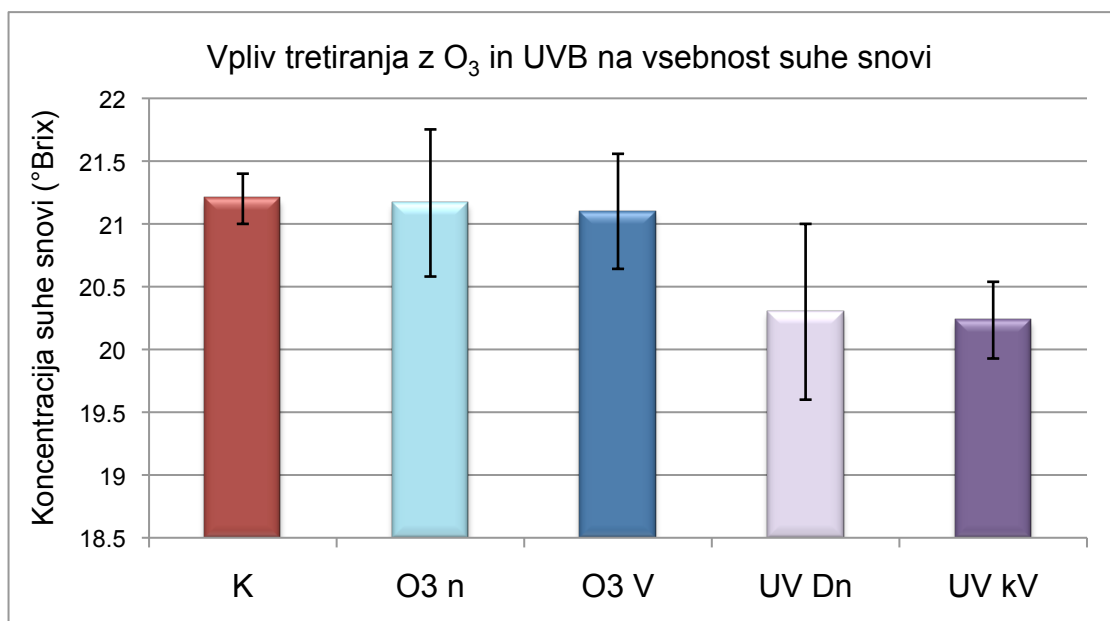
- O3V = oznaka tretiranja s plinskim ozonom\_visoka koncentracija
- O3n = oznaka tretiranja s plinskim ozonom\_nizka koncentracija
- UV Dn = oznaka tretiranja z UVB\_daljši čas\_nižja intenziteta sevanja
- UV kV = oznaka tretiranja z UVB\_krajši čas\_višja intenziteta sevanja

in netretiranih trt (oz. njihovega grozdja):

- K = kontrola

### 4.1 Osnovni kakovostni in količinski parametri grozdja

#### 4.1.1 VSEBNOST SUHE SNOVI (SLADKORNA STOPNJA)



*Slika 12: Prikaz koncentracije suhe snovi (°Brix) v grozdju ob trgatvi pri: kontrolnem obravnavanju (K); obravnavanju, tretiranim s plinskim ozonom nižje koncentracije (O3n); obravnavanju, tretiranim s plinskim ozonom višje koncentracije (O3V); obravnavanju, tretiranim daljši čas z nižjo intenziteto sevanja UVB-svetlobe (UV Dn); ter pri obravnavanju, tretiranim krajši čas z višjo intenziteto sevanja UVB-svetlobe (UV kV). Na stolpcih so prikazani standardni odkloni meritev.*

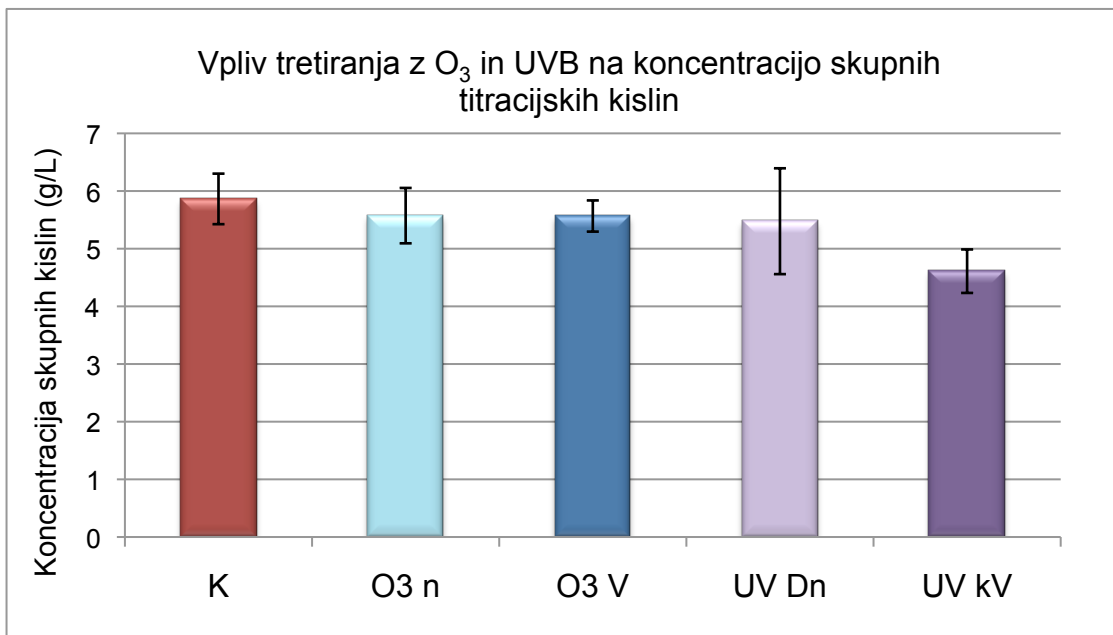
Iz grafa (Slika 12) lahko razberemo, da je bila v povprečju najmanjša povprečna koncentracija suhe snovi (°Brix) (v primerjavi s kontrolo in tretirani z ozonom) izmerjena v grozdnem soku obravnavanja, tretiranega krajši čas z višjo intenziteto sevanja UVB (UV kV), in sicer 20,2 °Brix. Najverjetneje je povzročen abiotski stres – intenzivno sevanje (čeprav kratek čas) vplivalo na fotosintetsko aktivnost in posledično na tvorbo sladkorja v grozdnih jagodah, kar je tudi v skladu z ugotovitvami iz literature (v preglednem članku Shultz, 2005). Poleg izmerjene občutno manjše koncentracije sladkorjev v grozdju smo zaznali tudi poškodbe oziroma vidne spremembe v pigmentaciji aktivnih listov pri trtah obravnavanja UV kV (Slika 13). Negativni trend tvorbe sladkorja je bil v povprečju opazen tudi pri obravnavanju, tretiranim daljši čas z nižjo intenziteto sevanja UVB-svetlobe (UV Dn), vendar so tu standardni odkloni preveliki za jasne zaključke o vplivu tovrstnega stresa na tvorbo sladkorjev.

Med kontrolnim obravnavanjem (K) in med obema obravnavanjema z ozonom (O3n in O3V) nismo opazili večjih razlik v povprečni koncentraciji suhe snovi (oz. tvorbi sladkorjev). Ozon v koncentracijah, kot smo jih uporabili v našem poskusu, tako ni imel opaznega vpliva na tvorbo suhe snovi oz. sladkorno stopnjo v soku grozdnih jagod.



***Slika 13: Poškodbe listov, tretiranih z višjo intenziteto sevanja UVB (tretiranje UV kV)***

#### 4.1.2 VSEBNOST SKUPNIH TITRACIJSKIH KISLIN

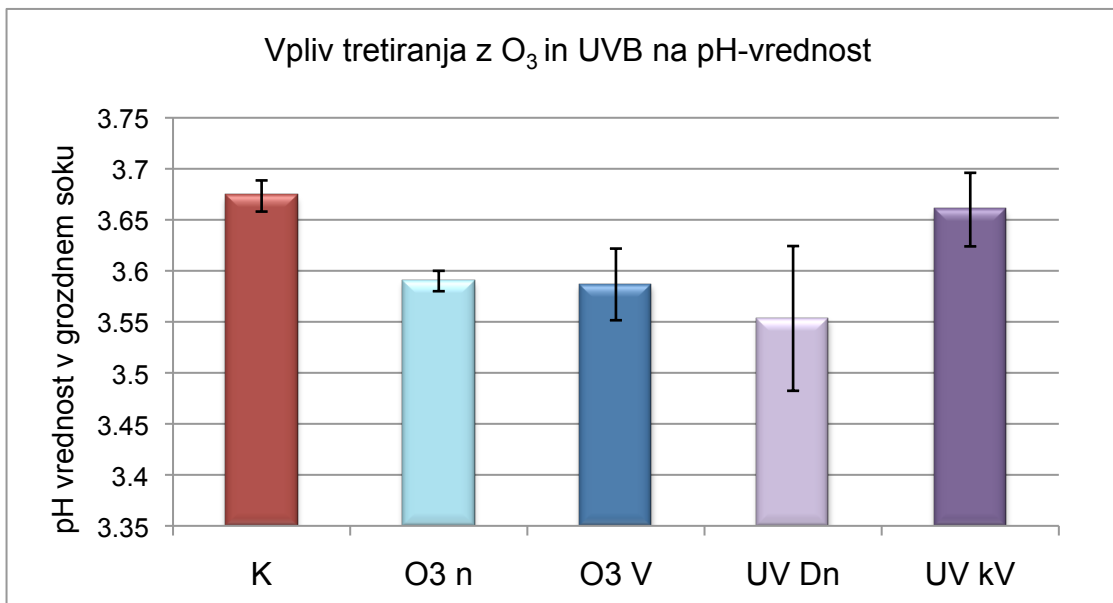


*Slika 14: Prikaz koncentracije skupnih titracijskih kislin (g/L) v grozdju ob trgatvi pri kontrolnem obravnavanju (K); obravnavanju, tretiranim s plinskim ozonom nižje koncentracije (O3n); obravnavanju, tretiranim s plinskim ozonom višje koncentracije (O3V); obravnavanju, tretiranim daljši čas z nižjo intenziteto sevanja UVB-svetlobe (UV Dn); ter pri obravnavanju, tretiranim krajši čas z višjo intenziteto sevanja UVB-svetlobe (UV kV). Na stolpcih so prikazani standardni odkloni meritev.*

Povprečne vrednosti skupnih titracijskih kislin so bile najnižje pri obravnavanju UV kV (4,6 g/L), najvišje pa pri kontrolnem obravnavanju K (5,9 g/L). Obravnavanji O3n in O3V sta v povprečju dosegli enako koncentracijo, in sicer 5,6 g/L skupnih kislin ter sta nakazali trend znižanja v primerjavi s kontrolo.

Izračunani standardni odkloni so nam pokazali, da lahko potrdimo nižjo vsebnost skupnih titracijskih kislin pri obravnavanju UV kV v primerjavi s kontrolnim obravnavanjem (K) ter v primerjavi z obravnavanji O3n in O3V, kar nakazuje določene spremembe v primarnem metabolizmu rastline (trte) ob tovrstnem stresu.

### 4.1.3 pH-VREDNOST



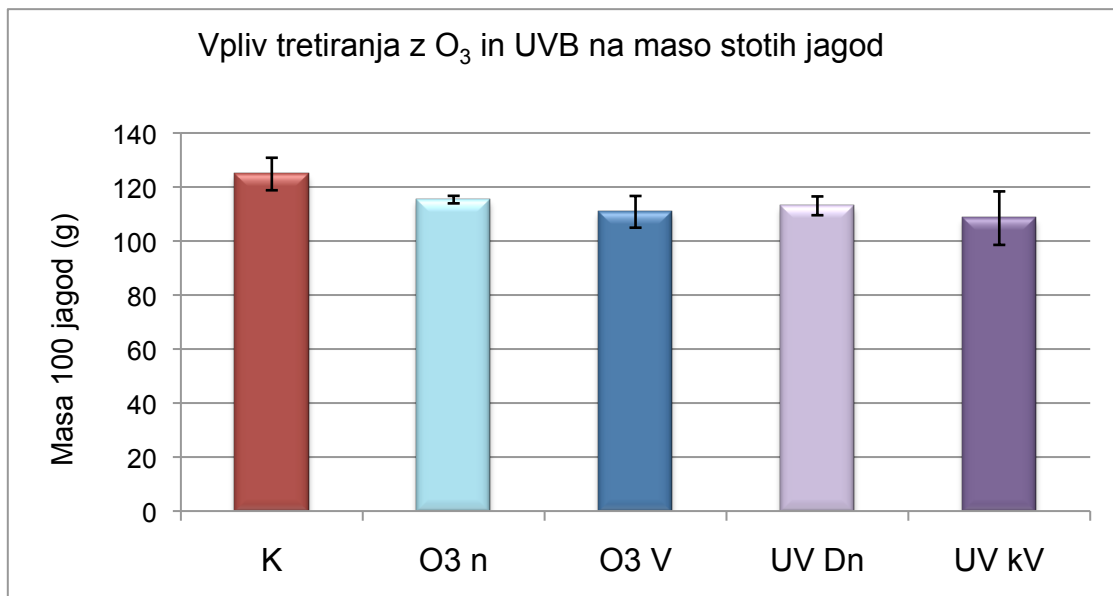
**Slika 15:** Vrednost pH v grozdnem soku ob trgatvi pri: kontrolnem obravnavanju (K); obravnavanju, tretiranim s plinskim ozonom nižje koncentracije (O<sub>3</sub>n); obravnavanju, tretiranim s plinskim ozonom višje koncentracije (O<sub>3</sub>V); obravnavanju, tretiranim daljši čas z nižjo intenziteto sevanja UVB-svetlobe (UV Dn); ter pri obravnavanju, tretiranim krajši čas z višjo intenziteto sevanja UVB-svetlobe (UV kV). Na stolpcih so prikazani standardni odkloni meritev.

Povprečne vrednosti pH v grozdnem soku so bile največje pri obravnavanju UV kV (3,66) in kontrolnem obravnavanju (3,67). Vrednosti so pričakovane za obravnavanje UV kV, saj ima obravnavanje izmerjeno najmanjšo koncentracijo skupnih kislin.

Pri kontrolnem obravnavanju K pa je vrednost pH v nasprotju s pričakovanji, saj ima obravnavanje izmerjeno večjo koncentracijo skupnih kislin kot obravnavanje UV kV. Domnevamo, da je imelo obravnavanje K višjo vrednost pH od pričakovane zaradi drugačnega razmerja vsebovanih posameznih kislin ter na račun spremenjene puferne kapacitete mošta.

Manjše povprečne vrednosti pH (v soglasju z večjimi koncentracijami titracijskih kislin) smo izmerili pri obravnavanjih UV Dn ter pri obeh obravnavanjih, tretiranih s plinskim ozonom (O<sub>3</sub>n in O<sub>3</sub>V), vse v primerjavi s kontrolo. Ob upoštevanju standardnih odklonov pa med slednjimi nismo zaznali večjih razlik.

#### 4.1.4 MASA STOTIH JAGOD

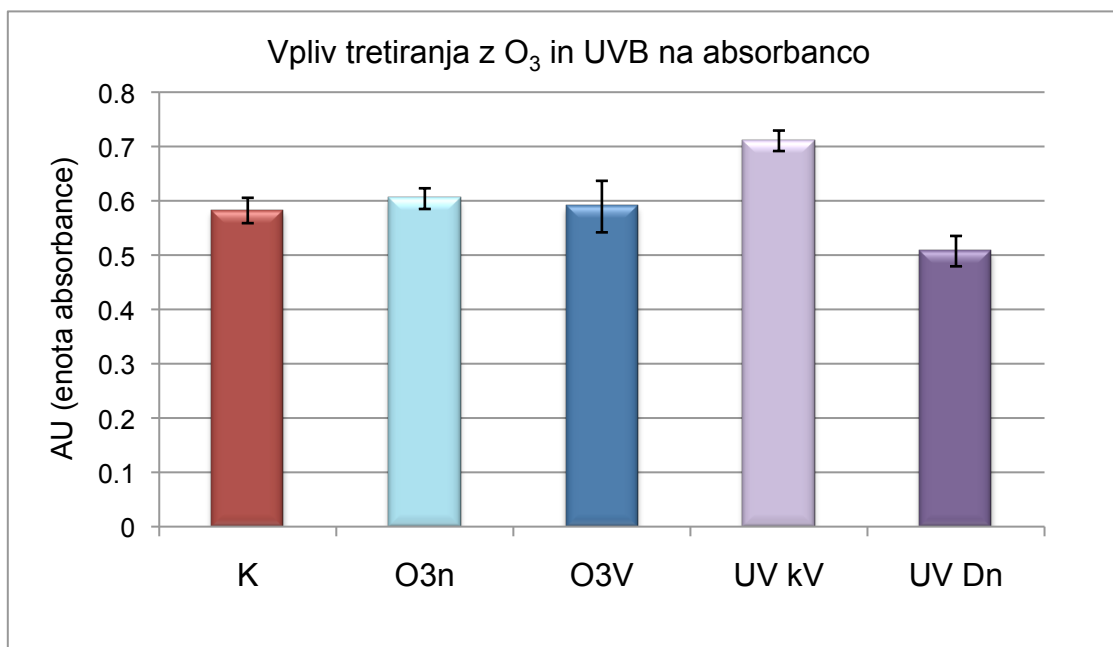


*Slika 16: Povprečna masa 100 jagod v grozdju ob trgatvi pri kontrolnem obravnavanju (K); obravnavanju, tretiranim s plinskim ozonom nižje koncentracije (O3n); obravnavanju, tretiranim s plinskim ozonom višje koncentracije (O3V); obravnavanju, tretiranim daljši čas z nižjo intenziteto sevanja UVB-svetlobe (UV Dn); ter pri obravnavanju, tretiranim krajši čas z višjo intenziteto sevanja UVB-svetlobe (UV kV). Na stolpcih so prikazani standardni odkloni meritev.*

Med osnovnimi količinskimi parametri grozdja smo se osredotočili na maso 100 jagod. V povprečju je 100 jagod netretiranega (kontrolnega) obravnavanja K doseglo največjo maso (124,8 g), medtem, ko so vsa štiri tretirana obravnavanja v povprečju dosegla manjše mase 100 jagod: obravnavanje O3n 115,3 g, obravnavanje O3V 110,8 g, obravnavanje UV Dn 113,0 g ter obravnavanje UV kV 108,5 g. Ob upoštevanju standardnih odklonov bistvenih razlik med štirimi tretiranimi vzorci nismo zaznali. Nižje povprečne vrednosti mase stotih jagod (v primerjavi s kontrolo) v obravnavanjih O3n, O3V, UV Dn in UV kV so v skladu z navedbami Mpoloke (2008) in Bookerja s sod. (2009), da nekatere rastline reagirajo na abiotski stres z nižjimi pridelki.

## 4.2 Vsebnost fenolnih snovi v jagodni kožici

### 4.2.1 VSEBNOST SKUPNIH FENOLOV



**Slika 17:** Vrednosti absorbance po metodi skupnih fenolov (AU) v ekstraktih jagodnih kožic ob trgatvi pri kontrolnem obravnavanju (K); obravnavanju, tretiranim s plinskim ozonom nižje koncentracije (O3n); obravnavanju, tretiranim s plinskim ozonom višje koncentracije (O3V); obravnavanju, tretiranim daljši čas z nižjo intenziteto sevanja UVB-svetlobe (UV Dn); ter pri obravnavanju, tretiranim krajši čas z višjo intenziteto sevanja UVB-svetlobe (UV kV). Na stolpcih so prikazani standardni odkloni meritev.

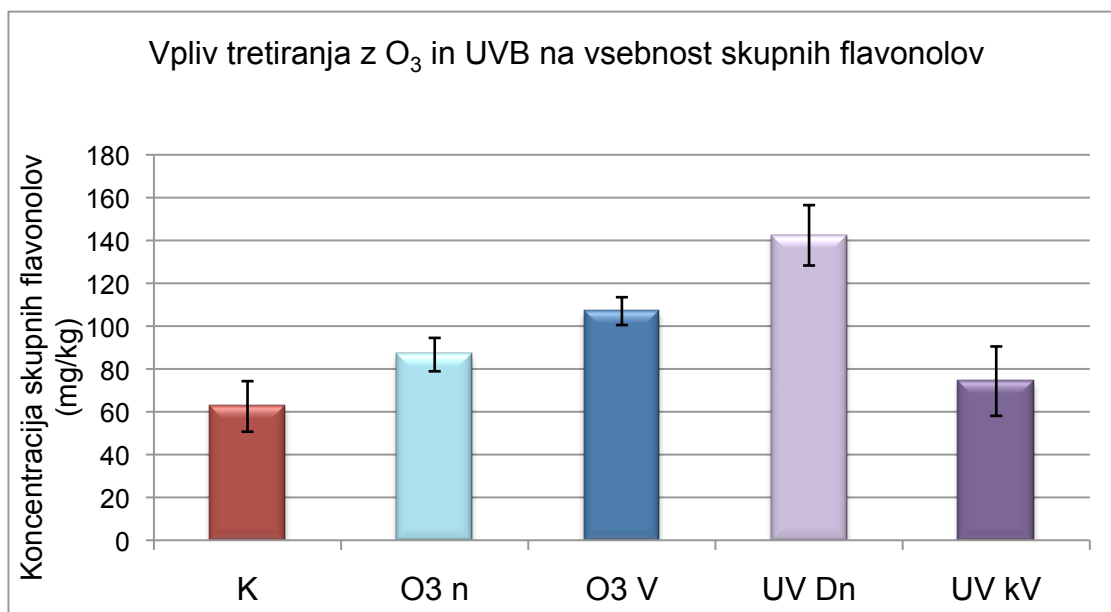
V povprečju smo izmerili največje vrednosti pri obravnavanju UV kV (0,7105 AU), najmanjše povprečne vrednosti pa so bile izmerjene pri obravnavanju UV Dn (0,5073 AU). Tudi ob upoštevanju standardnih odklonov lahko potrdimo, da je bila največja vsebnost izmerjena pri obravnavanju UV kV, najmanjša pa pri obravnavanju UV Dn. Obravnavanji z ozonom (O3n in O3V) pa nasprotno nista pokazali bistvenih odstopanj od kontrolnega obravnavanja.

Sinteza skupnih fenolov v rastlini je bila torej najbolj spremenjena pri obravnavanju, obsevanem dlje časa z UVB-svetlobo (UV Dn), čeprav z manjšo intenziteto. To je v skladu z navedbami nekaterih avtorjev (Berli, 2008), da abiotski stres UVB-sevanja vpliva na povečanje sinteze fenolnih snovi v rastlini. Nizka vsebnost skupnih fenolov



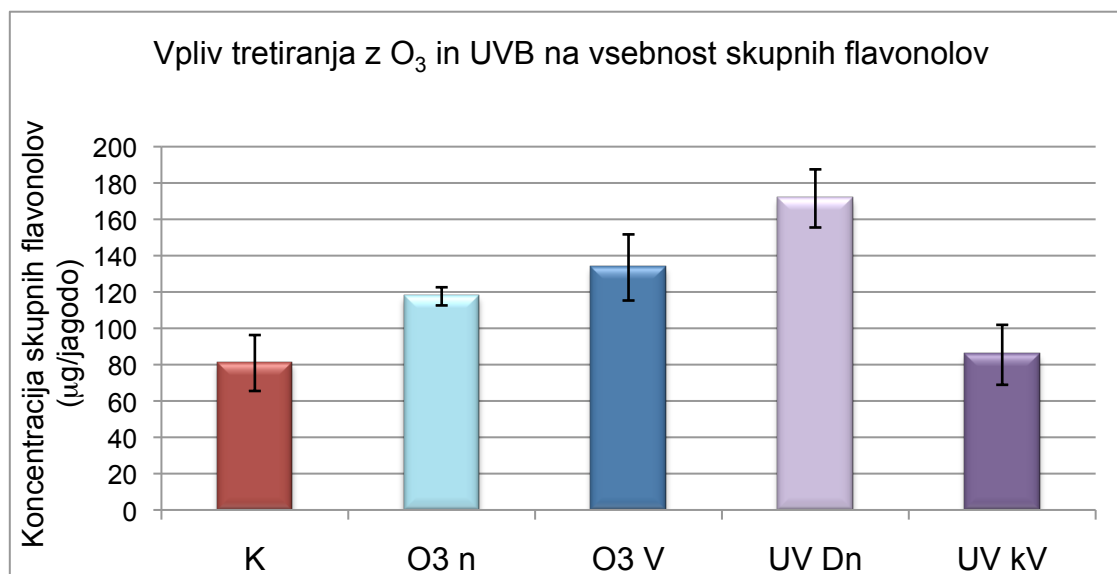
(oz. nizka vrednost absorbance) pri obravnavanju UV Dn pa je verjetno posledica pretiranega šoka za rastlino. Če se bo torej intenziteta UVB še naprej drastično večala, lahko vinogradniki verjetno pričakujemo precejšnje upade v kakovosti grozdja.

#### 4.2.2 VSEBNOST SKUPNIH FLAVONOLOV



**Slika 18:** Prikaz koncentracije skupnih flavonolov (mg/kg) v grozdju ob trgatvi pri kontrolnem obravnavanju (K); obravnavanju, tretiranem s plinskim ozonom nižje koncentracije (O3n); obravnavanju, tretiranem s plinskim ozonom višje koncentracije (O3V); obravnavanju, tretiranem daljši čas z nižjo intenziteto sevanja UVB-svetlobe (UV Dn); ter pri obravnavanju, tretiranem krajši čas z višjo intenziteto sevanja UVB-svetlobe (UV kV). Na stolpcih so prikazani standardni odkloni meritev.

V povprečju največjo koncentracijo skupnih flavonolov (SF) je doseglo obravnavanje UV Dn (142,4 mg/kg), sledila so obravnavanja O3V (107 mg/kg), O3n (86,7 mg/kg) in UV kV (74,3 mg/kg), medtem ko smo najmanjšo povprečno koncentracijo določili pri kontrolnem obravnavanju K (62,5 mg/kg). Standardni odkloni potrjujejo opazno večje koncentracije SF pri obravnavanjih UV Dn, O3v in O3n v primerjavi s kontrolnim obravnavanjem (K). Ker smo pri K določili največjo maso 100 jagod (Slika 16), ne moremo direktno sklepati ali je prišlo do razlik v koncentraciji skupnih flavonolov na račun spremenjene mase jagode ali na račun spremenjene sinteze flavonolov v rastlini. Zato smo rezultate preračunali še na µg na posamezno jagodo (Slika 19).



**Slika 19: Prikaz koncentracije skupnih flavonolov (µg/jagodo) v grozdju ob trgatvi pri kontrolnem obravnavanju (K); obravnavanju, tretiranim s plinskim ozonom nižje koncentracije (O3n); obravnavanju, tretiranim s plinskim ozonom višje koncentracije (O3V); obravnavanju, tretiranim daljši čas z nižjo intenziteto sevanja UVB-svetlobe (UV Dn); ter pri obravnavanju, tretiranim krajši čas z višjo intenziteto sevanja UVB-svetlobe (UV kV). Na stolpcih so prikazani standardni odkloni meritev.**

Tudi ob preračunu na posamezno jagodo smo pridobili največje koncentracije pri obravnavanju UV Dn, kar se ponovno sklada z navedbami Mpoloke (2008), da rastlina ob povišanem sevanju UVB-svetlobe sintetizira več flavonolov za zaščito rastline pred DNK poškodbami. Znano je, da je koncentracija flavonolov v grozdju zelo odvisna od izpostavljenosti grozdja svetlobi, manj pa je znano, kako na vsebnost flavonolov vplivajo povečane koncentracije ozona v ozračju. V našem poskusu smo opazili povečanje SF v primerjavi s kontrolo tudi v primeru (umetnega) tretiranja z ozonom, kar pomeni, da je tudi tovrstni abiotski stres najverjetneje povzročil določene spremembe v biosintezi.

Najmanjšo koncentracijo SF smo zasledili pri obravnavanju UV kV, kar je lahko posledica (pre)kratkega časa (5 dni) povečane izpostavljenosti UVB in/ali prevelikega šoka za rastlino.

### 4.2.3 VSEBNOST POSAMEZNIH FLAVONOLOV

Vsebnosti posameznih identificiranih flavonolov oziroma njihovih derivatov so razvidne v Tabeli 3. Podatki kažejo, da abiotski stresi, kakršnim so bile izpostavljene tretirane trte, ni vplival samo na kvantitativni, ampak tudi na kvalitativni profil flavonolov.

**Tabela 3: Prikaz koncentracije posameznih flavonolov (mg/kg) v grozdju ob trgatvi pri kontrolnem obravnavanju (K); obravnavanju, tretiranim s plinskim ozonom nižje koncentracije (O3n); obravnavanju, tretiranim s plinskim ozonom višje koncentracije (O3V); obravnavanju, tretiranim daljši čas z nižjo intenziteto sevanja UVB-svetlobe (UV Dn); ter pri obravnavanju, tretiranim krajši čas z višjo intenziteto sevanja UVB-svetlobe (UV kV). V tabeli je ob povprečni vrednosti prikazan še standardni odklon meritev.**

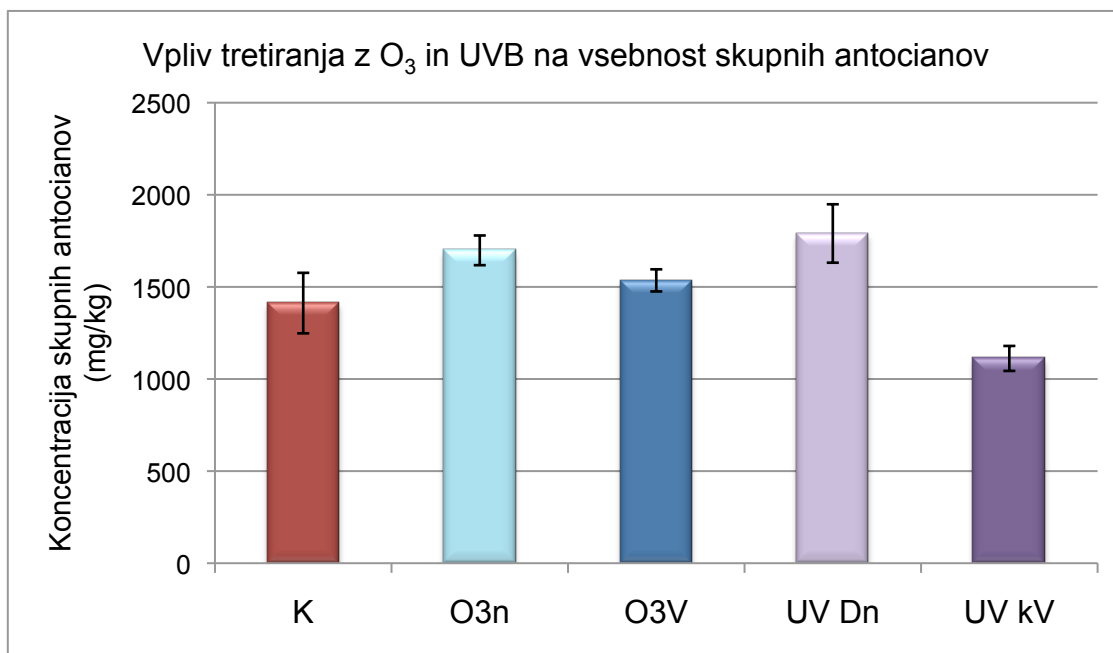
*	K - kontrola	O3 n	O3 V	UV Dn	UV kV
Qu derivati	50.3 ± 10.9	60.2 ± 5.4	77.7 ± 4.1	107.7 ± 11.8	55 ± 12.2
K 3-Glu	7.8 ± 1.2	19.5 ± 1.6	21.7 ± 1.9	24.8 ± 1.3	11.5 ± 3.1
ISO 3 - Glu	2.2 ± 0.2	4 ± 0.8	4.9 ± 0.3	6.8 ± 0.9	4.8 ± 1
Sy 3-Glu	2.1 ± 0.1	3 ± 0.1	2.7 ± 0.1	3.1 ± 0.2	3 ± 0.1
SUM	62.5 ± 11.8	86.7 ± 7.8	107 ± 6.5	142.4 ± 14.1	74.3 ± 16.2

\* Polna pimenovanja flavonolov so razvidna v točki Metode, podtočki 3.2.2.4

Tako lahko vidimo, da so Qu (Kvercetin) derivati, Kampferol 3-Glukozid in Izoramnetin 3-Glukozid pričakovano najvišji pri tretiranju, ki je bil najdlje izpostavljen dodatni svetlobi UVB (UV Dn), medtem, ko je bila koncentracija Siringetina 3-Glukozida največja pri O3n in obeh tretiranjih z UVB.

Razen pri Qu (Kvercetin) derivatih, je imela kontrola najmanjšo koncentracijo posameznih flavonolov, kar potrjuje, da sta obe vrsti sproženega abiotskega stresa (O3 in UV) v določeni meri vplivali na kvalitativne profile flavonolov oz. na spremembe v sintezi posameznih opazovanih flavonolov.

#### 4.2.4 VSEBNOST SKUPNIH ANTOCIANOV



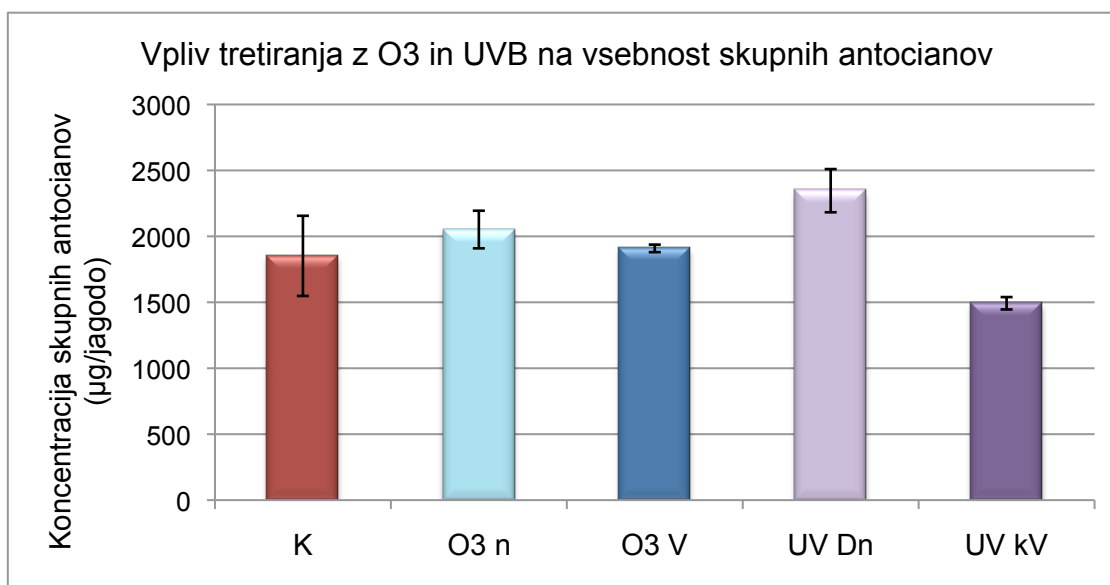
*Slika 20: Prikaz koncentracije skupnih antocianov (mg/kg) v grozdju ob trgatvi pri kontrolnem obravnavanju (K); obravnavanju, tretiranim s plinskim ozonom nižje koncentracije (O3n); obravnavanju, tretiranim s plinskim ozonom višje koncentracije (O3V); obravnavanju, tretiranim daljši čas z nižjo intenziteto sevanja UVB-svetlobe (UV Dn); ter pri obravnavanju, tretiranim krajši čas z višjo intenziteto sevanja UVB-svetlobe (UV kV). Na stolpcih so prikazani standardni odkloni meritev.*

Največje koncentracije skupnih antocianov (SA) smo v povprečju določili pri obravnavanjih UV Dn (1790,0 mg/kg jagod) in O3n (1698,6 mg/kg jagod), najnižjo pa pri obravnavanju UV kV (111,7 mg/kg jagod), medtem ko je imela kontrola v povprečju 1412,2 mg/kg jagod. Opazili smo tudi, da so povprečne koncentracije skupnih antocianov nižje pri obravnavanjih, pri katerih so bile koncentracije/intenziteta ozona in UVB-svetlobe višje (UV kV in O3v). Izmerjene povprečne koncentracije nakazujejo trend, da se je na povzročen stres rastlina odzvala s povečano sintezo antocianov.

Najnižje povprečne koncentracije obravnavanja UV kV so najverjetneje posledica prevelikega stresa za rastlino in možnega povečanja temperature v predelu grozdja (meritve T niso bile opravljene), saj je znano, da se sinteza antocianov pri povečanju nad kritično temperaturo (35 °C) inhibira.

Ob upoštevanju izračunov standardnega odklona lahko potrdimo, da sta največje koncentracije dosegli obravnavanji UV Dn in O3n oziroma, da je v primeru teh dveh tretiranj rastlina reagirala z najbolj povečano sintezo anocianov.

Zaradi upoštevanja največje mase 100 jagod kontrolnega vzorca K smo za potrditev vpliva na samo biosintezo tudi tokrat preračunali koncentracijo skupnih antocianov še na posamezno jagodo ( $\mu\text{g}/\text{jagodo}$ ) in pridobili/potrdili podobne trende (Slika 21).



**Slika 21:** Koncentracija skupnih antocianov ( $\mu\text{g}/\text{jagodo}$ ) v grozdju ob trgatvi pri kontrolnem obravnavanju (K); obravnavanju, tretiranim s plinskim ozonom nižje koncentracije (O3n); obravnavanju, tretiranim s plinskim ozonom višje koncentracije (O3V); obravnavanju, tretiranim daljši čas z nižjo intenziteto sevanja UVB-svetlobe (UV Dn); ter pri obravnavanju, tretiranim krajši čas z višjo intenziteto sevanja UVB-svetlobe (UV kV). Na stolpcih so prikazani standardni odkloni meritev.

#### 4.2.5 VSEBNOST POSAMEZNIH ANTOCIANOV

Vsebnosti posameznih identificiranih antocianov so razvidne v Tabeli 4. Tudi ti podatki kažejo, da abiotski stres, kakršnim so bile izpostavljene tretirane trte, ni vplival samo na kvantitativni, ampak tudi na kvalitativni profil antocianov.

**Tabela 4: Prikaz koncentracije posameznih antocianov (mg/kg) v grozdju ob trgatvi pri kontrolnem obravnavanju (K); obravnavanju, tretiranim s plinskim ozonom nižje koncentracije (O3n); obravnavanju, tretiranim s plinskim ozonom višje koncentracije (O3V); obravnavanju, tretiranim daljši čas z nižjo intenziteto sevanja UVB-svetlobe (UV Dn); ter pri obravnavanju, tretiranim krajši čas z višjo intenziteto sevanja UVB-svetlobe (UV kV). V tabeli je ob povprečni vrednosti prikazan še standardni odklon meritev.**

	K	O3n	O3V	UV Dn	UV kV
Del 3-Glu	191.7 ± 39.7	186.6 ± 15.7	203.4 ± 18.5	273.8 ± 13.1	162.3 ± 18.5
Cy 3-Glu	34.1 ± 6.7	27.1 ± 4.1	32.4 ± 5.6	37.9 ± 3.4	49.3 ± 5
Pet 3-Glu	104.9 ± 20.5	113.6 ± 8.6	117.8 ± 6.5	157.7 ± 6.2	94.9 ± 10.7
Peo 3-Glu	100.4 ± 16.9	98.4 ± 9.2	98.9 ± 4.2	118.2 ± 3.6	136.3 ± 15.2
Mal 3-Glu	500.5 ± 33.9	800.4 ± 118.9	604.9 ± 185.4	615 ± 58.8	260.5 ± 18.1
Del 3-Acet-Glu	55 ± 10.5	47.3 ± 4.3	56.5 ± 3.6	73.1 ± 3.6	44.9 ± 5.4
Cy 3-Acet-Glu	1.8 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.4 ± 0.2	1.1 ± 0.1	1.3 ± 0.1
Pet 3-Acet-Glu	35.9 ± 7.4	33.3 ± 2.1	36.6 ± 2.5	47.4 ± 1	28.3 ± 2.8
Peo 3-Acet-Glu	25.7 ± 1.5	22.2 ± 0.9	21.6 ± 2.9	15.3 ± 0.5	26.7 ± 2
Mal 3-Acet-Glu	260.3 ± 56.8	251.9 ± 9.4	253.7 ± 9.5	322.4 ± 19	206.4 ± 17.2
Peo 3-coum-Glu	22.2 ± 2.3	24.7 ± 1	20.7 ± 3.6	19.2 ± 0.8	30 ± 1.1
Mal 3-coum-Glu	79.8 ± 17.5	92.2 ± 4.2	87.4 ± 3	109.2 ± 6.7	70.8 ± 5

- Polna poimenovanja antocianov so razvidna v točki Metode, podtočki 3.2.2.4

Tako so bili npr. v obravnavanju UV Dn v največji koncentraciji prisotni Del 3-Glu, Pet 3-Glu, Del 3-Acet-Glu, podoben trend je nakazal tudi Mal 3-Acet-Glu.

Na drugi strani sta bila npr. koncentraciji Cy 3-Glu in Peo 3-Glu največji pri UV kV obravnavanju.

Zanimiv in vreden nadaljnjih raziskav je tudi trend rasti koncentracije Mal 3-Glu pri tretiranju z ozonom (O3n). Malvidin je pomemben predvsem s stališča vstopanja v t. i. pigmentacijske reakcije, saj je eden izmed snovi, ki najpogosteje vstopajo v reakcije, kjer se tvorijo stabilnejši piranoantociani (kar je lahko povezano z boljšo stabilnostjo barve vina).

## 5 ZAKLJUČKI

Iz podatkov, ki smo jih pridobili med našim poskusom, lahko sklepamo, da bodo spremembe, ki se v bodoče pričakujejo v obliki povečanega sevanja UVB-svetlobe in povečane koncentracije ozona, najverjetneje vplivale tudi na količino in kakovost pridelanega grozdja sorte 'Cabernet Sauvignon'.

Pri vseh vzorcih, pri katerih smo umetno sprožili abiotski stres, smo opazili zmanjšano količino pridelka (oz. zmanjšanje mase 100 jagod). Kot smo sklepali v hipotezi, se je rastlina odzvala na sprožen abiotski stres z zmanjšano produkcijo biomase in posledično pridelka.

Zaznali smo, da se je presnova vinske trte s primarnimi metaboliti spremenila le pri trsih, ki smo jih tretirali z UVB-svetlobo, in sicer najprej z zmanjšano sintezo suhe snovi. Do podobnih zaključkov smo prišli pri vsebnosti skupnih kislin, ki so bile ravno tako najmanjše pri tretiranjih z UVB-svetlobo (UV kV). Pri tretiranjih z ozonom bistvenih sprememb v primerjavo s kontrolo ni bilo.

Vsebnost skupnih fenolov (oz. vrednost absorbance) je bila največja pri vzorcih, tretiranih daljši čas z UVB-svetlobo (UV Dn), kar potrjuje hipotezo o povečani sintezi skupnih fenolov ob povečanem UVB-sevanju; vendar smo na drugi strani ugotovili tudi, da do tega ne pride v primeru prevelikega šoka za rastlino (ko je intenziteta UVB sevanja najverjetneje prevelika) (UV kV). Vsebnost skupnih fenolov se je povečala tudi v primeru (obeh) tretiranj z ozonom.

Večjo koncentracijo skupnih flavonolov kot pri kontrolnem vzorcu smo izmerili tako pri vzorcih, tretiranih z ozonom, kot pri vzorcih, tretiranih z UVB (UV Dn). Podobne rezultate (razen za O3V) smo pridobili tudi pri določitvi koncentracije skupnih antocianov; v obeh primerih pa je tretiranje UV kV spet nakazalo možno prekoračitev kritične meje oz. poškodbe listov in posledično zmanjšano sintezo. Poleg razlik v kvantitativnih profilih flavonolov in antocianov pa so sproženi abiotski stresi vplivali tudi na spremembe v njihovih kvalitativnih profilih.

Za zaključek lahko povzamemo, da je povečano UVB-sevanje vplivalo na spremembe tako v sintezi primarnih kot tudi sekundarnih metabolitov; tretiranje z ozonom pa samo na vsebnost opazovanih sekundarnih metabolitov v grozdju sorte 'Cabernet Sauvignon'.

## 6 VIRI

Ali K., Maltese F., Choi Y. H., Verpoorte R. (2010). Metabolic constituents of grapevine and grape derived products. *Phytochemistry Reviews*, let. 2010, št. 9, str. 357–378.

Andersen Ø. M., Markham K. R. (2006). *Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications*. Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group. Appreciation Guild.

Ashmore M. R. (2005). Assessing the future global impacts of ozone on vegetation. *Plant, Cell and Environment*, let. 2005, št. 28, str. 949–964.

Bavčar D. (2006). *Kletarjenje danes*. Ljubljana: Kmečki glas.

Beli F., D'Angelo J., Cavagnaro B., Bottini R., Wuilloud R., Silva M. F. (2008). Phenolic composition in grape (*Vitis vinifera* L. cv. Malbec) ripened with different solar UV-B radiation levels by capillary zone electrophoresis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, let. 2008, št. 56, str. 2892–2898.

Booker F., Muntifering R., McGrath M., Burkey K., Decoteau D., Fiscus E., Manning W., Krupa S., Chappelka A., Grantz D. (2009). The ozone component of global change: potential effects on agricultural and horticultural plant yield, product quality and interactions with invasive species. *Journal of Integrative Plant Biology*, let. 51, št. 4, str. 337–351.

Cho M. J., Howard L. R., Prior R. L. (2004). Flavonoid glycosides and antioxidant capacity of various blackberry, blueberry and red grape genotypes determined by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, let. 84, št. 13, str. 1771–1782.

Cindrić P., Korač N., Kovač V. (1994) Sorte vinove loze. *Prometej*, Novi Sad, str. 206–252.



Croteau R., Kutchan T. M., Lewis N. G. (2000). Natural products (secondary metabolites). American Society of Plant Physiologists. In: *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. Buchanan B., Gruissem W., Jones R. (Ur.) ASPB, str. 1250–1318.

Cuadra P., Herrera R., Fajardo V. (2004). Effects of UV-B radiation on the Patagonian *Jaborosa magellanica* Brisben. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, let. 76, str. 61-68.

Di Stefano R. in Guidoni S. 1989. The analysis of total polyphenols in musts and wines. *Vignevini*, št. 1–2, str. 47–52.

Downey M.O., Harvey J.S., Robinson S.P. (2003). Synthesis of flavonols and expression of flavonol synthase genes in the developing grape berries of Shiraz and Chardonnay (*Vitis vinifera* L.). *Australian Journal of Grape and Wine Research*, let. 9, str. 110-121.

Downey M. O., Harvey J. S., Robinson S. P. (2004). The effect of bunch shading on berry development and flavonoid accumulation in Shiraz grapes. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, št. 10, str. 55–73.

Downey M., Dokoozlian N. K., Krstic M. P. (2005). Cultural practice and environmental impacts on the flavonoid composition of grapes and wine: A review of recent research. *American Society for Enology and Viticulture*, let. 57, št. 3, str. 357–268.

Eliašová A., Repčák M., Pastírová A. (2004). Quantitative changes of secondary metabolites of *matricaria chamomilla* by abiotic stress. *Verlag der Zeitschrift für Naturforsch*, št. 59c, str. 543–548.

Haselgrove D., Botting B., Heeswijck R., Høj P. B., Dry P. R., Ford C., Land P. G. I. (2000). Canopy microclimate and berry composition: The effect of bunch exposure on the phenolic composition of *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz grape berries. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, let. 6, str. 141–149.

Hrček L., Z. Korošec - Koruza (1996). *Sorte in podlage vinske trte. Ilustrirani prikaz trsnega izbora za Slovenijo*. Ptuj: Slovenska vinska akademija Veritas.

Kuljaj I. (2005). *Trte in vina na Slovenskem. Vines and wines in Slovenia*. Ljubljana: Založba Magnolija.

Margalit Y. (2004). *Concepts in wine technology*. San Francisco, The Wine Appreciation Guild.

Mattivi F., Guzzon R., Vrhovsek U., Stefanini M., Velesco R. (2006). Metabolite profiling of grape: flavonols and anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, let. 54, str. 7692–7702.

Mpoloka S. W. (2008). Effects of prolonged UV-B exposure in plants. *African Journal of Biotechnology*, let. 7, str. 4874–4883. Pridobljeno dne 10. 5. 2012 s spletne strani: [www.ajol.info-index.php-ajg-article-viewFile/59692/47971](http://www.ajol.info/index.php-ajg-article-viewFile/59692/47971).

Passamonti S., Terdoslavich M., Franca R., Vanzo A., Tramer F., Braidot E., Petrusa E., Vianello A. (2009). Bioavailability of flavonoids: the role of bilitranslocase-mediated membrane transport in animal and plant organisms. *Current Drug Metabolism*, let. 2009, št. 10, str. 369–394. Pridobljeno dne 10. 5. 2012 s spletne strani: <http://benthamscience.com/cdm/openaccessarticles/cdm10-4/0006F.pdf>.

Planinšek A. *Ozon – naš zaščitnik in sovražnik*. (2008). Pridobljeno 10. 5. 2012 s spletne strani: [www.arso.gov.si/zrak/kakovost%20zraka/podatki/Ozon\\_clanek.pdf](http://www.arso.gov.si/zrak/kakovost%20zraka/podatki/Ozon_clanek.pdf).

Price S.F., Breen P.J., Valladao M., Watson B.T. (1995). Cluster sun exposure and quercetin in Pinot noir grapes and wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, let. 46, str. 187-194.

Rusjan T., Vodovnik Plevnik T., Hudoklin S. (2012). Razmere v slovenskem vinarstvu danes. V zbornik referatov/4. slovenski vinogradniško-vinarski kongres z mednarodno udeležbo, Nova Gorica 25. in 26. 1. 2012. Ljubljana: Biotehnična fakulteta.

Samanta A., Das G., Das S.K. (2011). Roles of flavonoids in plants. *International Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, let. 6, št. 1, str. 12-35.

Shultz H. (2005). Climate change and viticulture: A European perspective on climatology, carbon dioxide and UV-B effects. *Australian Journal of Grape and Wine*

*Research*. let. 6, št. 1, str. 2–12.

Sternad Lemut M., Trošt K., Sivilotti P., Vrhovsek U. (2011). Pinot Noir grape colour related phenolics as affected by leaf removal treatments in the Vipava Valley. *Journal of Food Composition and Analyses*, let. 24, št. 6, str. 777–784.

Svobodová A., Psotová J., Walterova D. (2003). Natural phenolics in the prevention of UV-induced skin damage. A review. *Biomedical Papers*, let. 147, št. 2, str. 137-145.

Waterhouse A. L. (2002). Determination of total phenolics. Current protocols in food analytical chemistry. University of California, str. I1.1.1–I1.1.8.

Winkler A., Cook J. A., Kliewer W. M., Lider L. A. (1974). *General viticulture*. Los Angeles, University of California press.

Woodal G.S. and Stewart G.R. (1998). Do anthocyanins play a role in UV protection of the red juvenile leaves of *Syzygium*? *Journal of Experimental Botany*, let. 49, št. 325, str. 1447-1450.

Uredba o ozonu v zunanjem zraku (Ur.I.RS, št.8/03). Pridobljeno 10. 5. 2012 s spletne strani: <http://www.uradni-list.si/1/objava.jsp?urlid=20038&stevilka=283>.