

Biofortifikacija soje cinkom

Kraljević, Dejana

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:151:689617>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-19**



Sveučilište Josipa Jurja
Strossmayera u Osijeku

**Fakultet
agrobiotehničkih
znanosti Osijek**

Repository / Repozitorij:

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



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Dejana Kraljević

Diplomski studij Bilinogojstvo

Smjer Ishrana bilja i tloznanstvo

BIOFORTIFIKACIJA SOJE CINKOM

Diplomski rad

Osijek, 2018.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Dejana Kraljević

Diplomski studij Bilinogojstvo

Smjer Ishrana bilja i tloznanstvo

BIOFORTIFIKACIJA SOJE CINKOM

Diplomski rad

Osijek, 2018.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Dejana Kraljević

Diplomski studij Bilinogojstvo

Smjer Ishrana bilja i tloznanstvo

BIOFORTIFIKACIJA SOJE CINKOM

Diplomski rad

Povjerenstvo za ocjenu i obranu diplomskog rada:

1. doc. dr. sc. Vladimir Ivezić, predsjednik
2. prof. dr. sc. Zdenko Lončarić, mentor
3. izv. prof. dr. sc. Brigita Popović, član

Osijek, 2018.

Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1. Cilj istraživanja	6
2. PREGLED LITERATURE	7
3. MATERIJAL I METODE	16
3.1. Lokalitet poljskog pokusa i analize tla.....	16
3.1.1. pH tla (Reakcija tla).....	16
3.1.2. Sadržaj organske tvari u tlu	17
3.1.3. Koncentracija raspoloživog fosfora i kalija ekstrahiranog AL-metodom	19
3.1.4. Određivanje sadržaja karbonata u tlu	19
3.1.5. Određivanje ukupnih i biljkama raspoloživih koncentracija Zn i Cd u tlu ...	20
3.2. Izbor sorata i uzgoj soje	21
3.3. Agronomska biofortifikacija soje cinkom	22
3.4. Uzorkovanje i analiza biljnog materijala	22
3.5. Statistička obrada podataka.....	22
4. REZULTATI	23
4.1. Osnovna agrokemijska svojstva tla i koncentracije cinka u tlu	23
4.2. Prinosi soje.....	23
4.3. Koncentracije cinka (Zn) i kadmija (Cd) u stabljici, mahuni i zrnu soje.....	25
4.4. Iznošenje cinka (Zn) i kadmija (Cd) prinosom zrna soje	28
5. RASPRAVA.....	30
5.1. Agrokemijska svojstva tla	30
5.2. Utjecaj agronomske biofortifikacije na prinos, koncentraciju i iznošenje Zn i Cd ..	31
5.3. Utjecaj sorte na prinos, koncentraciju i iznošenje cinka i kadmija	32
6. ZAKLJUČAK.....	34
7. POPIS LITERATURE.....	35
8. SAŽETAK	38
9. SUMMARY	39
10. POPIS TABLICA	40
11. POPIS GRAFIKONA.....	41

1. UVOD

Zemlja podrijetla soje je Kina, gdje se uzgaja već pet tisuća godina. Bila je jedna od pet svetih zrnatih kultura o kojoj je ovisila kineska civilizacija. Od koje biljke potječe kulturna soja nije točno utvrđeno, ali se vjeruje da je to divlja vrsta *Glycine ussuriensis* sitnijeg zrna koja raste u istočnoj Aziji. U Europi se počinje uzgajati u 17. stoljeću. Na našem području uzgoj je započet 1910. godine.

Upotreba soje je raznovrsna jer se koristi za prehranu ljudi i stoke te industrijsku preradu. U prehrani ljudi upotrebljava se zrno soje u obliku sojina brašna, sojina mlijeka, sojina ulja itd. Hranjiva vrijednost soje može se izjednačiti s mesom, jajima, mlijekom i sl.

Vrlo je važna industrijska sirovina. Sojino ulje koristi se u proizvodnji svijeća, sapuna, linoleuma i dr., a sojino mlijeko za proizvodnju papira, umjetne vune i tekstila.

U ishrani stoke upotrebljava se stabljika (krma u zelenom ili osušenom stanju), zrno i pogače.

Sorata soje ima više od deset tisuća, a dijele se prema duljini vegetacije, boji zrna, smjeru uzgoja itd. Najpogodnije sorte su one čije se mahune zameću na minimalno 20 cm iznad površine tla zbog mehanizirane berbe i ne pucaju u zreloom stanju.

Geogeno podrijetlo ekološki najzanimljivijih teških metala Cu, Zn, Cd i Pb najčešće je povezano sa sumpornim mineralima koji u okolišu relativno brzo oksidiraju te se metalni kation odvaja od sumpora u ranoj fazi trošenja minerala (He i sur., 2005.) U kasnijim fazama pedogeneze ovi metali češće su u sastavu Mn oksida. Cink i kadmij su prema značaju za tlo, biljke i ljude značajno različiti. Naime, cink je esencijalan element dok je kadmij toksičan bez esencijalnog ili korisnog učinka. Njihov sadržaj u tlu posljedica je prirodnih (nasljeđe iz matične stijene) i antropogenih procesa (urbanizacija, industrijalizacija, promet i poljoprivredna proizvodnja). Tla nastala na pješčanjacima i kiselim magmatskim stijenama sadrže manje teških metala od tala nastalih na alkalnim magmatskim stijenama i sedimentnim škriljcima koja sadrže veće količine Cu, Zn, Mo i Pb, a mogu sadržavati i iznad 200 mg/kg Cd.

Antropogeni procesi pridonose akumulaciji ovih elemenata primjenom gnojidbe mineralnim gnojivima (tablica 1), gnojidbe organskim gnojivima (tablica 2), aplikacijom pesticida, navodnjavanjem i kondicioniranjem tla (Lončarić i sur., 2012.) Od mineralnih gnojiva izdvajaju se fosfatna koja sadrže teške metale kao nečistoće (posebna pažnja

pridaje se koncentraciji kadmija). Kalcizacijom karbokalkom također se unose znatnije količine teških metala, i to u većoj količini nego fosfatnim gnojivima, ali se također unese i 770 g/ha Zn što s fosfatnim gnojivima nije slučaj.

Tablica 1: Sadržaj cinka i kadmija (mg/kg) u mineralnim gnojivima (Amlinger i sur., 2004.)

Gnojivo	Cd	Zn
KAN	0,31	55,02
AN	0,03	2,30
UREA	0,15	2,40
Ostala dušična gnojiva	0,10	4,00
Superfosfat	20,84	380,00
Tomasov fosfat	0,58	56,50
Ostala fosforna gnojiva	7,51	225,33
Sirovi kalijev karbonat	0,06	1,57
Kalijev klorid	0,10	4,10
Kalijev sulfat	0,09	2,30
NP gnojiva	10,23	115,75
PK gnojiva	4,80	153,50

Organskom gnojidbom tlo obogaćujemo esencijalnim teškim metalima i povećavamo njihovu bioraspoloživost, posebno na laganim pjeskovitim i karbonatnim tlima, ali možemo povećati i koncentraciju i raspoloživost Cd i Pb što je negativan učinak (Lončarić i sur., 2012.)

Nriagu (1989.) je utvrdio vrlo visoke udjele pojedinih teških metala kao posljedicu antropogenih aktivnost na globalnoj razini u ukupnim atmosferskim depozicijama (66 % Zn, 85 % Cd i dr.). Tijekom proteklih desetljeća godišnja emisije cinka na svjetskoj razini dosegla je 1.350.000 t, a kadmija 22.000 t (Padmavathiamma i Li, 2007.). Odnos emisija Zn i Cd u Hrvatskoj je 69:1 (Državni zavod za statistiku RH, 2010.).

Tablica 2: Sadržaj cinka i kadmija u organskim gnojivima (mg/kg suhe tvari) (Amlinger i sur., 2004., Vukobratović, 2008.)

Gnojivo	Cd	Zn
Goveđa gnojnica	0,21-0,61	166-237
Goveđa gnojovka	0,22-0,76	109-347
Svinjska gnojnica	0,31-0,82	619-1.270
Svinjska gnojovka	0,43-1,00	733-1.450
Gnoj peradi	0,80-2,86	302-636
Gnoj ovaca i koza	0,28-0,41	107-204
Tripleks	12,10	3.173
Vapneni materijal	0,28	39
Glisnjak	0,60	133
Ostaci pšenice	0,02	31
Ostaci kukuruza	0,00	15
Ostaci suncokreta	0,25	33
Ostaci soje	0,17	33
Ostaci povrća	0,10	26

Biljkama su na raspolaganju za usvajanje znatno manje količine mikroelemenata nego je njihova ukupna koncentracija u tlu. Raspoloživost u tlu ovisi o svojstvima tla i pojedinom elementu. Preko biljaka Zn i Cd ulaze u prehrambeni lanac životinja i ljudi. Cink i kadmij uvijek se javljaju u kombinaciji. Kemijski su vrlo slični, pripadaju 12. skupini elemenata periodnog sustava (skupina cinka), s tim da je Cd toksičan, dok je Zn esencijalan element za organizme. Iako je cink esencijalan element, uslijed previsoke koncentracije u tlu ili biljkama namirnice ga mogu sadržavati u toksičnim količinama.

Cink (Zn) je jedan od 17 esencijalnih elemenata neophodnih za rast i razvoj biljaka. Prosječan sadržaj cinka u tlu je 5-20 mg/kg, a u biljkama 0,6-83mg/kg (ovisno o biljnoj vrsti). Zrno soje sadrži 40-60mg/kg Zn. Toksičnost se javlja pri 200-500 mg/kg u suhoj tvari lista. Po zastupljenosti je na 24. mjestu najčešćih elemenata na Zemlji.

Nedostatak cinka jedan je od najraširenijih nedostataka mikrohraniva u poljoprivrednim zemljama, a posljedice se očituju smanjenjem prinosa i nutritivne vrijednosti proizvoda. Tropsko područje s tlima opterećenim vremenskim prilikama, semiaridno područje s tlima visokog pH, te pjeskovita i kisela tla u brojnim klimatskim

zonama posebno su ugrožena deficitom ovog elementa. Nedostatkom mikrohraniva, uključujući cink, pogođeno je oko 40% svjetske populacije. Ukoliko se pristup uzgoju ne promijeni vjeruje se da će do 2050. godine biti pravi izazov uzgojiti biljke visoke nutritivne vrijednosti.

U istočnom dijelu Hrvatske (Slavonija i Baranja) koncentracije cinka u tlu su unutar maksimalno dopuštenih koncentracija (MDK), s tim da su koncentracije vodotopivog Zn više na kiselijim nego na alkalnijim područjima regije. Vodotopiva frakcija Zn ovisi o ukupnom Zn u tlu, ukupnom ugljiku te pH vrijednosti tla. Važno je napomenuti da je Zn element koji se čvrsto veže za čestice tla te je u otopini tla mala količina i njegova je dostupnost biljkama ograničena.

Maksimalno dozvoljene koncentracije cinka u tlu propisane su Prvoinikom o zaštiti poljoprivrednog tla od onečišćenja (NN, 2014.):

1. pjeskovito tlo 0-60 mg/kg
2. praškasto-ilovasto tlo 60-150 mg/kg
3. glinasto tlo 150-200 mg/kg

Preporučeni dnevni unos cinka je (Hadžić, 2013.):

1. djeca do 12 godina 5-14 mg/dan
2. djeca uzrasta iznad 12 godina i mladi 14-16 mg/dan
3. trudnice i dojilje 14-19 mg/dan
4. odrasle osobe 14-19 mg/dan

Kadmij (Cd) je važan metal zbog industrijske upotrebe, ali i jedan od najopasnijih metala zbog svoje akumulacije u prirodi. Topiv je u kiselinama i javlja se samo u oblikuanorganskih soli. Relativno je rijedak element i njegova koncentracija u Zemljinoj kori ne prelazi $1,8 \times 10^{-5}$. U prirodi se kadmij rijetko može naći kao samostalna ruda grinokit (CdS), a najčešćije kao primjesa u sulfidnim rudama cinka i olova (sfaleritu i galenitu), koje ga u prosjeku sadrže oko 0,3% (Fleischer i sur., 1974.). Pristupačnost Cd u tlu ovisi najviše o pH tla, te sadržaju ostalih kationa (npr. Ca i Zn smanjuju usvajanje Cd). Višak u biljci može poremetiti metabolizam Fe i izazvati klorozu. Glavni izvor onečišćenja kadmijem su talionice metala, a u tlo može doći i primjenom gradskog smeća, komposta i mulja kao gnojiva, te gnojidbom fosforim gnojivima. Iako nije esencijalni mikroelement, Cd se vrlo lako usvaja biljnim korijenom i akumulira u biljkama u koncentracijama koje predstavljaju rizik u hranidbenom lancu (Benavides i sur., 2005.; Groppa i sur., 2012.).

Može izazvati ozbiljne poremećaje u fiziološkim procesima biljke, kao što je fotosinteza, vodni odnosi i usvajanje minerala (Lopez-Chuken i Young, 2010.; Gill i sur., 2012.). Kadmij je potencijalno toksičan element za biljke i životinje. Bioakumulativan je, fitotoksičan, pa i kancerogen, a bez esencijalnog utjecaja.

Maksimalno dopuštena koncentracija kadmija u poljoprivrednom tlu (NN, 2014.):

1. pjeskovito tlo 0,0-0,5 mg/kg
2. Praškasto-ilovasto tlo 0,5-1,0 mg/kg
3. glinasto tlo 1,0-2,0 mg/kg

Maksimalno dopuštena koncentracija kadmija u namirnicama (Hadžić, 2013.):

1. žitarice 0,1 mg/kg
2. uljarice 0,5 mg/kg
3. riža 0,3 mg/kg
4. meso 0,05 mg/kg.

Povećanje prinosa usjeva dovodi do smanjenja koncentracije minerala u zrnu (Zhao i McGrath, 2009.). Biofortifikacija je postupak povećanja koncentracije bioraspoloživih esencijalnih elemenata u konzumnim dijelovima usjeva. Razlikujemo agronomsku i genetsku biofortifikaciju (White i Broadley, 2009.). Genetska biofortifikacija je uzgoj sorata i hibrida čiji merkantilni/konzumni dijelovi sadrže povećane koncentracije ljudima neophodnih mikroelemenata (Fe, Zn, Se i dr.), vitamina, provitamina i ostalih tvari. Agronomska biofortifikacija je kratkoročan pristup uzgoja temeljen na gnojidbi (Cakmak, 2008.). Zadatak biofortifikacije je povećati koncentraciju esencijalnih elemenata (Fe, Zn, Cu, Mg, Se), povećati bioraspoloživost elemenata, te smanjiti koncentraciju štetnih elemenata (Cd, Pb, Hg). Preduvjeti za uspješnu biofortifikaciju su poznavanje svojstava tla (ukupne i raspoložive frakcije minerala), poznavanje sorte ili kultivara, odnosno mogućnosti usvajanja i akumuliranja mikrohraniva i pravovremeni agrotehnički zahvati. Uspješno biofortificirani usjev mora imati visoku rodnost (isplativost) te biti prihvatljiv za poljoprivrednike i potrošače (Bouis i Welch, 2010.).

1.1. Cilj istraživanja

Cilj ovog istraživanja je utvrditi:

1. mogućnost povećanja koncentracije cinka u zrnu, stabljici i mahunama različitih sorata sojeagronomskom biofortifikacijom,
2. učinkovitost folijarno apliciranog cinka,
3. povećanje unosa cinka u prehrambeni lanac folijarnom aplikacijom cinka.

Osnovne su hipoteze ovoga rada:

1. folijarnom aplikacijom Zn povećava se koncentracija Zn u zrnu, stabljici i mahunama soje,
2. sorte soje značajno se razlikuju po učinkovitosti akumulacije apliciranog Zn u zrno, stabljiku i mahune.

2. PREGLED LITERATURE

Za svoj rast i razvoj biljke prosječno trebaju oko 1 kg/ha mikrohraniva. Mikrohraniva su u oraničnom sloju tla u količinama od nekoliko desetina do nekoliko tisuća puta većim od biljci potrebnih količina, ali nisu u obliku koji je biljkama raspoloživ. Stoga se veća pažnja obraća na optimizaciju njihove raspoloživosti nego li na povećanje ukupnih količina u tlu. S druge strane toksični elementi imaju isključivo negativan učinak i njihovu raspoloživost treba ograničiti. Odnosno, gnojidbom ne treba pospješivati njihovu raspoloživost u tlu. U uvjetima izraženog deficita mikroelemenata možemo ih dodati u tlo količinama od 10-20 kg/ha kao dio složenog gnojiva ili u obliku pojedinačnog mikrognojiva. Nedostatak mikrohraniva može značajno umanjiti prinos i kvalitetu usjeva. Mikrohraniva u tlo praktično dodajemo s kompleksnim mineralnim gnojivima, folijarnom aplikacijom mikrognojiva, tretiranjem sjemena, samostalnom aplikacijom mikrognojiva u tlo ili kao smjesu s pesticidima (Lončarić i sur., 2015.). Folijarna gnojidba primjenjuje se u slučaju deficita nekog elementa, vrlo rijetko preventivno, a optimalna primjena folijarne gnojidbe je nakon analizom utvrđene suboptimalne koncentracije nekog elementa u listu (Lončarić i sur., 2015.). Na područjima gdje nema ljudskog utjecaja teški su metali gotovo u potpunosti podrijetlom iz matičnog supstrata, dok su na urbanim i poljoprivrednim područjima koncentracije povećane uslijed kontinuiranog unosa teških metala u ekosustav (Ivezić i sur., 2014.).

Oplemenjivački postupci u pravcu postizanja visokih prinosa dovelisu do opadanja mikronutritivne vrijednosti žitarica (Shukla and Tiwari, 2014.). Upotreba gnojiva bez mikroelemenata i uzgoj usjeva na mikroelementima osiromašenim tlima doveli su do kritičnog osiromašenja namirnica mikronutrijentima. Neke žitarice, kao riža i pšenica, imaju toliko niske koncentracije da su u pojedinim slučajevima vrlo nekvalitetne za ljudsku konzumaciju i ishranu stoke.

Cink je esencijalni biljni mikroelement, uključen u više metabolitičkih procesa (Marshner, 1995., Cakmak, 2000.) i sudjeluje u razvoju reproduktivnih dijelova biljke (Sharma i sur., 1987., Pandey i sur., 2002.). Aktivator je velikog broja enzima kao npr. fruktoza 1,6 bifosfat aldolaze, važne u sintezi ugljikohidrata, Cu-Zn superoksid dismutaze (Pandey i sur., 2002.), RNA polimeraze, alkohol-dehidrogenaze (Sandman i Boger, 1983.) te brojnih drugih. Ima važnu ulogu u stvaranju peludi, zaštiti od fotooksidativnih oštećenja i toplinskog stresa te otpornosti na neke patogene (Alloway, 2008.). Kod nedostatka cinka u biljci dolazi do oslabljene aktivnosti fruktoza 1,6 bifosfat aldolaze (Pandey i sur., 2002.),

sinteza proteina je značajno reducirana te dolazi do akumulacije amida i aminokiselina (Chaundry i Loneragan, 1972., Mengel i Kirkby, 1987.). Praske i Plocke (1971.) navode da nedostatak cinka u biljci nepovoljno djeluje na strukturu i cijelovitost ribosoma citoplazme. Cink je također vrlo važan u sintezi indol octene kiseline i auksina (Takaki i Kushizaki, 1970.). U istraživanjima koje su proveli Jyung i sur. (1975.) utvrđeno je da su biljke bolje opskrbljene cinkom sadržavale više škroba.

Cink (Zn) je prosječnog sadržaja u tlu od 5-20 mg/kg. Po zastupljenosti je na 24. mjestu najčešćih elemenata na Zemlji. U tlu potječe iz primarnih i sekundarnih minerala. Kisele stijene sadrže manje cinka (granit, gnajs), a alkalne znatno više (bazalt). U većim količinama se javlja uz sulfide, npr. sfalerit (ZnS). Pristupačnost mu je veća u kiselim tlima gdje se javlja opasnost od njegovog ispiranja. Nedostatak se najčešće javlja na teškim, glinovitim tlima (Vukadinović i Lončarić, 1998.). Čvrsto se sorbira na adsorpcijski kompleks tla pa je koncentracija u vodenoj otopini tla vrlo niska. U biljkama mu je koncentracija 0,6-83 mg/kg, ovisno o biljnoj vrsti. U biljnoj tvari uvijek je prisutan kao dvovalentni kation važan u biosintezi DNA i RNA, proteina i auksina. Povećava otpornost prema bolestima, suši i niskim temperaturama. Toksičnost se javlja pri koncentraciji od 200-500 mg/kgu suhoj tvari lista. Cink se usvaja aktivno i kod njegovog usvajanja antagonistički djeluju veće količine kalcija i magnezija.

Nedostatak cinka u ljudskoj ishrani uočen je od 1960. godine. Neki od simptoma nedostatka su hipogonadizam, patuljast rast, anemija i geofagija (Singh, 2009.). Današnja poljoprivredna proizvodnja diljem svijeta ne osigurava dovoljno mikronutrijenata u hrani. Osim za biljke i u tlu, nedostatak cinka jedan je od najrasprostranjenijih deficita i u ljudskoj prehrani (Welch, 2008.). Vjeruje se da 50% tala koja se koriste u poljoprivredi ima nizak sadržaj cinka dostupnog biljkama (Graham i Welch, 1996.). Niska opskrbljenost cinkom dostupnim biljkama utvrđena je u semiaridnom području Indije, rižinim poljima Pakistana, slabo dreniranim alkalnim rižinim poljima Kine i jako alkaliziranim tlima s niskim sadržajem organske tvari u centralnoj Anatoliji u Turskoj (Sadeghzadeh, 2013.). U Australiji se nizak sadržaj cinka dostupnog biljkama nalazi u Južnoj Australiji, Viktoriji, Queenslandu, Novom Južnom Welsu i Zapadnoj Australiji. Sjeverozapadna Australija je najveća regija s deficitom cinka na svijetu (Sadeghzadeh, 2013.). Nedostatak u poljoprivrednoj proizvodnji ovisi o tipu tla, genotipu usjeva i agroekološkoj situaciji. Tijekom posljednje provjere agroklimatskog područja Indije, 40% tala bilo je deficitarno s

cinkom. Vrijednosti nedostatka su varirale od minimalnih 7,4% u Jammu i Kashmiru do visokih 65,9% u Madhya Pradeshu.

Raspoloživost cinka biljkama ovisi o njegovoj ukupnoj koncentraciji u tlu, ionskom obliku i interakciji s ostalim mikro i makroelementima (Li et al., 2003.). Glavni razlog nedostatka cinka je niska dostupnost (visok pH, zaslanjenost i alkaliziranost tla), velika količina dušika i fosfata te ograničenja rasta korijena uslijed zbijenosti i visoke podzemne vode (Alloway, 2004.).

Nedostatak cinka je peti po važnosti uzrok obolijevanja i smrtnosti diljem svijeta (Das i Green, 2016.). Gotovo polovica poljoprivrednih tala je u deficitu biljkama raspoloživog cinka što dovodi do smanjenja prinosa i nutritivne vrijednosti proizvoda (Shukla i Behera, 2012.). Zrno žitarica sadrži vrlo niske koncentracije cinka, a uzgoj na tlima siromašnim cinkom samo pospješuje deficit toga elementa u zrnu.

Kod ljudi cink je značajan za DNA, sintezu proteina, djeljenje stanica i rast, reprodukciju, neurološku funkciju, jačanje imuniteta i otpornost na infekcije. Nedostatak uzrokuje gubitak apetita, promjene na koži, poremećaj rasta, imunološke abnormalnosti, seksualnu nezrelost, rane koje sporo zarastaju, slabost, sterilnost, otežan porođaj, malformacije fetusa, hipogonadizam, patuljastost, suboptimalan rast, oštećenje okusa kod dojenčadi i djece, narušavanje stabilnosti i izdržljivosti staničnih membrana itd. Kod dulje izloženosti nedostatku dolazi do opadanja kose, dijabetesa, ciroze jetre i neplodnosti.

Nedostatak cinka kod dojenčadi i djece do 5 godina zahtjeva posebnu pažnju. Cink se koristi u prehrani djece u obliku cink acetata, cink klorida, cink laktata, cink sulfata, cink oksida i cink glukonata.

Cink se koristi i u pospješivanju liječenja od nekih bolesti kao što su liječenje suhe kože i kose, osteoporoza, jačanje kostiju, bolesti jetre, sprječavanje spontanog pobačaja, poticanje rasta, razvoj spermatozoida i povećavanje potencije.

Dnevni unos cinka kreće se od 5-14 mg kod djece, a 14-19 mg za odrasle osobe (Hadžić, 2013.). Unos cinka treba biti povećan uslijed stresa, gubitka mase, oštećenja jetre, nakon operativnih zahvata, dijabetesa, bolesti bubrega ili intenzivnog bavljenja sportom (Hadžić, 2013.). Većina cinka prisutna je u mišićima, kostima, jetri, bubrezima, prostati i mozgu (Prasad et al., 2014.).

Oko 2 milijarde ljudi izloženo je deficitu cinka (Das i Green, 2013.). Također 60-70% populacije Azije i subsaharskog dijela Afrike ugroženo je zbog preniskog unosa cinka

(Prasad, 2006.). Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) izvijestila je da 900 tisuća ljudi godišnje umre zbog nedostatka cinka, od čega su 450 tisuća djeca mlađa od 5 godina (UNICEF, 2012.). Prema izvještaju WHO (2002.), nedostatak cinka je na petom mjestu vodećih uzroka bolesti i oboljenja u zemljama niskih prihoda. U Indiji je nedostatak cinka uzrok invalidnosti 2,8 milijuna ljudi (Stain i sur., 2007., Prasad i sur., 2014.). Kukuruz, pšenica i riža pokrivaju 80% prehrane ljudi u Indiji, a te biljke su siromašne cinkom (15-30mg/kg) i željezom (10-15mg/kg) u usporedbi s nutricionistički preporučenom koncentracijom od 40-60 mg/kg Zn i 20-25 mg/kg (Cakmak, 2004.).

Kod životinja simptomi nedostatka cinka su dermatitis parakeratoza, gubitak dlake, problemi sa zglobovima, deformacija udova, smanjen rast, problemi u reprodukciji i natečene noge (McDowell, 2003., Prasad i sur., 2014., Rahal i Shivay, 2016.). Istraživanjem koje su proveli Antunović i sur. (2001.) utvrđeno je da se razina cinka u svježem mlijeku povećava vremenom laktacije od drugog do šezdesetog dana, dok je količina kadmija u istom razdoblju varirala.

Cink se u velikim količinama taloži u korijenu biljke prilikom obilne gnojidbe putem tla te se sporo translocira prema ostalim djelovima biljke (Mengel i Kirkby, 1987.), a u starijem lišću je vrlo slabo pokretan (Rinne i Langston, 1960.). Translokaciju cinka otežavaju bakar (Bowen, 1969.), željezo i mangan (Giordano i sur., 1974.).

Biljke prinosom iznose 100-400 g/ha Zn te se folijarno često dodaju upravo navedene količine. Najznačajnija mikrognojiva cinka su cinkovi sulfati, kelati i oksid. Cinkovi sulfati su najjednostavnija vodotopiva cinkova gnojiva ($\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ s 23% Zn, $\text{ZnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ s 36% Zn i alkalni cinkov sulfat $\text{ZnSO}_4 \times 4\text{Zn}(\text{OH})_2$ s 55% Zn). Primjejuju se folijarno u koncentracijama od 0,2% u hortikulturi do 0,5% pri uzgoju žitarica. Međutim, cinkov sulfat često izaziva kloroze pa je optimalnije koristiti alkalni cinkov sulfat. Kelati Zn (npr. Zn-EDTA s 1% Zn) prikladniji su za folijarnu primjenu od cinkovih sulfata, ali su i manje učinkoviti po pitanju biofortifikacije odnosno akumulacije Zn u sjemenu (Lončarić, 2015.). Cinkov oksid (ZnO sa 70% Zn) nije topiv u vodi te se najčešće koristi dodavanjem u tlo (Lončarić, 2015.).

Industrijska proizvodnja cinka započelo je u 5. stoljeću u Indiji. U Europi je proizvodnja započela u 15. stoljeću, na Harzu, ali u malim količinama koje nisu bile dostatne tako da se sve do 18. stoljeća uvezio iz Indije. Do preokreta dolazi otkrićem mogućnosti destilacije cinka iz oksidnih ruda. Proizvodnja većih razmjera razvila se u

Belgiji 1805.godine, a 1837. godine osnovano je društvo Societe anonyme de Vieille Montagne koje se razvilo u jednog od najvećih proizvođača cinka na svijetu (Supek, 1977.)

Rude s najznačajnijim koncentracijama cinka su:

- ZnS s teorijski 67,1% Zn (praktično 30-35%), vrlo rijedak u prirodi,
- ZnCO₃ s teorijski 52,1% Zn (praktično samo 3%),
- Zn₂SiO₄ × H₂O s teorijski 54,3% Zn, vrlo važna cinkova ruda slabo opterećena ostalim lako hlapivim metalima, pa se dobiva vrlo čist Zn.

Kadmij je toksičan element bez korisnog i esencijalnog učinka. Najčešće se nalazi u kombinaciji s cinkom, visokih je koncentracije u pelitima i škriljcima te u rudama olova. Najveće količine kadmija dobivaju se preradom cinkovih ruda u talionicama cinka. Plavičasto je bijele boje, niskog tališta (321°C), pri zagrijavanju postaje krhak i može se smrviti u prah. U tlu ga ima prosječno 0,2-0,5 mg/kg. Nešto veće količine Cd javljaju se u karbonatnim tlima u odnosu na kisela tla. Pored visoke toksičnosti, karakterističan je i po najvećem udjelu raspoloživih frakcija jer je oko 30,8% ukupnog Cd u tlu u raspoloživom obliku. Raspon raspoloživosti kadmija u kiselim tlima je 17-65%, odnosno dvije trećine ukupnog, dok je na karbonatnim tlima dostupna maksimalno polovina ukupnih koncentracija kadmija (13-51%).

Tablica 3.Sadržaj Cd u sedimentnim fosfatnim stijenkama (Van Kauwenbeergh, 1997.)

Država	Lokalitet	Cd (mg/kg)
Alžir	Djebel Onk	13
Kina	Kaiyang	>2
Senegal	Taiba	87
Tanzanija	Minjingu	1
Togo	Hohotoe	48
Indija	Mussoorie	8
Jordan	El Hassa	4
Maroko	Khouribga	3
Peru	Sechura	11
SAD	Florida	6
SAD	N. Carolina	33

Antropogeni izvor zagađenja kadmijem su industrijski i komunalni otpad, fosfatna gnojiva (koncentracije ovise o podrijetlu fosfata, tablica 3), kanalizacijski mulj, atmosferska depozicija, rude i taljenje cinka. Od fosfatnih gnojiva po pitanju unosa Cd najštetnija su gnojiva iz Senegala, a utvrđen je vrlo velik raspon koncentracija Cd s obzirom na podrijetlo fosfata. Fosfati podrijetlom iz Australije sadrže 0,5 mg/kg Cd, a oni iz SAD-a i do 150 mg/kg. Fosfatima iz Tanzanije unosi se najmanje Cd, ali su s ekološkog gledišta najpogodniji fosfati iz Kine jer sadrže i niske koncentracije ostalih toksičnih elemenata (Cr, Hg, V).

Tla u Osječko-baranjskoj županiji nisu onečišćena kadmijem. Prema istraživanju Lončarić i sur. (2014.) Cd je u 60% analiziranih tala bio na razini 25-50% MDK, a u svim su analizirana oraničnim tlima koncentracije Cd bile manje od MDK.

Tablica 4. Koncentracije Zn i Cd (mg/kg) u listu, stabljici i zrnu soje (Varga, 2010.)

Djelovi biljke soje	Zn mg/kg	Cd mg/kg
List	44,1	0,156
Stabljika	8,6	0,251
Zrno	40,5	0,141

U istraživanjima s različitim gnojivima fosforom, utvrđeno je da je podjednaka koncentracija Zn u zrnui listu soje, dok je u stabljici vrlo niska. Istovremeno, najveće koncentracije Cd utvrđene su u stabljici (Varga, 2010.)

Tablica 5. Maksimalno dozvoljene koncentracije cinka u namirnicama (Hadžić, 2013.)

Namirnica	MDK (mg/kg ili mg/L)
Proizvodi od mesa goveda, ovaca, svinja, peradi	100,0
Sok od voća i povrća, koncentrirani sok, voćni sirup	5,0
Voće i proizvodi od voća	20,0
Alkohol	2,0
Samonikle i uzgojene gljive	50,0
Likeri	2,0
Med	10,0
Ocat	5,0
Rakija i žestoka pića	0,5
Vino	5,0

U tablicama 5 i 6 navedene su maksimalno dozvoljene koncentracije cinka i kadmija prema Pravilniku o toksinima, metalima, metaloidima te drugim štetnim tvarima koje se mogu nalaziti u hrani (Narodne novine, broj 117/03, 130/03 i 48/04).

Tablica 6. Maksimalno dozvoljene koncentracije kadmija u namirnicama (Hadžić 2013.)

Namirnica	MDK (mg/kg ili mg/L)
Žitarice	0,1
Klice, pšenična zrna, riža	0,2
Soja	0,2
Voće	0,05
Lisnato povrće	0,2
Korjenasto povrće	0,1
Špinat	0,8
Sušeno voće	0,1
Sušeno povrće	0,5
Samonikle svježe gljive	1,0
Samonikle suhe gljive	5,0
Sokovi od voća i povrća	0,03
Sjemenke uljarica	0,5
Mak i sezam	0,8
Vino	0,01
Proizvodi od žitarica	0,1
Dječja hrana za dojenčad i malu djecu na bazi voća, povrća i žitarica	0,03

Cilj biofortifikacije je povećanje nutritivne vrijednosti usjeva, što se postiže suradnjom agronoma, genetičara i oplemenjivača. Bioortifikacijski uzgoj usjeva omogućuje poboljšanje prehrane u dalekim ruralnim područjima (Nestel et al., 2006.). Sjeme bogato mikrohranivima pokazuje toleranciju na abiotski stres, visoke prinose na tlima siromašnim mikrohranivima i veću otpornost na štetnike i bolesti. Genetska biofortifikacija je dugotrajan proces koji zahtjeva značajne resurse (White i Broadley, 2009.). Novootkriveni genotipovi trebaju imati sposobnost usvojiti iz tla u deficitu dovoljne količine mikronutrijenata i akumulirati ih u dovoljnoj količini za ljudsku

prehranu. Zbog velike varijacije genotipova prema nedostatku Zn (Cakmak et al., 1998.), potrebno je za uzgoj izabrati genotipove s većim prinosom i većom koncentracijom cinka.

Agronomska biofortifikacija je jednostavniji, kratkoročniji i povoljniji pristup poboljšanju nego genetska biofortifikacija. Provodi se dodavanjem mikrohraniva različitim metodama fertilizacije u različitim fazama razvoja usjeva (Cakmak, 2012.). Dodavanjem cinka u tlo i folijarno postižu su najbolji rezultati, što je učinkovitije od pojedinačnih metoda. Kod biofortifikacije cinkom i željezom važno je da su i genotipovi učinkoviti. Različiti genotipovi razlikuju se po toleranciji na deficit cinka u tlu, te mogućnosti usvajanja i iskorištenja cinka. Graham i Rengel (1993.) pretpostavljaju da genotipovi imaju različite mehanizme učinkovitosti, da je više mehanizama odgovorno za razinu učinkovitosti određenog genotipa, te da je efikasnost genotipa povezana s otpornošću na stres. Uzgoj cinkom obogaćenih kultivara na siromašnim tlima predstavlja novu strategiju u kojoj na određeni način biljka hrani tlo (Foy, 1983.).

Obogaćivanje sjemena soje cinkom pomaže neutralizaciji deficita cinka u ljudskoj prehrani. Biofortifikacijom soje s ZnSO_4 u koncentraciji od 10 i 20 $\mu\text{g/mL Zn}$, znatno je povećan sadržaj cinka (102 i 163 u odnosu na 32 mg/kg ST), bioraspoloživog cinka (3,8 i 8,5 u odnosu na 1,1 mg/kg ST) i bioraspoloživog cinka u jestivim djelovima (3,8% i 5,2% u odnosu na 3,5%) u usporedbi s biljkama uzgajanim na običnoj vodenoj podlozi. Također, nisu uočene značajnije promjene u koncentracijama Fe, Cu i Mn (Tao Zou et al., 2014.).

Soja se uzgaja za proizvodnju sjemena i vegetativne mase, a koristi se u ljudskoj i životinjskoj ishrani. Posljednjih godina upotrebljava se i u medicinske svrhe za proizvodnju nekih lijekova.

Sjeme soje odlikuje se velikim postotkom bjelančevina, ali ima i dosta ulja pa se ova biljka ubraja u bjelančevinasto-uljane biljke. Ovisno o sorti i uvjetima uzgoja ima 37-44% bjelančevina i 17-23% ulja. U porodici leguminoza samo lupine imaju veći sadržaj bjelančevina od soje. Bjelančevine soje imaju i veliku fiziološku vrijednost, jer se lako otapaju u vodi. Za usporedbu navodimo da frakcija bjelančevina otopljenih u vodi kod soje iznosi 72-95% ukupne količine dok je kod graha i graška 62-95%, odnosno 36-87%. Sjeme soje bogato je vitaminima, osobito provitaminom A i vitaminima B₁ i B₂. U manjim količinama sadrži i vitamine C, D, E i K. Vitamini su u većim količinama koncentrirani u lišću, zelenim mahunama i klicama. Sojina pogača sadrži 43 % bjelančevina, sadrži aminokiseline vrlo značajne u proizvodnji stočne hrane kao npr. lizin (2,6%), triptofan

(0,53%) i metionin (0,79%). Izvor je i izoflavona, saponina, fitinske kiseline i fitosterola, aktivnih sastojaka funkcionalne hrane koja osim nutritivne vrijednosti ima i pozitivan utjecaj na opće zdravlje ljudi te preventivno smanjuje rizik od razvoja nekih bolesti (npr. rak, kardiovaskularni problemi i osteoporoza). Najvažnija svojstva kvalitete zrna soje očituju se u količini bjelančevina i ulja, sastavu i količini masnih kiselina u ulju, te izoflavona.

Najveća proizvodnja soje u 20. stoljeću ostvarena je u Sjevernoj i Centralnoj Americi (65,1 % ukupne svjetske proizvodnje) te Aziji (31,5 % ukupne svjetske proizvodnje).

Soja se u Republici Hrvatskoj uzgaja od 1910. godine. Prvi zabilježeni podaci o uzgoju su s područja Osijeka, a vjeruje se da je donesena iz Austrije. U Republici Hrvatskoj je 2016. godine proizvedeno 244.075 t soje uzgojem na 78.614 ha uz prosječan prinos 3,1 t/ha (DZS RH, 2017.).

Sorata soje ima oko 10 tisuća, a dijele se prema dužini vegetacije i prema namjeni. Prema dužini vegetacije razlikujemo rane (100-120 dana), srednje (120-130 dana) i kasne (više od 130 dana) sorte. Prema namjeni dijele se na sjemenske, merkantilne i kombinirane. Za proizvodnju sjemena, odnosno ulja i brašna, biraju se sorte žutog sjemena. Za stočnu hranidbu biramo sorte visokog prinosa i nježnije stabljike, bogate lišćem i sitnijim sjemenom te visokim sadržajem bjelančevina. Kombinirane sorte trebaju zadovoljavati obje grupe navedenih uvjeta.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Lokalitet poljskog pokusa i analize tla

Poljski pokus u ovome istraživanju agrofortifikacije soje cinkom proveden je na području grada Osijek u Osječko-baranjskoj županiji, na proizvodnim površinama Poljoprivrednog instituta Osijek.

Primarna svrha uzorkovanja i agrokemijskih analiza tla je utvrditi prosječnu raspoloživost hraniva i ostalih svojstava tla (pH, sadržaj organske tvari, raspoloživost hraniva). Uzorak tla određujemo izborom mjesta uzorkovanja i dubinom uzorkovanja. Uzorkovanje ne treba provoditi ako nije proteklo više od 60 dana od kalcizacije ili gnojidbe, ako je tlo presuho odnosno zbijeno, te ako je saturirano vodom, blatno i ljepljivo. Iako ne postoji univerzalni način izbora mjesta i rasporeda uzimanja uzoraka, važno je istaknuti da agrokemijskom analizom i interpretacijom rezultata ne možemo neutralizirati eventualne pogreške pri uzorkovanju.

Za potrebe ovoga istraživanje uzorci tla su prikupljeni agrokemijskom sondom u oraničnom sloju (dubina 0-30cm) proizvodne površine, a zatim osušeni, samljeveni, prosijani i pripremljeni za daljnje analize.

3.1.1. pH tla (*Reakcija tla*)

pH tla je među najčešćim i najvažnijim podacima u standardnoj analizi tla (tablica 7). O pH vrijednosti ovise mnoga kemijska, biološka i fizikalna svojstva tla. pH vrijednost predstavlja negativan dekadski logaritam koncentracije H^+ iona u suspenziji tla u vodi ili otopini soli, te je indikator kiselosti ili bazičnosti tla. Određuje se elektrometrijskim mjerenjem pH-metrom (slika 1). Aktualna kiselost određena je u suspenziji tla s deioniziranim vodom, a ovisi o prisutnosti slobodnih iona (H^+ , Al^{3+} i OH^-). Supstitucijska (izmjenjiva) kiselost određuje se u 1M KCl otopini (ISO, 1994.). pH vrijednost koja izražava supstitucijsku kiselost je uvijek niža od aktualne, što je primarno uzrokovano djelovanjem električnog naboja koloidnih čestica tla na mobilnosti K^+ i Cl^- .



Slika 1. Mjerenje pH vrijednosti tla (Foto: *Dejana Kraljević*)

Metoda određivanja pH vrijednosti provodi se prelijevanjem 10 g zrakosuhog tla s 25 ml deionizirane vode, odnosno s 25ml 1M KCl otopine u laboratorijskoj čaši od 100 ml (ISO, 1994.). Zatim se promiješa staklenim štapićem i ostavi stajati 20–30 minuta uz povremeno miješanje. Nakon toga se mjeri na pH-metru koji je prethodno kalibriran pufernim otopinama pH 4, pH 7 i pH 10.

Tablica 7. Ocjena reakcije tla (Soil Survey Manual, 1993.)

pH-vrijednost	Reakcija tla
<3,5	Ultra kisela
3,5-4,4	Ekstremno kisela
4,5-5,0	Vrlo jako kisela
5,1-5,5	Jako kisela
5,6-6,0	Umjereno kisela
6,1-6,5	Slabo kisela
6,6-7,3	Neutralna
7,4-7,8	Slabo alkalna
7,9-8,4	Umjereno alkalna
8,5-9,0	Jako alkalna
>9,1	Vrlo jako alkalna

3.1.2. Sadržaj organske tvari u tlu

Organska tvar u tlu je biljnog i životinjskog podrijetla. Količina organske tvari u tlu i njena kakvoća utječu na kvalitetu tla i mogućnost rasta biljaka. Organske tvari je u tlu znatno manje (najčešće 1-10 %) nego mineralne, ali je vrlo značajna. Utječe na fizička i kemijska svojstva tla. Organska se tvar, u odnosu na mineralnu, brže i više transformira, a

agrotehničke mjere dodatno pospješuju procese transformacije organske tvari. Ukupna organska tvar se dijeli na živu i mrtvu organsku tvar. Živa organska tvar je flora i fauna koja obitava u tlu. Mrtvu tvar čine biljni i životinjski ostaci uginulih organizama različitih stupnjeva razgrađenosti, stabilnosti i humificiranosti.

Sadržaj organske tvari u tlu određuje se suhim ili mokrim spaljivanjem. Mokro spaljivanje organske tvari provodi se pomoću otopine kalijevog bikromata tzv. bikromatnom metodom (ISO, 1998.). Pri tome se odvija sljedeća reakcija:



Koncentracija organskog ugljika, nakon spaljivanja, određuje se spektrofotometrijski budući da se narančasta boja otopine (prisustvo Cr^{6+}) mijenja u zelenu boju (prisustvo Cr^{3+}). Dobivena količina ukupnog ugljika u uzorku preračuna se najprije u postotni udio C, a zatim na postotak humusa u uzorku. Na temelju količine humusa ocjenjujemo humoznost tla (tablica 8).

Tablica 8. Humoznost tala (Muckenhausen, 1975.)

% humusa u P horizontu	Humoznost tla
< 1 %	Vrlo slabo humozna tla
1-2 %	Slabo humozna tla
2-4 %	Srednje humozna tla
4-8 %	Jako humozna tla
8-15 %	Vrlo jako humozna tla
15 – 30 %	Polutresetna tla
> 30 %	Tresetna tla

Organska tvar tla podliježe ispiranju pretežno u kiselim uvjetima. Topive organske tvari mogu s metalima (Fe, Mn, Al) stvarati komplekse kao helate. U alkalnoj sredini moguće je samo ispiranje organske tvari u obliku natrijevih humata.

3.1.3. Koncentracija raspoloživog fosfora i kalija ekstrahiranog AL-metodom

U kontroli plodnosti tala u Republici Hrvatskoj koristi se AL-metoda po Egnér-Riehm-Domingu (Egmer i sur., 1960.) kojom se za potrebe optimizacije gnojidbe utvrđuju raspoložive frakcije fosfora i kalija. AL-metoda se temelji na ekstrakciji fosfora i kalija iz tla pufernom otopinom amonijevog laktata čiji je pH 3,75.

Biljkama raspoložive količine kalija određuju se nakon ekstrakcije izravno iz ekstrakta tla emisijom na atomskom apsorpcijskom spektrofotometru (AAS-u). Izražavaju se u mg K₂O na 100 g tla. Oblici fosfora koji u tlu prelaze u različite otopine slabih kiselina, soli ili baza (pufera) te su biljkama tako raspoloživi određuju se kolorimetrijskom plavom metodom. Koncentracija se mjeri spektrofotometrijski i izražava se u mg P₂O₅ na 100 g tla.

Utvrđivanje potrebe u gnojidbi podrazumijeva poznavanje graničnih vrijednosti fosfora i kalija (tablica 9).

Tablica 9. Granične vrijednosti AL-P₂O₅ i AL-K₂O za ratarske usjeve na području istočne Hrvatske (Vukadinović i Vukadinović, 2011.)

Razred raspoloživosti	AL-P ₂ O ₅ mg 100 g ⁻¹		AL-K ₂ O mg 100 g ⁻¹ tla		
	pH < 6	pH > 6	lako	srednje	teško
(A) jako siromašno	< 5	< 8	< 8	< 12	< 15
(B) siromašno	5 - 12	8 - 16	9 - 15	13 - 19	16 - 24
(C) dobro	13 - 20	17 - 25	16 - 25	20 - 30	25 - 35
(D) visoko	21 - 30	26 - 45	26 - 35	30 - 45	36 - 60
(E) ekstremno visoko	> 30	> 45	> 35	> 45	> 60

3.1.4. Određivanje sadržaja karbonata u tlu

U tlu se uglavnom nalaze karbonati kalcija (CaCO₃) i magnezija (MgCO₃), a u halomorfnim tlima i karbonati natrija (Na₂CO₃). Utvrđivanje kalcij karbonata zasniva se na njegovoj reakciji s klorovodičnom kiselinom pri čemu se oslobađa CO₂.



Sadržaj karbonata u tlu određuje se volumetrijskom metodom standardiziranim postupkom (ISO, 1995.a). Metoda se zasniva na mjerenju volumena oslobođenog

ugljkovog dioksida (CO_2) nakon prelijevanja tla s 10%-tnom klorovodičnom kiselinom (HCl). Volumen nastalog CO_2 mjeri se pri atmosferskom tlaku i sobnoj temperaturi Scheiblerovim kalcimetrom (slika 2). Sadržaj karbonata izražava se kao % CaCO_3 (ISO, 1995.a).



Slika 2. Scheiblerov kalcimetar (www.ziglass.rs)

3.1.5. *Određivanje ukupnih i biljkama raspoloživih koncentracija Zn i Cd u tlu*

Ukupne koncentracije mikroelemenata u tlu, određuju se različitim postupcima potpunog ili djelomičnog razaranja tla fluorovodičnom kiselinom, nitratnom kiselinom i zlatotopkom (smjesa HNO_3 i HCl u omjeru 1:3). U ovome istraživanju uzorci su razarani zlatotopkom te su izmjerene koncentracije nešto manje od ukupnih u tlu koje bi se ekstrahirale fluorovodičnom kiselinom. Ipak, u opisu rezultata korišten je izraz „ukupne koncentracije“, bez obzira na moguće razlike između ekstrakcija zlatotopkom i fluorovodičnom kiselinom. Upotrebom korištene metode (ISO, 1995.b) uzorak tla se prenosi u teflonsku kivetu, prelijeva s 12 ml svježe pripremljene zlatotopke te razara u mikrovalnoj pećnici na propisanoj temperaturi. Nakon razaranja filtrira se u odmjerne tikvice od 100 ml i nadopuni destiliranom vodom do mjerne oznake. Koncentracije cinka i kadmija (izražene u mg/kg tla) izmjerene su izravno u ekstraktima tla tehnikom optičke emisijske spektrometrije na induktivno spregnutoj plazmi (ICP-OES).

Biljkama raspoložive količine mikroelemenata u tlu utvrđuju se različitim ekstrakcijskim otopinama (EDTA, DTPA, AA-EDTA, HCl , voda). Za određivanje raspoložive koncentracije Zn u tlu u ovom istraživanju korištena je otopina EDTA (otopina etilendiamintetraoctene kiseline) (Trierweiler i Lindsay, 1969.) Ekstrakcijska metoda s EDTA najčešće je korištena u Republici Hrvatskoj. Temelji se na ionoizmjenjivačkoj

reakciji s tlom gdje NH_4^+ zamjenjuje lakopristupačne mikroelemente na adsorpcijskom kompleksu tla, dok EDTA gradi stabilne komplekse s mikroelementima iz otopine.

Odvaže se 10 g zrakosuhog uzorka u plastičnu bočicu volumena 200 ml te se prelije s 20 ml EDTA otopine (smjesa 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ i 0,01 M EDTA čija je pH vrijednost pripremljena pomoću HCl ili NH_4OH na 8,6). Nakon 30 minuta mućkanja na rotacijskoj mućkalici uzorci se filtriraju kroz filter papir “plava traka” u epruvete. U ekstraktu se izravno mjeri koncentracija Zn (izražena u mg/kg tla) pomoću ICP-OES uređaja.

3.2. Izbor sorata i uzgoj soje

Poljski pokus u ovome istraživanju agrofortifikacije soje cinkom proveden je na području grada Osijek u Osječko-baranjskoj županiji, na proizvodnim površinama Poljoprivrednog instituta Osijek.

U travnju (28. travnja 2017.) je posijano 6 sorata soje na parcelu od 12,5 m² (2,5 x 5 m) u 5 redova po parceli s međurednim razmakom 0,5 m. Tretmani pokusa postavljeni su u 4 ponavljanja (4 parcele).

Za sjetvu je izabrano šest sorata soje Poljoprivrednog instituta Osijek različitih grupa zriobe (tablica 10).

Tablica 10. Grupe zrioba izabranih sorata soje

	IKA	KORANA	TOMA	SANDA	LUCIJA
Grupa dozrijevanja	0-I	00	00	00	00
Tolerantnost na polijeganje	vrlo visoka	vrlo visoka	vrlo visoka	vrlo visoka	vrlo visoka
Tolerantnost na bolesti	vrlo visoka	prihvatljiva	prihvatljiva	prihvatljiva	prihvatljiva
Adaptabilnost	široka	široka	široka	široka	široka
Vrijeme sjetve	IV.	kraj IV. – sredina V.	IV. – V.	kraj IV. – sredina V.	IV.-VI.
Norma sjetve (kg/ ha)	100 – 120	120 – 135	120 – 135	120 – 135	120 – 145
Preporučeni sklop (000 biljaka/ha)	580 – 600	600 – 650	600 – 650	600 – 650	600 – 700
Potencijal rodosti (t/ha)	>5	>4	>4	>4	>4
Sadržaj bjelančevina (%)	39-41	40 – 42	40 – 42	40 – 42	do 42
Sadržaj ulja (%)	20-22	21-23	20-22	21-23	21-23

3.3. Agronomska biofortifikacija soje cinkom

U pokusu biofortifikacije soje postavljena su dva tretmana:

1. kontrola bez aplikacije cinka
2. aplikacija cinka (2kg/haZn).

Oba su tretmana postavljena u četiri ponavljanja, tj. na četiri parcelice. Agronomska biofortifikacija soje provedena je folijarnom aplikacijom cinka (Zn) u fenofazi cvatnje soje (14. srpnja 2017.) u količini 2kg/haZn. Cink je apliciran leđnom prskalicom otopinom cink sulfata ($5,489 \text{ kg/haZnSeO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$).

3.4. Uzorkovanje i analiza biljnog materijala

Uzorkovanje biljnog materijala (stabljika, mahuna i zrno soje) sa svih je parcela obavljeno u vrijeme žetve. U žetvi je izmjeren ukupan prinos zrna soje na svim parcelama pokusa i izražen u kg/ha uz 13 % vlage zrna.

Pojedinačni uzorci zrna, mahuna i stabljike osušeni su u sušioniku do konstantne mase i zatim samljeveni u posebnom mlinu za meljavu bez rezidua teških metala te razoreni mokrim postupkom mikrovalnom tehnikom. Suhi uzorak biljne tvari (0,5g) odvagao je u teflonsku posudu i prelijevan s 9 ml 65% HNO_3 i 2 ml 30% H_2O_2 . Nakon postupka digestije otopina je profiltrirana u polipropilensku kivetu (volumen 50ml) za automatsko očitavanje uz nadopunjavanje deioniziranom vodom do oznake. Koncentracije cinka i kadmija izravno su u otopini izmjerene ICP-OES tehnikom te preračunate u mg/kg suhe tvari.

3.5. Statistička obrada podataka

Statistička obrada rezultata prinosa zrna soje te koncentracija cinka i kadmija u stabljici, mahunama i zrnu soje obavljena je softverskim paketima SAS for Windows 9.1.3. (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

Pri statističkoj obradi korištena je analiza varijance (ANOVA) uz test najmanje značajne razlike (LSD).

4. REZULTATI

4.1. Osnovna agrokemijska svojstva tla i koncentracije cinka u tlu

Za utvrđivanje potrebnih agrotehničkih mjera u uzgoju soje korišteni su rezultati analiza osnovnih agrokemijskih svojstava tla (tablica 11).

Tablica 11. Osnovna kemijska svojstva oraničnog sloja tla na pokusnim površinama

pH _{H2O}	pH _{KCl}	AL-P ₂ O ₅ mg/100 g	AL-K ₂ O mg/100 g	organska tvar (%)	CaCO ₃ (%)	Zn mg/kg	Zn _{EDTA} mg/kg
8,38	7,39	37,43	30,60	1,79	2,49	64,13	2,91

Aktualna (pH_{H2O}) i izmjenjiva (pH_{KCl}) reakcija tla ukazuju na slabo do umjereno alkalnu reakciju tla. Prema količini karbonata (2,49 % CaCO₃), tlo se svrstava u tla slabe karbonatnosti (Soil Survey Manual, 1993.).

Također, tlo se prema sadržaj organske tvari (1,79 %) svrstava u tla slabe humoznosti (Muckenhausen, 1975.).

Opskrbljenost tla biljkama raspoloživim fosforom i kalijem je visoka i tlo se ubraja u klasu tala visoke opskrbljenosti (D) fosforom i kalijem (Lončarić i Karalić, 2015.).

U tlu je utvrđeno 64,13 mg/kg ukupnog Zn, što znači da je u tlu manja koncentracija cinka od maksimalno dopuštenih koncentracija u poljoprivrednim tlima propisanih Pravilnikom o zaštiti poljoprivrednog zemljišta od onečišćenja (Narodne Novine, 2014.). Također, utvrđene biljkama raspoložive koncentracije Zn (2,91 mg/kg) su u razini srednje opskrbljenosti (Vukadinović i Bertić, 1989.), ali vrlo blizu granice visoke opskrbljenosti (granica 3 mg/kg), što upućuje da tijekom uzgoja soje ne bi trebalo biti nedostataka raspoloživog Zn.

4.2. Prinosi soje

Ostvaren je prosječan prinos zrna soje 3.466,5 kg/ha. Iako je utvrđen nešto veći prinos zrna soje nakon aplikacije cinka (tablica 12) u odnosu na kontrolni tretman, razlike nisu bile statistički značajne (P=0,1656).

Tablica 12. Utjecaj agronomske fortifikacije cinkom na prinos zrna soje (kg/ha, 13 % vlage)

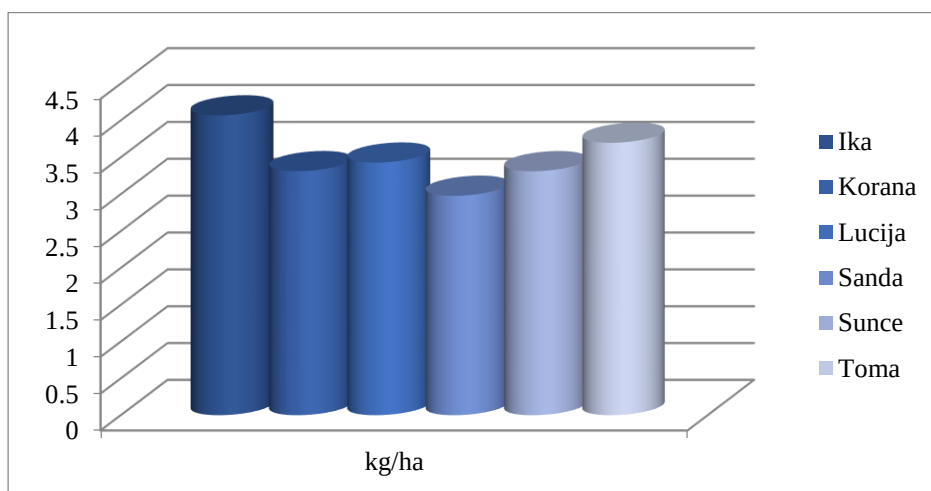
Tretman	Prinos (kg/ha)
Kontrola	3.339,7
Aplikacija cinka	3.593,3
Prosjek	3.466,5

Utvrđena je statistički značajna ($P=0,0021$) razlika prinosa zrna između sorata soje (tablica 13 i grafikon 1). Najmanji je prinos ostavila sorta Sanda (2.979 kg/ha), a najveći sorta Ika (4.069 kg/ha).

Tablica 13. Utjecaj sorte na prinos zrna soje (kg/ha, 13 % vlage)

Sorta	kg/ha
Ika	4.069 a
Korana	3.313bc
Lucija	3.429bc
Sanda	2.979c
Sunce	3.312 bc
Toma	3.697ab
LSD _{0,05}	457,25

a, b, c Između sorata koje sadrže istu slovnu oznaku nisu utvrđene statistički značajne razlike.



Grafikon 1. Prinosi sorata soje

4.3. Koncentracije cinka (Zn) i kadmija (Cd) u stabljici, mahuni i zrnu soje

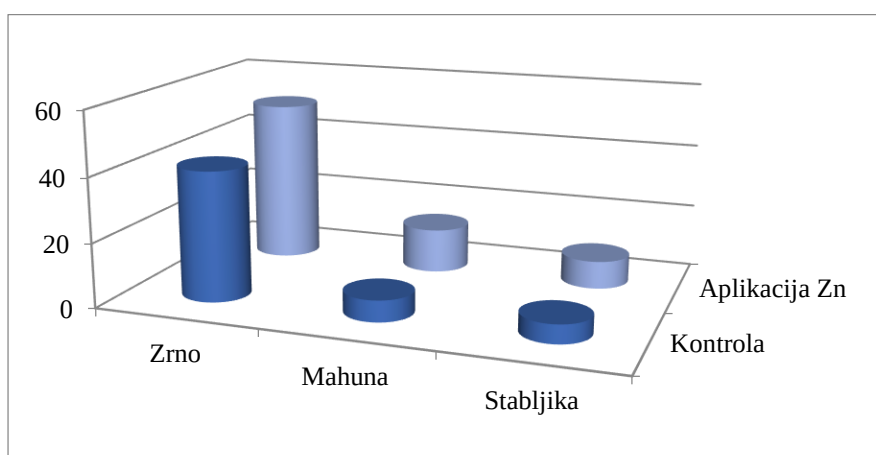
Najveća prosječna koncentracija cinka utvrđena je u zrnu (45,71 mg/kg), značajno manja u mahunama (10,26 mg/kg), a najmanja u stabljikama soje (7,28 mg/kg). Sve su navedene koncentracije cinka statistički značajno različite ($P < 0,0001$). Istovremeno, najveća je prosječna koncentracija kadmija utvrđena u zrnu (0,047 mg/kg) i stabljici (0,046 mg/kg) te nešto manja u mahunama (0,036 mg/kg), ali razlike u koncentracijama kadmija nisu bile statistički značajne.

Agronomska biofortifikacija soje folijarnom aplikacijom cinka rezultirala je statistički značajnim razlikama u koncentracijama cinka u mahunama ($P < 0,0001$), stabljici ($P = 0,0006$) i zrnu ($P < 0,0001$) soje (tablica 15). Biofortifikacija soje povećala je koncentraciju cinka u stabljici 48,56 %, u mahunama 106,21 %, a u zrnu 25,06 %. U apsolutnim je vrijednostima, međutim, najveće povećanje koncentracije cinka ostvareno u zrnu (povećanje 10,18 mg/kg), zatim u mahunama (7,12 mg/kg), a najmanje u stabljikama (2,84 mg/kg) (grafikon 2).

Tablica 14. Koncentracije Zn u mahunama, stabljici i zrnu soje (u mg/kg ST)

Tretman	Stabljika	Mahune	Zrno
Kontrola	5,86 b	6,70 b	40,62 b
Aplikacija cinka	8,70 a	13,82 a	50,80 a
LSD _{0,05}	1,47	2,86	2,41
Prosjek	7,28	10,26	45,71

^{a, b} Između tretmana koji sadrže istu slovnu oznaku nisu utvrđene statistički značajne razlike



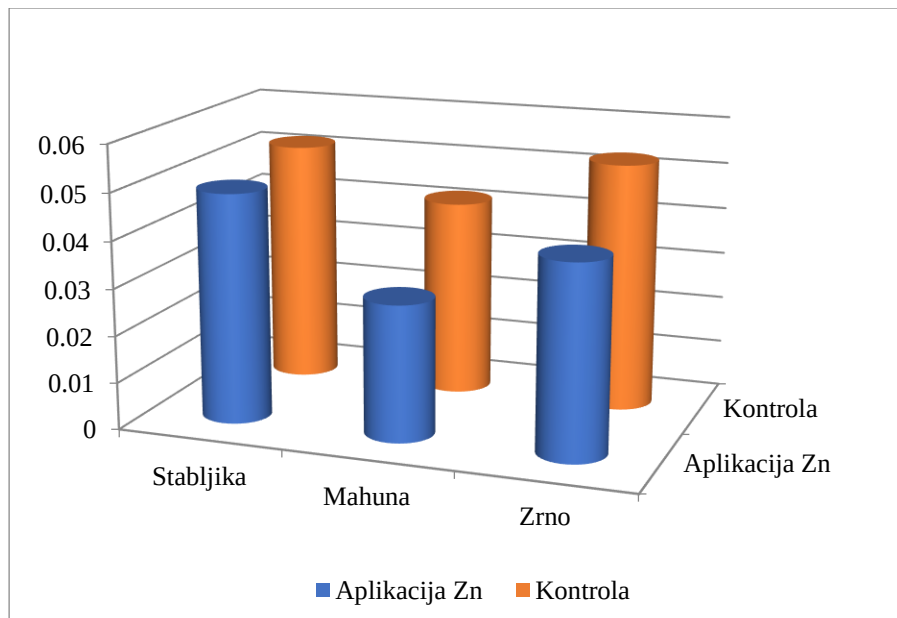
Grafikon 2. Koncentracija Zn u pojedinačnim djelovima biljke soje

Istovremeno, aplikacija cinka nije utjecala na značajne promjene koncentracija kadmija u stabljikama, mahunama i zrnu soje (tablica 15), iako je u svim nadzemnim organima soje utvrđena niža koncentracija kadmija nakon aplikacije cinka (grafikon 3), točnije, u stabljici 23,08 %, u mahunama 30,95 %, a u zrnu 22,64 % niža koncentracija kadmija.

Značajno je također napomenuti da su koncentracije kadmija vrlo niske, prosječno 4-5 puta niže od maksimalno dozvoljenih koncentracija kadmija u zrnu soje.

Tablica 15. Koncentracije Cd u mahunama, stabljici i zrnu soje (u mg/kg ST)

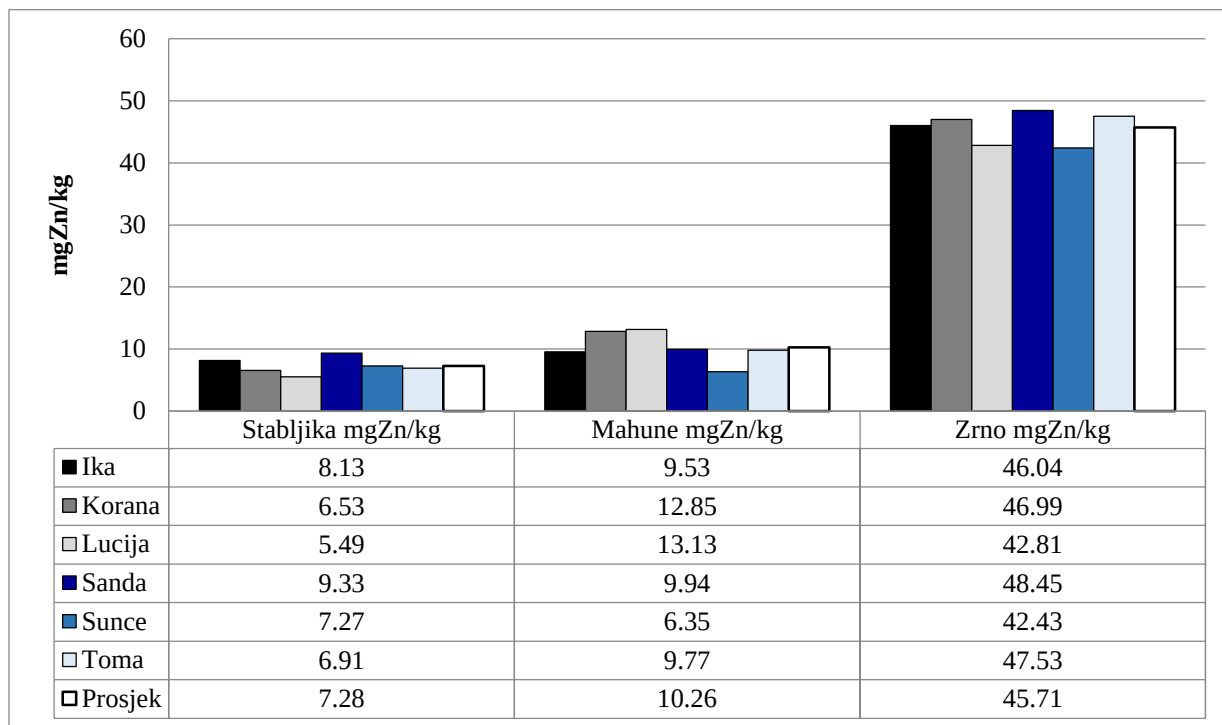
Tretman	Stabljika	Mahune	Zrno
Kontrola	0,052	0,042	0,053
Aplikacija cinka	0,040	0,029	0,041
LSD _{0,05}	-	-	-
Prosjek	0,046	0,036	0,047



Grafikon 3. Koncentracija Cd u pojedinačnim djelovima biljke soje

Iako su sorte ostvarile različite prinose, nije utvrđena statistički značajna razlika između sorata u koncentracijama cinka (grafikon 4), u stabljikama ($P=0,2095$), mahunama

($P=0,4254$) i zrnu ($P=0,3274$), iako je najveća prosječna koncentracija cinka u zrnu utvrđena u sorti Sanda (48,45 mg/kg), a najmanja u sorti Sunce (42,43 mg/kg).

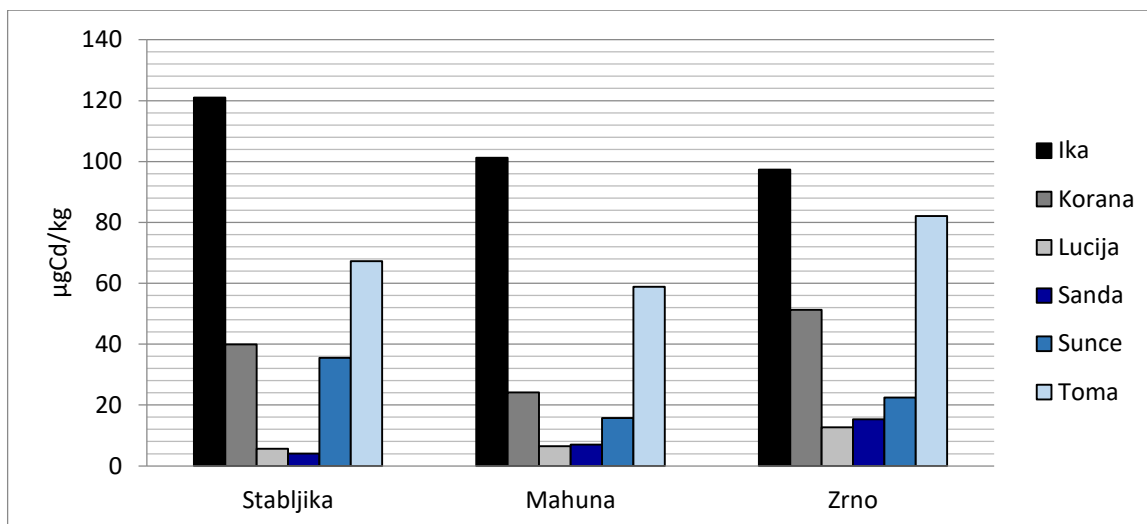


Grafikon 4. Utjecaj sorte na koncentracije cinka (mg/kg) u stabljikama, mahunama i zrnu

Međutim, utvrđene su vrlo značajne razlike između sorata u prosječnim koncentracijama kadmija u stabljikama ($P<0,0001$), mahunama ($P<0,0001$) i zrnu ($P<0,0001$) soje (tablica 16 i grafikon 5). Najveća prosječna koncentracija kadmija utvrđena je u sortama Ika (97,39 μ g/kg) i Toma (82,05 μ g/kg), a najmanja u sortama Lucija(12,70 μ g/kg), Sanda (15,26 μ g/kg) i Sunce (22,42 μ g/kg).

Tablica 16. Utjecaj sorte na koncentracije kadmija (μ g/kg) u stabljikama, mahunama i zrnu

Sorta	Stabljika	Mahune	Zrno
Ika	121,03 a	101,20 a	97,39 a
Korana	39,93 bc	24,11 c	51,29 b
Lucija	5,67 de	6,46 c	12,70 c
Sanda	4,05 e	6,96 c	15,26 c
Sunce	35,51cd	15,76 c	22,42 c
Toma	67,30b	58,84 b	82,05 a
LSD _{0,05}	30,5	26,5	16,5
Prosjek	45,6	35,6	46,8



Grafikon 5. Koncentracije kadmija ($\mu\text{g/kg}$) u stabljikama, mahunama i zrnu soje po sortama

4.4. Iznošenje cinka (Zn) i kadmija (Cd) prinosom zrna soje

U provedenim je istraživanjima utvrđeno prosječno iznošenje $158,42 \text{ g/haZn}$ i $205,88 \text{ mg/haCd}$ prinosima zrna soje.

Agronomska biofortifikacija soje folijarnom aplikacijom cinka rezultirala je statistički značajnim razlikama u iznošenju cinka ($P < 0,0001$), a nije utjecala na razlike u iznošenju kadmija ($P = 0,7770$) (tablica 17). Biofortifikacija soje cinkom povećala je iznošenje cinka prinosom zrna $34,75 \%$, tj. za $46,9 \text{ g/haZn}$. Iznošenej kadmija zrnom soje smanjeno je nakon folijarne aplikacije cinka $8,47 \%$, ali navedena razlika iznošenja kadmija nije statistički značajna.

Tablica 17. Iznošenje Zn (u g/ha) i Cd (u mg/ha) prinosima zrna soje

Tretman	Zn	Cd
Kontrola	134,97 b	214,98
Aplikacija cinka	181,87 a	196,78
LSD _{0,05}	20,269	-
Prosjek	158,42	205,88

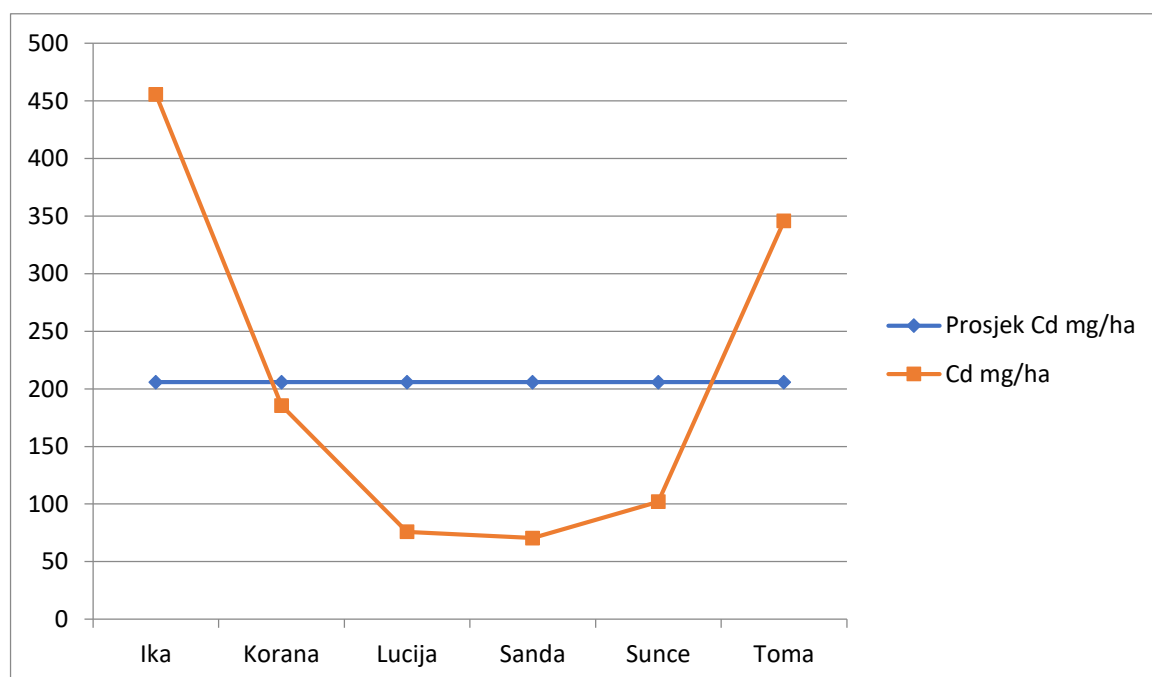
^{a, b} Između tretmana koji sadrže istu slovnju oznaku nisu utvrđene statistički značajne razlike

Iako su sorte ostvarile različite prinose, nije utvrđena statistički značajna razlika između sorata iznošenju cinka (tablica 18) zrnom ($P = 0,1427$), iako je najveće prosječno

iznošenje utvrđena sortama Ika (193,61 g/ha) i Toma (175,79 g/ha), a najmanja sortom Sunce (143,88 g/ha). Međutim, utvrđena je značajna razlika između sorata u iznošenju kadmija (grafikon 6) prinosom zrna ($P < 0,0001$).

Tablica 18. Utjecaj sorte na iznošenje cinka (g/ha) i kadmija (mg/ha) zrnom soje

Sorta	Zn (g/ha)	Cd (mg/ha)
Ika	193,61	455,56 a
Korana	146,00	185,57 c
Lucija	146,65	75,89 d
Sanda	144,58	70,48 d
Sunce	143,88	102,04 d
Toma	175,79	345,75 b
LSD _{0,05}	-	50,68
Prosjeak	158,42	205,88



Grafikon 6. Iznošenje kadmija zrnom soje

Sorta Ika prinosom zrna iznijela je 6-6,5 puta više, a sorta Toma 4,5-5 puta više kadmija nego sorte Lucija i Sanda.

5. RASPRAVA

5.1. Agrokemijska svojstva tla

Cink je esencijalan za biljke životinje i ljude. Biljka ga iz tla usvaja u različitim kationskim oblicima (Zn^{2+} , ZnCl^+ , $[\text{Zn}(\text{NH}_3)_4]^{2+}$, $\text{Zn}(\text{OH})^+$) ili kao Zn-helate.

Preporučeni dnevni unos cinka u ljudski organizam je do 15 mg/dan. U analiziranom su tlu dostatne količine Zn raspoloživog biljkama (2,91 mg/kg), a ukupne količine (64,13 mg/kg) su značajno manje od maksimalno dozvoljenih u poljoprivrednim tlima.

Faktori koji utječu na raspoloživost cinka su: karbonatnost, pH reakcija tla, antagonizam s kalcijem i magnezijem, količina fosfora, organska tvar i ukupne količine Zn u tlu. Na karbonatnim tlima, količina bioraspoloživog cinka (Zn^{2+}) je vrlo niska. Da bi se biljka mogla uspješno opskrbiti dovoljnom količinom cinka koncentracija u vodenoj otopini tla morala bi porasti za 100x za svaku jedinicu porasta pH vrijednosti tla (Lindsay, 1972.). Na raspoloživost cinka utječe i organska tvar u tlu. Naime, prema istraživanju Hodgsona i sur. (1966.) utvrđeno je da se oko $\frac{2}{3}$ topivog cinka nalazi u spojevima s organskim tvarima. Topivi cink je dio organskih kompleksa s amino i fulvokiselinama, dok je netopivi cink u kompleksima s huminskim kiselinama (Stevenson i Ardakani, 1972.). Također kako u procesu usvajanja cinka značajnu ulogu ima difuzija, vrlo važnu ulogu imaju i zbijenost i vlažnost tla.

Kadmij je toksični teški metal bez esencijalnog značaja. U tlu se javlja kao pratioč Zn u obliku CdS u sfaleritu, ZnS, a CdCO_3 u smitsonitu i ZnCO_3 . Sadržaj kadmija u biljkama kreće se između 0,05 i 0,20 mg/kg. Na njegovu bioraspoloživost u tlu utječu reakcija tla, ukupan sadržaj u tlu, sadržaj cinka, sadržaj organske tvari i tekstura tla. Povećavanjem pH smanjuje se raspoloživost kadmija. Također, zbog velike sličnosti ovih elemenata, smanjenjem količine dostupnog Zn u tlu povećava se dostupnost kadmija. Kadmij ulazi u spojeve s organskim tvarima pa se i povećanjem humoznosti tla povećava njegova bioraspoloživost.

Tlo u ovome vegetacijskom pokusu je bilo slabo do umjereno alkalne reakcije ($\text{pH}_{\text{H}_2\text{O}} = 8,38$, $\text{pH}_{\text{KCl}} = 7,39$) što djelomično negativno utječe na bioraspoloživost

esencijalnog cinka i smanjuje raspoloživost toksičnog kadmija, ali ne utječe na ukupnu količinu cinka i kadmija u tlu.

Prema količini karbonata (2,49 % CaCO_3), tlo se svrstava u tla slabe karbonatnosti (Soil Survey Manual, 1993.) što je povoljno za koncentraciju i raspoloživost Zn. Prema sadržaju organske tvari (1,79 %) tlo je slabo humozno što pridonosi raspoloživosti cinka u tlu.

Kako je analizirano tlo u razini visoke opskrbljenosti fosforom i kalijem (Lončarić i Karalić, 2015.), postoji mogućnost da je velika količina fosfora rezultat intenzivnije mineralne gnojidbe fosforom što može rezultirati većom koncentracijom Cd.

Koncentracija cinka u tlu je unutar dopuštenih koncentracija u poljoprivrednim tlima propisanih Pravilnikom o zaštiti poljoprivrednog zemljišta od onečišćenja (Narodne Novine, 2014.). Također, utvrđene biljkama raspoložive koncentracije Zn (2,91 mg/kg) su u razini srednjih do visokih koncentracija.

Oliver i sur. (1995.) pri istraživanju genetske varijacije za koncentracije Cd među australskim sortama pšenice došli su do rezultata da je utjecaj sorte bio manje značajan od utjecaja lokacije gdje je pšenica uzgajana, što se uglavnom odnosilo na svojstva tla.

5.2. Utjecaj agronomске biofortifikacije na prinos, koncentraciju i iznošenje Zn i Cd

Kako je cink esencijalan element, kako za biljke tako i za ljude i životinje, povećanje njegove koncentracije u biljkama je od globalne važnosti. Khoshg-oftarmanesh i sur. (2010.) ističu da noviji kultivari pšenice i riže imaju nižu koncentraciju mikrohraniva u zrnu od tradicionalnih kultivara jer su uzgajivači i oplemenjivači uglavnom usmjereni na povećanje prinosa, a izostavljaju brigu oko koncentracije mikronutrijenata u zrnu. Sličan stav zauzeli su i Cakmak i sur. (1999.) koji tvrde da se pri suvremenom uzgoju pšenice koncentracija Zn u zrnu smanjila.

Agronomskom biofortifikacijom soje folijarnom aplikacijom cinka došlo je do povećanja prinosa od 253,6 kg/ha što nije statistički značajno povećanje. Međutim, rezultirala je statistički značajnim razlikama u koncentracijama cinka u mahunama ($P < 0,0001$), stabljici ($P = 0,0006$) i zrnu ($P < 0,0001$) soje. Koncentracija cinka se u mahunama povećala se dvostruko, u stabljici 48,5%, a u zrnu za $\frac{1}{4}$. U apsolutnim

vrijednostima, najveće povećanje ostvareno je u zrnu (povećanje 10,18 mg/kg), zatim u mahunama (7,12 mg/kg), a najmanje u stabljici (2,84 mg/kg).

Istraživanjem je utvrđeno iznošenje cinka i kadmija zrnom soje od oko 135 g/ha Zn i oko 215mg/ha Cd u kontrolnom tretmanu, odnosno 181,8 g/ha Zn i 196,8 mg/ha Cd nakon provedene agronomske biofortifikacije soje. Dakle, agronomska biofortifikacija rezultirala je statistički značajnim razlikama u iznošenju cinka, ali nije utjecala na iznošenja kadmija. Nakon provedene biofortifikacije soje iznošenje cinka zrnom povećalo se za 46,9 g/ha, odnosno 34,75%. Iznošenje kadmija se smanjilo za 18,2 mg/ha, odnosno 8,47%.

Prema Habibu (2009.) obogaćivanje zrna žitarica s cinkom treba biti visoko prioritarno područje istraživanja koje će pridonijeti smanjenju deficita Zn i zdravstvenih problema kod ljudi. Ovisno o uvjetima tla i načinima aplikacije, moguće je povećati koncentraciju Zn u zrnu do četiri puta u poljskim uvjetima (Bansal i sur., 1990.; Sharmas i Lal, 1993.; Gill, 1994.; Yilmaz i sur.1995.; Seilsepour, 2007.; Habib, 2009.).

Istraživanje provedeno na četiri lokacije u Kini pokazuje da folijarna aplikacija Zn ima veći učinak na povećanje koncentracije Zn u zrnu od aplikacije Zn u tlo. Folijarna aplikacija 0,4% $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ rezultirala je većom koncentracijom Zn u zrnu pšenice za 58% (Zhang, 2012.).

5.3. Utjecaj sorte na prinos, koncentraciju i iznošenje cinka i kadmija

Utvrđene su značajne razlike prinosa istraživanih sorata. Najveći prinos ostvarila je sorta Ika (4.069 kg/ha), a najmanji sorta Sanda (2.979 kg/ha). Razlike u prinosima mogu se objasniti oplemenjivačkim razlikama između sorata i različitim tolerantnostima pojedine sorte na dinamiku agrorokoloških uvjeta tijekom proizvodnje.

Značajan utjecaj sorte na prinos zabilježili su i Galić Subašić i sur. (2018.) u istraživanju 2015. godine. Isto su utvrdili i Pospišil i sur. (2002.) prilikom istraživanja o utjecaju razine agrotehnike na prinos i ekonomičnost proizvodnje soje.

Između sorata po koncentraciji cinka u mahunama, zrnu i stabljici nije utvrđena statistički značajna razlika. Najveća prosječna koncentracija u zrnu utvrđena je kod sorte Sanda (48,45 mg/ha) , a najmanja kod sorte Sunce (42,43 mg/ha).

Međutim, utvrđene su značajne razlike između sorata u prosječnim koncentracijama kadmija u stabljikama, mahunama i zrnu. Najveću prosječnu koncentraciju kadmija imala je sorta Ika (u stabljici 121, u mahunama 101,2 i u zrnu 97,39 $\mu\text{g/kg}$), a najmanje su imale sorte Lucija (u stabljici 5,67, u mahunama 6,46 i u zrnu 12,70 $\mu\text{g/kg}$) i Sanda (u stabljici 4,05, u mahunama 6,96 i u zrnu 15,26 $\mu\text{g/kg}$). Značajno je napomenuti da niti najveće koncentracije Cd u zrnu soje nisu previsoke, tj. koncentracije u zrnu sorte Ika su tek na razini 48,7 % maksimalnih dozvoljenih koncentracija u zrnu soje. S druge strane, veliki je biofortifikacijski potencijal sorata s malim koncentracijama kadmija koje su na razini 6,35 % (Lucija) i 7,63 % (Sanda) maksimalnih dozvoljenih koncentracija u zrnu.

Utvrđeni rezultati značajnog povećanja koncentracija Zn u zrnu soje agronomskom biofortifikacijom i istovremeno značajnih razlika između sorata soje u prinosu i koncentracijama kadmija u zrnu, ukazuju da se pažljivim izborom sorte i biofortifikacijom može proizvesti zrno soje visokih koncentracija cinka, istovremeno niskih koncentracija kadmija te dostatno visokih prinosa.

6. ZAKLJUČAK

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi utjecaj agronomske biofortifikacije folijarnom aplikacijom cinka na koncentraciju cinka u različitim sortama soje, a time i unos cinka u prehrambeni lanac.

Iz dobivenih rezultata možemo zaključiti:

1. Folijarnom aplikacijom cinka povećava se koncentracija cinka u zrnu, mahunama i stabljici soje.
2. Folijarna aplikacija cinka u određenom postotku je smanjila koncentraciju kadmija u zrnu, mahunama i stabljici soje.
3. Sorte soje se razlikuju po visini prinosa, a ne razlikuju se po akumulaciji apliciranog cinka u zrnu, mahunama i stabljici, ali se značajno razlikuju po akumulaciji kadmija, zbog čega možemo pretpostaviti da između sorata soje postoji genetska varijabilnost u mehanizmima transporta i akumulacije Zn i/ili Cd.
4. Agronomska biofortifikacija soje cinkom rezultira povećanim unosom cinka uz potencijalno smanjenje unosa kadmija u prehrambeni lanac.

7. POPIS LITERATURE

1. Alloway, B. J. (1995.): Heavy metals in soils. Glasgow, UK.
2. Bolt, C.H. (1976.): soil chemistry. Oxford, New York.
3. Čoga, L. (2000.): Raspodjela kadmija i cinka u sustavu tlo-voda-biljka nakon hidromelioracija. Zagreb.
4. DZS RH (2017.): Statistički ljetopis Republike Hrvatske (2017.): Državni zavod za statistiku Republike Hrvatske. Zagreb.
5. Gračan, R., Todorčić, I. (1987.): Specijalno ratarstvo. Školska knjiga, Zagreb
6. Hadžić, A. (2013.): Minerali u ishrani. Sarajevo.
7. International Organization for Standardization (1994.): Soil quality – Determination of pH. ISO 10390:1994.
8. International Organization for Standardization (1998.): Soil quality – Determination of organic carbon by sulfochromic oxidation. 14235:1998.
9. Ivezić, V., Almås, Å., Lončarić, Z., Singh, B.R. (2014.): Vodotopiva frakcija Cd, Co, Mn, Ni, Pb i Fe u tlima Osječko-baranjske županije, Department of Plant and Environmental Sciences, Norwegian University of Life Sciences, Norway, Poljoprivredni fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek, Hrvatska.
10. Josifović, M. (urednik) (1973.): Poljoprivredna enciklopedija. Zagreb.
11. Kisić, I. (2012.): Sanacija onečišćenoga tla. Agronomski fakultet Zagreb, Zagreb.
12. Lončarić, Z. (urednik) (2015.): Kalcizacija tala u pograničnom području. Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Osijek.
13. Lončarić, Z. (urednik) (2015.): Utjecaj poljoprivrede na kakvoću hrane u pograničnom području. Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Osijek.
14. Lončarić, Z.(urednik) (2014.): Mmineralna gnojiva i gnojidba ratarskih usjeva. Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Osijek.
15. Lončarić, Z.(urednik) (2014.): Plodnost i opterećenost tala u pograničnom području. Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Osijek.
16. Lončarić, Z.(urednik) (2014.): Uzorkovanje tla i biljke za agrokemijske i pedološke analize. Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Osijek.
17. Lončarić, Z., Kadar, I. (2013.): Elementi u tragovima i teški metali u antroposferi. Interna skripta. Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Osijek.
18. Marshall, C.E. (1964.): The phisical chemistry and mineralogy of soil. New York.

19. Martin, J.H., Leonard, W.H. (1969.): Ratarstvo. Školska knjiga, Zagreb.
20. Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja RH (2008.): Pravilnik o zaštiti poljoprivrednog zemljišta od onečišćenja. Narodne novine 152, 2008.
21. Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja RH (2014.): Zakon o poljoprivrednom zemljištu. Narodne novine 2/37, 4/14.
22. Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja RH (2008.): Pravilnik o mikrobiološkim kriterijima za hranu. Narodne novine 74/2008
23. Romić, M., Romić, D. (2003.): Heavy metals distribution in agricultural topsoils in urban area. *Environmental Geology*
24. Singh, B.R., McLaughlin, M.J., Brevik, E.C. (ur.) (2017.): The Nexus of Soils, Plants, Animals and Human Health. *Catena Soil Sciences*, Stuttgart, Njemačka.
25. Škorić, A. (1982.): Pedologija (Svojstva i geneza tla). Interna skripta Sveučilište Zagreb, Zagreb.
26. Škorić, A. (1991.): Sastav i svojstva tla. Sveučilište Zagreb, Zagreb.
27. Šoštarić, J., Marković, M. (2011.): Zaštita tla i voda. Interna skripta. Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Osijek.
28. Sparks, D.C. 1996.): Methods of soil analysis. Soil science society of America, USA.
29. Supek, Z. (1977.): Tehnologija s poznavanjem robe. Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
30. Teklić, T. (2012.): Fiziologija bilja. Interna skripta. Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Osijek.
31. Trierweiler, F.J., Lindsay, W.L. (1969.): EDTA-ammonium carbonate test for Zn. *Soil Sci Soc Amer Proc* 33, 49-54.
32. USDA, (1993.): Soil Survey Manual. National Soil Survey Center.
33. Varga, I. (2010.): Utjecaj kalcizacije i gnojidbe fosforom na koncentraciju Zn i Cd u listu i zrnu soje. Diplomski rad, Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Osijek.
34. Vukadinović, V. (2012.): Kemija tla. Interna skripta. Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Osijek.
35. Vukadinović, V., Bertić, B. (1989.): Praktikum iz agrokemije i ishrane bilja. Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Osijek.
36. Vukadinović, V., Lončarić, Z. (1998.): Ishrana bilja. Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Osijek.
37. Vukadinović, V., Vukadinović, V. (2014.): Ishrana bilja. Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Osijek.

38. Živković, M. (1983.): Pedologija. Univerzitet Beograd, Beograd.
39. Bikić, F., Pašalić, A., (2015.): Utjecaj pH vrijednosti tla i dodatka kelatnog agensa na sadržaj kadmija u pojedinim biljkama. Univerzitet u Zenici, Zenica.
40. Pospišil, A., Varga, B., i sur. (2002.): Utjecaj razine agrotehnike na prinos i ekonomičnost proizvodnje soje.

*** Vukadinović V., (2012.): Reakcija otopine tla. (http://pedologija.com.hr/literatura/Pedologija/vjezbe/pH_karbonati.pdf), pristup 16.08.2018.

*** Vukadinović V., (2012.): Određivanje sadržaja humusa u tlu. (<http://pedologija.com.hr/literatura/Pedologija/vjezbe/Humus.pdf>), pristup 16.08.2018.

*** Vukadinović V., Vukadinović V.: Značaj makro i mikroelemenata u prehrani ljudi. (http://tlo-i-biljka.eu/gnojidba/Zanimljivosti/Zanimljivosti_12_2016_elementi_u_prehrani_ljudi.pdf), pristup 16.08.2018

*** Cink (Zn) – 1. dio, 27.01.2014., (www.gnojidba.info/mikroelementi/cink-zn-1-dio/), pristup 18.08.2018

*** Cink (Zn) – 2. dio, 29.01.2014., (www.gnojidba.info/mikroelementi/cink-zn-2-dio/), pristup 18.08.2018

*** Centar za zelene tehnologije (www.green-tech.rs), pristup 16.08.2018

*** T. Zou, N. Xu, Guanglin Hu, Hangdan Xu: Biofortification of soybean sprouts with zinc and bioaccessibility of zinc in the sprouts. 17 March 2014 (<https://doi.org/10.1002/jsfa.6658>), pristup 15.08.2018

*** PROCEEDINGS&ABSTRACTS 6th international scientific/professional conference: Agriculture in nature and environment protection. Vukovar, 2013. (<http://www.hdpot.hr/images/files/Vukovar%20zbornici/VUKOVAR%20-%20Zbornik%202013.pdf>), preuzeto 18.08.2018

8. SAŽETAK

Niska koncentracija cinka u tlima rezultira niskom koncentracijom toga elementa i u prehrani ljudi i životinja. Kako je cink esencijalan element, njegov deficit nepovoljno utječe na organizam. S druge strane, kadmij je toksičan element bez esencijalnog i korisnog učinka, te je stoga poželjno da ga u konzumnim namirnicama bude što manje.

Agronomska biofortifikacija rezultira povećanjem cinka u jestivim dijelovima biljaka, a time i većim količinama unosa cinka u ljudski organizam.

Cilj ovoga istraživanja bio je utvrditi utjecaj folijarne aplikacije cinka na koncentraciju cinka i kadmija u biljnim dijelovima (osobito zrnu) pojedinih sorata soje. Biofortifikacijski pokus proveden je 2017. godine na 6 sorata soje (Korana, Sanda, Lucija, Toma, Sunce, Ika) različitih grupa zriobe (00-I). Folijarna aplikacija cinka u obliku cink sulfata ($5,489 \text{ kg/ha ZnSeO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$) provedena je u fenofazi cvatnje soje.

Biofortifikacija soje je značajno utjecala na koncentracije cinka u mahunama, stabljici i zrnu (povećanje 106%, 48,5%, odnosno 25%) te iznošenje cinka prinosom zrna (povećanje 34,75%). Tretman nije statistički značajno utjecao na koncentraciju kadmija u stabljici, mahunama i zrnu soje te njegovo iznošenje prinosom zrna, ali je utvrđeno malo smanjenje koncentracija u stabljici (23%), mahunama (31%) i zrnu (22,64%).

Utvrđen je i statistički značajan utjecaj sorata na prinos te akumulaciju kadmija u biljnim dijelovima i njegovo iznošenje zrnom soje. Utjecaj sorata na koncentraciju cinka i njegovo iznošenje zrnom soje nije bilo statistički značajno.

Rezultati navode na zaključak da se folijarnom aplikacijom cinka povećava njegova koncentracija u zrnu, mahunama i stabljici soje. Sorte soje ne razlikuju značajno po akumulaciji i iznošenju apliciranog cinka, ali se razlikuju po akumulaciji i iznošenju kadmija prinosom.

Utvrđeni rezultati značajnog povećanja koncentracija Zn u zrnu soje agronomskom biofortifikacijom i istovremeno značajnih razlika između sorata soje u prinosu i koncentracijama kadmija u zrnu, ukazuju da se pažljivim izborom sorte i biofortifikacijom može proizvesti zrno soje visokih koncentracija cinka, istovremeno niskih koncentracija kadmija te dostatno visokih prinosa.

Ključne riječi: soja, sorte, cink, kadmij, agronomska biofortifikacija, folijarna aplikacija

9. SUMMARY

Low Zn concentrations in soils result with low concentrations of this element in human and animal nutrition. Since zinc is an essential element, his deficit has an adversely affects at the organism. On the other side, cadmium is a toxic element without any essential and useful effect, and because of that is better that be as little as possible in consumed foodstuffs. Agronomic biofortification results with increasing Zn concentrations in edible parts of plants, and increasing intake of this element into the human organism.

The aim of this experiment was been to determine the influence foliar application of zinc on the concentration of zinc and cadmium in plant parts (especially grain) some soybean types. Biofortification experiment was carried out in 2017 on 6 soya cultivars (Korana, Sanda, Lucija, Tom, Sun, Ika) with different lenght of vegeation (00-I). The foliar application of zinc, like zinc sulphate ($5.489 \text{ kg ha}^{-1} \text{ZnSeO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$), was applied in flowering phenophase of soybean.

Biofortification of soya was a statistically significant effected on the amount of zinc in pods, stems and grain (increase 106%, 48.5% and 25%) and his taken out with grain yield (34.75%). The treatment didn't statistically significantly affected on the amount of cadmium in stems,pods and soybean grain, and his taken out with grain yield, but there was a decrease; 23% in stems, 31% in pods and 22.64% in grain.

Cultivars significantly affected on yield, accumulation of Cd in parts of plant, and his removal with soy bean. The influence of cultivars on zinc concentration and his taken out with yield wasn't been statistically significantly.

The results suggest that foliar zinc application increases his concentration in grain, pods and stems of soya. Soya varieties are not significantly different in accumulation and taking out of the applied zinc, but are different in accumulation and taking out of cadmium with yield. The results of a significant increase Zn concentration in soybean grain by agronomic biofortification and at the same time significant differences between soya varieties in yield and concentrations of cadmium in the grain indicate that with careful selection of varieties and biofortification we can produce soya grain with high zinc,and at the same time low cadmium concentration, and sufficiently high yields .

Key words: soybean, cultivars, zinc, cadmium, agronomic biofortification, foliar application

10. POPIS TABLICA

Broj tablice	Naziv tablice	Str.
Tablica 1.	Sadržaj cinka i kadmija (mg/kg) u mineralnim gnojivima	2
Tablica 2.	Sadržaj cinka i kadmija u organskim gnojivima (mg/kg suhe tvari))	3
Tablica 3.	Sadržaj Cd u sedimentnim fosfatnim stijenama	11
Tablica 4.	Koncentracija cinka i kadmija (mg/kg) u listu, stabljici i zrnu soje	12
Tablica 5.	Maksimalno dozvoljene koncentracije cinka u namirnicama	12
Tablica 6.	Maksimalno dozvoljene koncentracije kadmija u namirnicama	13
Tablica 7.	Ocjena reakcije tla	17
Tablica 8.	Humoznost tla	18
Tablica 9.	Granične vrijednosti AL-P ₂ O ₅ i AL-K ₂ O Za ratarske usjeve na području Istočne Hrvarske	19
Tablica 10.	Grupe zrioba izabranih sorata soje	21
Tablica 11.	Osnovna kemijska svojstva oraničnog sloja tla na pokusnim površinama	23
Tablica 12.	Utjecaj agronomske fortifikacije cinkom na prinos zrna soje	24
Tablica 13.	Utjecaj sorte na prinos zrna soje	24
Tablica 14.	Koncentracije Zn u mahunama, stabljici i zrnu soje (u mg/kg ST)	25
Tablica 15.	Koncentracije Cd u mahunama, stabljici i zrnu soje (u mg/kg ST)	26
Tablica 16.	Utjecaj sorte na koncentracije kadmija (μg/kg) u stabljikama, mahunama i zrnu	27
Tablica 17.	Iznošenje Zn (u g/ha) i Cd (u mg/ha) prinosima zrna soje	28
Tablica 18.	Utjecaj sorte na iznošenje Zn (g/ha) i Cd (mg/ha) zrnom soje	29

11. POPIS GRAFIKONA

Broj grafikona	Naziv grafikona	Str.
Grafikon 1.	Prinosi sorata soje	24
Grafikon 2.	Koncentracija cinka u pojedinačnim dijelovima biljke soje	25
Grafikon 3.	Koncentracija kadmija u pojedinačnim dijelovima biljke soje	26
Grafikon 4.	Utjecaj sorte na koncentracije cinka (mg/kg) u stabljikama, mahunama i zrnu	27
Grafikon 5.	Koncentracije kadmija ($\mu\text{g/kg}$) u stabljikama, mahunama i zrnu soje po sortama	28
Grafikon 6.	Iznošenje kadmija zrnom soje	29

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Sveučilišni diplomski studij Bilinogojstvo, smjer Ishrana bilja i tloznanstvo

Diplomski rad

Biofortifikacija soje cinkom

Dejana Kraljević

Sažetak: Niska koncentracija cinka u tlima rezultira niskom koncentracijom toga elementa i u prehrani ljudi i životinja. Kako je cink esencijalan element, njegov deficit nepovoljno utječe na organizam. S druge strane, kadmij je toksičan element bez esencijalnog i korisnog učinka, te je stoga poželjno da ga u konzumnim namirnicama bude što manje. Agronomska biofortifikacija rezultira povećanjem cinka u jestivim dijelovima biljaka, a time i većim količinama unosa cinka u ljudski organizam. Cilj ovoga istraživanja bio je utvrditi utjecaj folijarne aplikacije cinka na koncentraciju cinka i kadmija u biljnim dijelovima (osobito znu) pojedinih sorata soje. Biofortifikacijski pokus proveden je 2017. godine na 6 sorata soje (Korana, Sanda, Lucija, Toma, Sunce, Ika) različitih grupa zriobe (00-I). Folijarna aplikacija cinka u obliku cink sulfata ($5,489 \text{ kg/ha ZnSeO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$) provedena je u fenofazi cvatnje soje. Biofortifikacija soje je značajno utjecala na koncentracije cinka u mahunama, stabljici i znu (povećanje 106%, 48,5%, odnosno 25%) te iznošenje cinka prinosom zrna (povećanje 34,75%). Tretman nije statistički značajno utjecao na koncentraciju kadmija u stabljici, mahunama i znu soje te njegovo iznošenje prinosom zrna, ali je utvrđeno malo smanjenje koncentracija u stabljici (23%), mahunama (31%) i znu (22,64%). Utvrđeno je i statistički značajan utjecaj sorata na prinos te akumulaciju kadmija u biljnim dijelovima i njegovo iznošenje znom soje. Utjecaj sorata na koncentraciju cinka i njegovo iznošenje znom soje nije bilo statistički značajno. Rezultati navode na zaključak da se folijarnom aplikacijom cinka povećava njegova koncentracija u znu, mahunama i stabljici soje. Sorte soje ne razlikuju značajno po akumulaciji i iznošenju apliciranog cinka, ali se razlikuju po akumulaciji i iznošenju kadmija prinosom. Utvrđeni rezultati značajnog povećanja koncentracija Zn u znu soje agronomskom biofortifikacijom i istovremeno značajnih razlika između sorata soje u prinosu i koncentracijama kadmija u znu, ukazuju da se pažljivim izborom sorte i biofortifikacijom može proizvesti zrno soje visokih koncentracija cinka, istovremeno niskih koncentracija kadmija te dostatno visokih prinosa.

Rad je izrađen pri: Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Mentor: prof. dr. sc. Zdenko Lončarić

Broj stranica: 39

Broj grafikona i slika: 8

Broj tablica: 18

Broj literaturnih navoda: 40

Broj priloga: -

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: soja, sorte, cink, kadmij, agronomska biofortifikacija, folijarna aplikacija

Datum obrane:

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. doc. dr. sc. Vladimir Ivezić, predsjednik
2. prof. dr. sc. Zdenko Lončarić, mentor
3. izv. prof. dr. sc. Brigita Popović, član

Rad je pohranjen: Knjižnica Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Vladimira Preloga 1, Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek
University Graduate Studies, Plant nutrition and Soil science

Graduate thesis

Biofortification of soybean with zinc

Dejana Kraljević

Abstract: Low Zn concentrations in soils result with low concentrations of this element in human and animal nutrition. Since zinc is an essential element, his deficit has an adversely affects at the organism. On the other side, cadmium is a toxic element without any essential and useful effect, and because of that is better that be as little as possible in consumed foodstuffs. Agronomic biofortification results with increasing Zn concentrations in edible parts of plants, and increasing intake of this element into the human organism. The aim of this experiment was been to determine the influence foliar application of zinc on the concentration of zinc and cadmium in plant parts (especially grain) some soybean types. Biofortification experiment was carried out in 2017 on 6 soya cultivars (Korana, Sanda, Lucija, Tom, Sun, Ika) with different lenght of vegecation (00-I). The foliar application of zinc, like zinc sulphate ($5.489 \text{ kg ha}^{-1} \text{ ZnSeO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$), was applied in flowering phenophase of soybean. Biofortification of soya was a statistically significant effected on the amount of zinc in pods, stems and grain (increase 106%, 48.5% and 25%) and his taken out with grain yield (34.75%). The treatment didn't statistically significantly affected on the amount of cadmium in stems,pods and soybean grain, and his taken out with grain yield, but there was a decrease; 23% in stems, 31% in pods and 22.64% in grain. Cultivars significantly affected on yield, accumulation of Cd in parts of plant, and his removal with soy bean. The influence of cultivars on zinc concentration and his taken out with yield wasn't been statistically significantly. The results suggest that foliar zinc application increases his concentration in grain, pods and stems of soya. Soya varieties are not significantly different in accumulation and taking out of the applied zinc, but are different in accumulation and taking out of cadmium with yield. The results of a significant increase Zn concentration in soybean grain by agronomic biofortification and at the same time significant differences between soya varieties in yield and concentrations of cadmium in the grain indicate that with careful selection of varieties and biofortification we can produce soya grain with high zinc,and at the same time low cadmium concentration, and sufficiently high yields .

Thesis performed at: Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek

Mentor: prof. dr. sc. Zdenko Lončarić

Number of pages: 39

Number of figures:8

Number of tables: 18

Number of references: 40

Number of appendices: -

Original in: Croatian

Key words: soybean, cultivars, zinc, cadmium, agronomic biofortification, foliar application

Thesis defended on date:

Reviewers:

1. doc. dr. sc. Vladimir Ivezić, chairman
2. prof. dr. sc. Zdenko Lončarić, mentor
3. izv. prof. dr. sc. Brigita Popović, member

Thesis deposited at: Library, Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Vladimira Preloga 1, Osijek.