

УНИВЕРЗИТЕТ „ГОЦЕ ДЕЛЧЕВ“ - ШТИП  
ЗЕМЈОДЕЛСКИ ФАКУЛТЕТ

---

UDC 63 (058)

ISSN 1409-987X

ISSN 1857-8608 on line



**ГОДИШЕН ЗБОРНИК**  
**2015**  
**YEARBOOK**



ГОДИНА 13

VOLUME XIII

---

GOCE DELCEV UNIVERSITY - STIP  
FACULTY OF AGRICULTURE

УНИВЕРЗИТЕТ „ГОЦЕ ДЕЛЧЕВ” – ШТИП  
ЗЕМЈОДЕЛСКИ ФАКУЛТЕТ

---

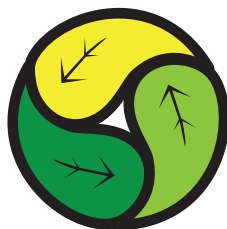
UDC 63(058)

ISSN 1409-987X

ISSN 1857-8608 on line



**ГОДИШЕН ЗБОРНИК**  
**2015**  
**YEARBOOK**



ГОДИНА 13

VOLUME XIII

---

UNIVERSITY “GOCE DELCEV” – STIP  
FACULTY OF AGRICULTURE



**ГОДИШЕН ЗБОРНИК**  
**УНИВЕРЗИТЕТ „ГОЦЕ ДЕЛЧЕВ“ - ШТИП, ЗЕМЈОДЕЛСКИ ФАКУЛТЕТ**  
**YEARBOOK**  
**GOCE DELCEV UNIVERSITY - ŠTIP, FACULTY OF AGRICULTURE**

**Издавачки совет**

Проф. д-р Саша Митрев  
Проф. д-р Илија Каров  
Проф. д-р Блажо Боев  
Проф. д-р Лилјана Колева-Гудева  
Проф. д-р Рубин Гулабоски  
М-р Ристо Костуранов

**Редакциски одбор**

Проф. д-р Саша Митрев  
Проф. д-р Илија Каров  
Проф. д-р Блажо Боев  
Проф. д-р Лилјана Колева-Гудева  
Проф. д-р Верица Илиева  
Проф. д-р Љупчо Михајлов  
Проф. д-р Рубин Гулабоски  
Доц. д-р Душан Спасов

**Одговорен уредник**

Проф. д-р Саша Митрев

**Главен уредник**

Проф. д-р Лилјана Колева-Гудева

**Администратор**

Доц. д-р Емилија Костадиновска

**Јазично уредување**

Даница Гаврилоска-Атанасовска  
(македонски јазик)

Биљана Иванова

(англиски јазик)

**Техничко уредување**

Славе Димитров

Благој Михов

**Редакција и администрација**

Универзитет „Гоце Делчев“ - Штип  
Земјоделски факултет  
ул. „Крсте Мисирков“ 10-А  
п. фах 201, 2000 Штип  
Р. Македонија

**Editorial board**

Prof. Sasa Mitrev, Ph.D  
Prof. Ilija Karov, Ph.D  
Prof. Blazo Boev, Ph.D  
Prof. Liljana Koleva-Gudeva Ph.D  
Prof. Rubin Gulaboski, Ph.D  
Risto Kosturanov, M.Sc

**Editorial staff**

Prof. Sasa Mitrev, Ph.D  
Prof. Ilija Karov, Ph.D  
Prof. Blazo Boev, Ph.D  
Prof. Liljana Koleva-Gudeva Ph.D  
Prof. Verica Ilieva, Ph.D  
Prof. Ljupco Mihajlov, Ph. D  
Prof. Rubin Gulaboski, Ph.D  
Ass. prof. Dušan Spasov, Ph.D

**Editor in chief**

Prof. Sasa Mitrev, Ph.D

**Managing editor**

Prof. Liljana Koleva-Gudeva Ph.D

**Administrator**

Emilija Kostadinovska, Ph.D

**Language editor**

Danica Gavrilovska-Atanasovska  
(Macedonian)

Biljana Ivanova

(English)

**Technical editor**

Slave Dimitrov

Blagoj Mihov

**Address of the editorial office**

Goce Delcev University – Štip  
Faculty of Agriculture  
Krste Misirkov 10-A  
PO box 201, 2000 Štip,  
R. of Macedonia



## СОДРЖИНА CONTENT

Емилија Костадиновска, Саша Митрев, Раде Русевски, Илија Каров и Виолета Димовска Присуство на вирусот на свиткување на листовите кај виновата лоза во Македонија Emilija Kostadinovska, Sasa Mitrev, Rade Rusevski, Ilija Karov, Violeta Dimovska Presence of grapevine leafroll associated virus in the vineyards in the Republic of Macedonia .....	5
Сања Костадиновиќ Величковска, Саша Митрев, Фиданка Илиева, Љупчо Михајлов Сензорна и аналитичка евалуација на ладно-цедени масла од сончоглед Sanja Kostadinović Veličkovska, Saša Mitrev, Fidanka Ilieva, Ljupco Mihajlov Sensory and analytic evaluation of cold-pressed sunflower oils .....	25
Фиданка Трајкова, Лилјана Колева-Гудева и Саша Митрев Култура на зиготски ембриони од кајсија ( <i>Prunus Armeniaca</i> L.) Fidanka Trajkova, Liljana Koleva Gudeva and Sasa Mitrev Zygotic embryos culture from apricot ( <i>Prunus Armeniaca</i> L.) .....	39
Љупчо Михајлов, Весна Зајкова Панова, Биљана Балабанова Фиторемедијација со соја на загадени земјоделски почви со кадмиум Ljupco Mihajlov, Vesna Zajkova Panova, Biljana Balabanova Soybean phytoremediation of cadmium polluted agricultural soils .....	49
Биљана Балабанова, Саша Митрев, Виолета Иванова-Петропулос, Рубин Гулабоски Одредување на изотопи на олово во вино и масло за јадење со примена на индуктивно спрегната плазма со масена спектрометрија Biljana Balabanova, Sasa Mitrev, Violeta Ivanova-Petropulos, Rubin Gulaboski Isotopic lead measurements in wine and edible oil using inductively coupled plasma with mass spectrometry .....	59
Лилјана Колева-Гудева, Фиданка Трајкова и Јулијана Троицки Стимулирање на вегетативното размножување со ауксини кај рузмарин ( <i>Rosmarinus Officinalis</i> L.) и жалфија ( <i>Salvia Officinalis</i> L.) Liljana Koleva Gudeva, Fidanka Trajkova and Julijana Troicki Stimulation of vegetative propagation with auxins in rosemary ( <i>Rosmarinus Officinalis</i> L.) and sage ( <i>Salvia Officinalis</i> L.) .....	69



Наталија Маркова Руждиќ, Љупчо Михајлов, Верица Илиева, Соња Ивановска Квалитетно-технолошки својства кај домашни дворедни форми на јачмен Natalija Markova Ruzdik, Ljupcho Mihajlov, Verica Ilieva, Sonja Ivanovska Qualitative - technological properties at domestic two row barley genotypes .....	83
Биљана Балабанова, Блажо Боев, Саша Митрев, Виолета Иванова- Петропулос Метод за одредување на содржината на 35 елементи во различни примероци со примена на микробранова дигестија и индуктивно спрегната плазма со масена спектрометрија (icp-ms) Biljana Balabanova, Blazo Boev, Sasa Mitrev, Violeta Ivanova-Petropulos Method for determination of 35 elements content in various samples with application of microwave digestion and inductively coupled plasma with mass spectrometry (icp-ms) .....	99
Душан Спасов, Драгица Спасова, Мите Илиевски, Билјана Атанасова Влијание на температурата врз интензитетот на појава на памуковата совица ( <i>Heliothis obsoleta</i> FABR. = <i>Helicoverpa armigera</i> НВ.) како штетник на пиперката во струмичкиот регион Dusan Spasov, Dragica Spasova, Mite Ilievski, Biljana Atanasova The influence of the temperature at the intensity of the spread of the cotton bollworm ( <i>Heliothis obsoleta</i> FABR. = <i>Helicoverpa armigera</i> НВ.) as a pest of the peppers in the strumica region .....	113
Виолета Иванова-Петропулос, Драгана Петрушева, Саша Митрев Методи за определување на SO <sub>2</sub> и редуцирачки шеќери во вина и алкохолни пијалаци Violeta Ivanova-Petropulos, Dragana Petrusheva, Sasa Mitrev Methods for determination of SO <sub>2</sub> and reducing sugars in wines and alcoholic beverages .....	119
Мите Илиевски, Драгица Спасова, Љупчо Михајлов, Душан Спасов, Наталија Маркова Руждиќ, Верица Илиева, Еленица Софијанова Производство и застапеност на житните растенија во Република Македонија Mite Ilievski, Dragica Spasova, Ljupco Mihajlov, Dusan Spasov, Natalija Markova Ruzdic, Verica Ilieva, Elenica Sofijanova Production and balance among of cereal plants in Republic of Macedonia .....	129



Оригинален научен труд

УДК 634.8-238(497.7)

## ПРИСУСТВО НА ВИРУСОТ НА СВИТКУВАЊЕ НА ЛИСТОВИТЕ КАЈ ВИНОВАТА ЛОЗА ВО МАКЕДОНИЈА

Емилија Костадиновска<sup>1</sup>, Саша Митрев<sup>1</sup>, Раде Русевски<sup>2</sup>,  
Илија Каров<sup>1</sup>, Виолета Димовска<sup>1</sup>

**Апстракт:** Растителните вируси се група на патогени кои придонесуваат за значителни загуби во приносот и имаат големо економско значење. Тие се облигатни паразити и за нивна репликација користат дел од растителните клетки на домаќинот.

Конкретно кај виновата лоза штетното дејство од вирусната инфекција се манифестира во намалување на приносот и квалитетот на грозјето, намалување на векот на лозите, во калемовото производство – намалување на приносот и квалитетот на резниците за калемење, како и слабо сраснување на спојното место.

Со примена на серолошка ELISA техника и молекуларна RT-PCR дијагностика извршивме утврдување на присуството на еден од најшироко распространетите флоемски вируси кај виновата лоза, вирусот на свиткување на листовите – Grapevine leafroll associated virus GLRaV (-1, -2, -3, -7).

Истражувањето опфати вкупно 382 изолати од вируси кај виновата лоза, во периодот од 2008 до 2014 година.

Од вирусните промени кај виновата лоза беше следено и потврдено присуството на вирусот на свиткување на листовите кај виновата лоза (Grapevine leafroll associated virus) со групите -1 и -3 од овој вирус (GLRaV-1, GLRaV-3).

**Клучни зборови:** *облигатни паразити, ELISA, RT-PCR, GLRaV.*

<sup>1</sup>Земјоделски факултет, Универзитет „Гоце Делчев“ – Штип

<sup>2</sup>Факултет за земјоделски науки и храна, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“, Скопје



## PRESENCE OF GRAPEVINE LEAFROLL ASSOCIATED VIRUS IN THE VINEYARDS IN THE REPUBLIC OF MACEDONIA

Emilija Kostadinovska<sup>3</sup>, Sasa Mitrev<sup>3</sup>, Rade Rusevski<sup>4</sup>, Ilija Karov<sup>3</sup>,  
Violeta Dimovska<sup>3</sup>

**Abstract:** Plant viruses are group of pathogens that cause and important loses in grapevine production and they have and great economic importance. They are obligate parasite form and for their replication they used plant cells.

In particular vines, the harmful effects of viral infection manifests itself in reduced yield and quality of grapes, reducing the life of the vines in grapevine calem production- reducing the yield and quality of cuttings for grafting and weak adhesion of the coupling place.

By applying serological ELISA technique and RT-PCR molecular diagnostics, we determining the presence of most distributed phloemic viruses in grapevine - Grapevine leafroll associated virus GLRaV (-1, -2, -3, -7). The study covered a total of 382 isolates of grapevine viruses, in the period from 2008 till 2014.

In relation to grapevine viruses, we monitored the presence of the leafroll virus in grapevine (Grapevine leafroll associated virus) with groups -1 and -3 of this virus (GLRaV-1, GLRaV-3).

**Key words:** *obligate parasite, ELISA, RT-PCR, GLRaV.*

### 1. Вовед

Можностите за ефикасното искористување на земјоделското земјиште во Македонија се попречени од неговото фрагментирање во парцели, како резултат на претходните ограничувања на површини кои може да се користат и поседуваат, обичаите за наследство, како и традицијата за релациите на промет на земјиште (купопродажба) [9].

Слабиот промет на земјиште, кој не придонесе на консолидирањето (окупнувањето) на фармите, како и слабиот економски пораст и недостаток на социјална безбедност и понатаму го потхранува процесот на фрагментација и диверзификација на производството во мали парцели, со цел да се спречат пазарните флукуации и да се задоволат потребите од храна [9]. Како резултат на ваквите состојби и долгиот временски период на мали инвестиции, лозовите насади во Република Македонија се со неповолна старосна структура. Околу 60% од лозовите насади се постари од 15 години, а 38% од вкупната површина под лозови насади се на

<sup>3</sup> Faculty of Agriculture, Goce Delcev University, Stip, Macedonia

<sup>4</sup> Faculty of agriculture and food, St Kiril and Metodija University, Skopje



крајот од својот продуктивен живот. Истите треба приоритетно да бидат цел на инвестиција за нивно обновување (копачење / пресадување), за да се одржи производствениот (квантитативен и квалитативен) потенцијал [9].

Асортиманот на сортите на винско грозје е несоодветен во однос на неговиот квалитет, локацијата на производство и промовирање на пазар [9]. Сегашната застапеност на сортите на винско грозје, често не е во согласност со правните акти за сортна класификација, кои во моментот се на сила. Покрај тоа, висок процент на лозови насади се лоцирани во т.н. зони подложни на мразеви, каде што замрзнувањето на окцата е честа појава. Заменувањето на несоодветните сорти на грозје и на лозови насади, од зоните подложни на мразеви на подобри локации, ќе придонесе за подобрување на квалитетот и постабилни приноси [9].

Значајни промени кај виновата лоза во приносот предизвикуваат вирусите, како посебна група на патогени причинители [8].

Во најголем број случаи, промените кои настануваат кај виновата лоза предизвикани од вирусен причинител зависат од видот на вирусот, осетливоста на сортата на виновата лоза, начинот на ширење на вирусите итн. [8]. Според статистички податоци за појавата на виروزите кај виновата лоза [4], се смета дека тие спаѓаат во многу стари заболувања, но нивната економска штетност посебно дошла до израз кон половината на XIX век и била во тесна врска со појавата на филоксерата [4].

До денес се познати околу 70 групи вируси како главни причинители на болести кај виновата лоза [12]. Една од многу важните препораки пропишана од Интернационалното здружение за проучување на вирусите и слични организми на вирусите (International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of Grapevine ICVG) од 2003 г. предлага задолжително лабораториско тестирање на садниот материјал, особено на економски многу значајни вирози кои директно влијаат врз растот на виновата лоза, квалитетот и квантитетот.

**Вирус на свиткување на листовите кај виновата лоза (*Grapevine leafroll associated virus – GLRaV*)** - за првпат овој вирус е откриен во далечната 1958 година во Калифорнија, каде што било забележано дека вирусот предизвикува дисколорација на плодовите кај црвените сорти на винова лоза [11]. Припаѓа во фамилијата *Closteroviridae*, во родот *Ampelovirus* каде што припаѓаат девет асоцијативни видови [5].

Штетите предизвикани од *Grapevine leafroll associated virus* се движат во граници од 20 до 40%. Овој вирус најчесто предизвикува промена во бојата на листовите и нееднакво созревање на гроздовите [7,10]. Исто така, симптомите може да вклучат и свиткување на листовите кон внатрешната страна, промена на бојата (поцрвенување кај црвените/црните сорти, пожелтување (хлорозност) кај белите сорти) и некротизирање на одредени делови од листот, и разрушување на фломот [7,10].





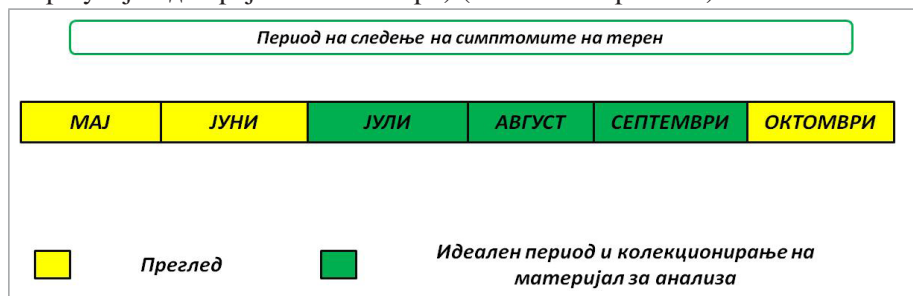
Овој вирус често се појавува во мешана инфекција со други вируси или со друг патоген причинител. Во такви случаи може да предизвикува сушење и изумирање на лозата [7,10]. Теренските анализи на симптомите кај виновата лоза предизвикани од вирусот на свиткување на листовите кај виновата лоза, многу често може да личат со симптоми како резултат на механичко оштетување на стеблото кај виновата лоза, други болести на флоемското ткиво, оштетувања од инсекти и сл. [7,10].

Во нашете истражување направивме детална анализа за присуството на Grapevine leafroll associated virus со посебен акцент на групите GIRaV-1 и GIRaV-3.

## 2. Материјал и метод на работа

### 2.1. Колекционирање на материјалот за анализа во лозовите насади во Република Македонија

За да може да се добие вистинска слика за состојбата со појавата на вирусните промени кај виновата лоза во Република Македонија, континуирано се следеше состојбата на терен од времето на појава на првите симптоми до крај на вегетацијата (почнувајќи од крајот на мај и завршувајќи до крајот на октомври) (шематски приказ 1).



**Шематски приказ 1.**

Годишен период за теренска анализа на лозовите насади во Македонија

**Scheme 1.** Period of field analyzes in the vineyards in Macedonia

Покрај теренската анализа на состојбата со виновата лоза (фотодокументација и забележување на процентот на инфекција), за лабораториско испитување беше собирана симптоматична лисна маса (репрезентативно, 10 листа на примерок). При собирањето на лисна маса за секој примерок посебно се внимаваше да се земаат симптоматични листови, млади и без некротирана нерватура. Вака собраната и задолжително забележана лисна маса (сорта, локалитет, регион, датум) дополнително се подготвуваше во лабораториски услови: се користеше само лисната

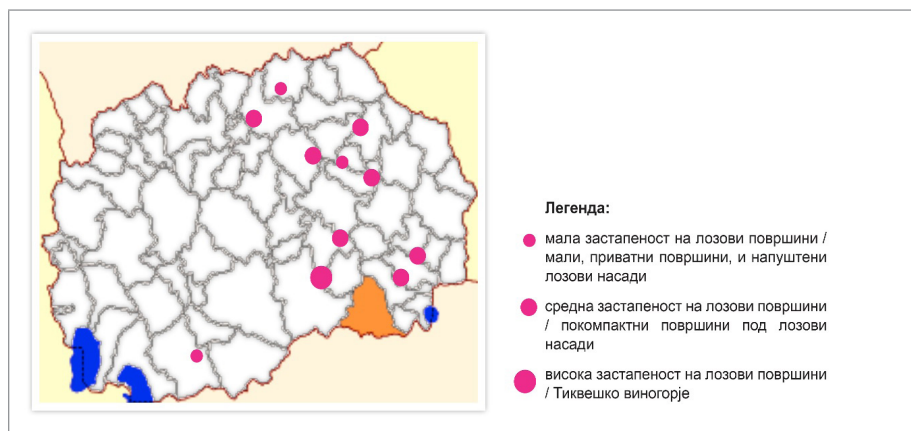


нерватура (1 g по примерок) за испитување на фитоплазми и лисна маса (0.4/0.5 g нерватура или лисни вени) за испитување на присуството на вируси.

При средувањето на материјалот за анализа, постапките беа во следниов редослед:

- по теренско донесување на материјал во лабораторија се вршеше шифрирање на истиот и чување на  $+4^{\circ}\text{C}$  за краток временски период (неколку дена до подготовка за анализа);
- бидејќи се работи за флоемски патогени, од лисната маса се земаше само нерватурата;
- секогаш се одмеруваше во два примерока (оригинален кој се испитува и контролен кој се остава во случај на повторување на анализата);
- средениот материјал се чуваше на температура од  $-20^{\circ}\text{C}$  за период од неколку месеци (додека да се направат анализите) или на температура од  $-80^{\circ}\text{C}$ , за подолг временски период.

На слика 1 се прикажани истражуваните локалитети на територијата на Македонија, според застапеноста на испитуваниот број на лозарски единици.



**Слика 1. Мапа на Македонија - маркирани се испитуваните лозови насади**  
**Figure 1. Macedonian map – mark experimental grapevine fields**

## 2.2. Методи за идентификација на проучуваните патогени

Имајќи ја предвид градбата на патогените кои беа предмет на ова истражување, за нивна дијагностика и идентификација беа користени најсовремени молекуларни лабораториски методи и техники прикажани во табела 1.



**Табела 1. Преглед на културата, испитуваните патогени и користените лабораториски методи на работа**

**Table 1. Culture, pathogens and used laboratory methods of work**

Култура Culture	Патогени Pathogens	Лабораториски методи на испитување Laboratory methods of work
Винова лоза / grapevine <i>Vitisvinifera</i> L.	Вируси / Viruses	1. DAS-ELISA – серолошка детекција на патогените 2. Екстракција на РНК 3. RT-PCR 4. Механичко пренесување на патогените

### 2.2.1. Серолошки метод (ELISA) за испитување на групите на *Grapevine leafroll associated virus*

Еден од методите за потврдување на вирусот на свиткување на листовите кај виновата лоза, GLRaV, кој беше користен за идентификација на сите примероци собрани за анализа беше DAS-ELISA серолошкиот метод (DAS-ELISA, double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay). Во текот на анализите беа користени готови китови од фирмата BIOREBA, Switzerland, со тест протокол за идентификација на комплекс **GLRaV-1+3, (микс GLRaV-1 и GLRaV-3)**, како и поединечни тестови за идентификација на следниве групи: **GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-7**. Освен китови на фирмата BIOREBA, за анализите беа користени и готови китови со антители за сендвич-програмата од SEDIAG, France, со пропишан протокол на работа.

### 2.2.2. Молекуларна реакција на детекција на GLRaV во растително ткиво од виновата лоза - протокол на екстракција на РНК од симптоматично растително ткиво

За изолација на вирусната РНК беа користени два метода на лабораториска работа: првиот метод беше со употреба на готови китови [6], а вториот метод со помош на силика [3]. На крај се проверуваше добиената РНК на спектрофотометар – нанодропна бранова должина од 260 nm за да се одреди концентрацијата. Овој модифициран протокол на екстракција работеше одлично кај дрвенести растителни видови, со посебен акцент „да се работи многу брзо, со цел да се добие поголема концентрација на РНК“.



### Multiplex RT-PCR

За овие анализи беа користени т.н. групи на прајмери кои се користат во Multiplex RT-PCR за детекција на различни групи вируси.

**Табела 2. Секвенци на прајмери употребувани во Multiplex RT-PCR**

**Table 2. Primer sequences used in Multiplex RT-PCR**

Реден број	Име на прајмер	Група на вирус	Секвенца 5' – 3'	Големина на амплифицирани бр (базни парови)
1.1.	18S-M1	GLRaV1	CGCATCATTCAAATTTCTGC	844 bp
1.2.	18S-M2		TTCAGCCTTGCGACCATACT	
2.1.	GLRaV2-CP1	GLRaV2	GGTGATAACCGACGCCTCTA	543 bp
2.2.	GLRaV2-CP2		CCTAGCTGACGGAGATTGCT	
3.1.	GVB-M1	GVB	GTGCTAAGAACGCTTTCACAGC	460 bp
3.2.	GVB-M2		ATCAGCAAACACGCTTGAACCG	
4.1.	ARMV-9	ARMV	TGACAACATGGTATGAAGCACA	402 bp
4.2.	ARMV-10		TATAGGGCCTTTCATCACGAAT	
5.1.	GLRaV3-M3	GLRaV3	TACGTTAAGGACGGGACACAGG	336 bp
5.2.	GLRaV3-N2		TGGGGCATTAATCTTCATGT	
6.1.	GVA-6591F	GVA	GAGGTAGATATAGTAGGACCTA	272 bp
6.2.	GVA-6862R		TCGAACATAACCTGTGGCTC	
7.1.	GLRaV1-M3	GLRaV1	TCTTTACCAACCCCGAGATGAA	232 bp
7.2.	GLRaV1-M4		GTGTCTGGTGACGTGCTAAACG	
8.1.	GFKV-M1	GFKV	TGACCAGCCTGCTGTCTCTA	179 bp
8.2.	GFKV-M2		TGGACAGGGAGGTGTAGGAG	
9.1.	GFLV-M3	GFLV	ATGCTGGATATCGTGACCCTGT	118 bp
9.2.	GFLV-M4		GAAGGTATGCCTGCTTCAGTGG	

Секој од овие прајмерски сетови добро работи и во simplex PCR (единичен), за идентификација само на една група.

Во текот на анализите беа користени и посебни групи на прајмери за одредување на GLRaV 3 група [13] (табела 3).

**Табела 3. Секвенци на прајмери употребувани за одредување на GLRaV 3 група**

**Table 3. Primer sequences used for GLRaV 3 detection group**

Реден број	Име на прајмер	Секвенца 5' – 3'	Големина на амплифицирани бр (базни парови)
1.1.	P3U	5' CGCTCATGGTGAAAGCAGACG-3'	653 bp
1.2.	P3D	5' CTTAGAACAAAAATATGGAGCAG-3'	
2.1.	CP3U	5' ATGGCAITTTGAACTGAAATAGGGC-3'	484 bp
2.2.	CP3D	5' CGGCGCCCATAACTTCTTACA-3'	



### 2.3. Пренесување на вирусите од виновата лоза на зелјести тест-растенија (биотестови)

Механичко пренесување на вирусот на свиткување на листовите кај виновата лоза 1 и 3 група (GLRaV-1 и GLRaV3) беше направено на тест-растенија – тутун *Nicotiana benthamiana* L. Потенцијален извор на групите на вирус кои сакавме да ги пренесеме механички беше лисна маса (нерватура и лисно ткиво), симптоматична и веќе докажана со ELISA тест.

Тест-растенијата беа одгледувани во комора за раст на растенија (BINDERKBW720), со промена на интервалот на светло - темно, за период од 12 часа светло, 12 часа темно, на дневна температура од 25°C, а ноќна температура од 20°C. Инокулацијата беше направена во фаза на 6-8 добро развиени листа (по два месеца од поникнувањето). По инокулацијата тест-растенијата повторно беа вратени во контролирани услови. Пред почетокот на инокулацијата беше направена контрола на целото растение, за да провериме дали растението е здраво и добро пораснато.

## 3. Резултати и дискусија

### 3.1. Симптоматолошки промени кај виновата лоза – теренска анализа

Во текот на визуелниот преглед на лозовите насади беа следени вирусните промени. Во овие испитувања беше следен вирусот на свиткување на листовите кај виновата лоза - *Grapevine leafroll associated virus* (GLRaV) (флоемски патоген).

Врз основа на теренските испитувања и лабораториската потврда на патогенитетот ги истакнуваме следниве генерални ефекти на инфекцијата на виновата лоза со GLRaV:

- свиткување на листовите кон внатрешноста (зависно од осетливоста на сората). Во наши услови ова беше најјасно забележуван симптом кај сортите *вранец*, *црн бургундец*, *мерло*, *станушина*;
- промена на бојата – пожолтување / поцрвенување со задржување на нормална зелена боја околу лисната нерватура. Оваа изразена појава околу лисната нерватура е појасно забележувана кај црвените сорти, но неретко можеше да се забележи и кај белите сорти;
- автохтона сорта *станушина* - симптом на пожолтување на листовите, со изразена жолта пигментација и зелена нерватура, со крути хипертрофирани листови;
- нерамномерно созревање на гроздинките;
- намалени шеќерни единици и губење на квалитетот на грозјето;
- ненавремено и одложено созревање на грозјето.



**Вирусна инфекција кај сортата каберне совинјон (симптоми)**  
беа со јасно изразено црвенило и зелена нерватура на лисната маса, без морфолошка деформација, и со целосно зафаќање на сите листови на една инфицирана лоза, како резултат на ширењето на вирусот низ флоемските спроводни садови (слика 2). Гроздовите беа редуцирани, со јасно забележано одложено зреење и намалени шеќерни единици (кисел вкус). Нарушувањето на васкуларното ткиво кај виновата лоза, како резултат на присуството на GLRaV вирусот, ја намалува силата и ја попречува акумулацијата на шеќери и други метаболити во плодот, и како резултат на тоа има доцно созревање на плодот и намалени шеќерни единици во плодот (слика 2).



**Слика 2.** Сорта *каберне совинјон*, локалитет Велес, Сопот – GLRaV, црвенило на листовите со зелена нерватура и со големи здрави гроздови, но со кисел вкус

**Figure 2.** Cabernet Sauvignon, locality Veles, Sopot - GLRaV, reddening of the leaves with green veins and large, healthy grapes, but sou rtaste

**Вирусна инфекција кај сортата мерло (симптоми)** - беа со јасно изразено црвенило и зелена нерватура на лисната маса, со морфолошка деформација (триаголен изглед), и со делумно зафаќање на сите листови на една инфицирана лоза (слика 3). Гроздовите беа редуцирани, со јасно забележано одложено зреење и намалени шеќерни единици (кисел вкус). Нарушувањето на васкуларното ткиво кај виновата лоза, како резултат на присуството на GLRaV вирусот, ја намалува силата и ја попречува акумулацијата на шеќери и други метаболити во плодот и како резултат на тоа има доцно созревање на плодот и намалени шеќерни единици во плодот или, пак ,во некои случаи воопшто не се формираше грозд.



**Слика 3.** Сорта *мерло*, локалитет с. Аргулица, м.в. Тупанец – вирус на свиткување на листовите кај виновата лоза GLRaV

**Figure 3.** Merlot, locality Argulica, Tupanec-bending strain of the vine leaves GLRaV

**Вирусна инфекција кај сортата *вранец* (симптоми):** беа со јасно изразено црвенило и зелена нерватура на лисната маса, без морфолошка деформација и со целосно или делумно зафаќање на сите листови на една инфицирана лоза, како резултат на ширењето на вирусот низ флоемските спроводни садови. Кај некои лози се забележуваше и целосно поцрвенување на лисната маса на една лоза и на неколку соседни лози, како резултат на присуство на GLRaV вирусот. Гроздовите беа редуцирани, со јасно забележано одложено зреење и намалени шеќерни единици (кисел вкус). Нарушувањето на васкуларното ткиво кај виновата лоза, како резултат на присуството на GLRaV вирусот, ја намалува силата и ја попречува акумулацијата на шеќери и други метаболити во плодот и како резултат на тоа има доцно созревање на плодот и намалени шеќерни единици во плодот (слика 4 а,б).



**Слика 4 а, б.** Сорта *вранец*, локалитет с. Карбинци, м.в. Балабаница – GLRaV, симптоми на лисна маса, со јасна зелена нерватура и нерамномерно созревање на гроздовите

**Figure 4 a.b.** Variety Vranec, locality Karbinici, Balabanitca- GLRaV, symptoms of leaf mass, with clear green veins and uneven ripening of grapes

**Вирусна инфекција кај сортата *станушина* (симптоми):** беа со јасно изразено пожолтување и зелена нерватура на лисната маса, со јака морфолошка деформација (свиткување на листот кон внатрешноста и триаголен изглед), и со целосно или делумно зафаќање на сите листови на една инфицирана лоза, како резултат на ширењето на вирусот низ флоремските спроводни садови. Кај некои лози се забележуваше целосно пожолтување на лисната маса на целата лоза и на неколку соседни лози, како резултат на присуство на GLRaV вирусот. Гроздовите беа редуцирани, со јасно забележано одложено зреење и намалени шеќерни единици (кисел вкус). Нарушувањето на васкуларното ткиво кај виновата лоза, како резултат на присуството на GLRaV вирусот, ја намалува силата и ја попречува акумулацијата на шеќери и други метаболити во плодот, и како резултат на тоа има доцно созревање на плодот и намалени шеќерни единици во плодот (слика 5).





**Слика 5.** Сорта *станушина*, локалитет Кавадарци, м.в. Брловец – GLRaV, силна инфекција на лисната маса, промена на бојата и свиткување на листовите кон внатрешноста

**Figure 5.** Stanusina, locality Kavadarci, Brlovec- GLRaV, strong foliage infection, discoloration of leaves and bending inward

**Вирусна инфекција кај сортата *црн бургундец* (симптоми):** беа со јасно изразено црвенило и зелена или жолта нерватура на лисната маса, со морфолошка деформација, и со целосно или делумно зафаќање на сите листови на една инфицирана лоза, како резултат на ширењето на вирусот низ флоемските спроводни садови (слика 6). Кај некои лози се забележуваше и целосно поцрвенување на лисната маса на една лоза и на неколку соседни лози, како резултат на присуство на GLRaV вирусот (слика 6). Гроздовите беа редуцирани, со јасно забележано одложено зревање и намалени шеќерни единици (кисел вкус). Нарушувањето на васкуларното ткиво кај виновата лоза, како резултат на присуството на GLRaV вирусот, ја намалува силата и ја попречува акумулацијата на шеќери и други метаболити во плодот, и како резултат на тоа има доцно созревање на плодот и намалени шеќерни единици во плодот.



**Слика 6.** Сорта *црн бургундец*, локалитет Штип, м.в. Каваклија – GLRaV, инфекција на лисната маса, црвени листови со триаголен изглед  
**Figure 6.** Black Burgundy variety, locality Stip, Kavaklija- GLRaV, infection of foliage, red leaves with triangular appearance

### 3.2. Серолошка анализа со примена на ELISA методите за докажување на присуството на вирусот на свиткување на листовите кај виновата лоза

Серолошката техника на идентификација на присуство на вирусот на свиткување на листовите кај виновата лоза беше направена со употреба на готови китови на производителите BIOREBA - Switzerland и SEDIAG - France, за докажување на -1, -2, -3 и -7 групите на вирусот.

Детален преглед за утврденото присуство и дистрибуцијата на групите на вирусот на свиткување на листовите кај виновата лоза е даден во табела 4.

Вкупно беа анализирани 382 примероци, кои беа тестирани на сите групи на вирусот на свиткување на листовите кај виновата лоза - GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-7. Од вкупно 382 примероци, 215 беа позитивни на овој вирус на виновата лоза.

Од тестираните групи на вируси, нашите испитувани примероци беа позитивни на leafroll 1 и leafroll 3 групата на вируси. Често пати, во испитуваните примероци добивавме комбинација на двете групи GLRaV-1 + GLRaV-3.



**Табела 4.** Резултати од DAS ELISA методот за присуство на групите на leafroll вирусот

**Table 4.** DAS ELISA results for checking the leafroll viruses groups

Регион Region	Локалитет Locality	Сорта Variety	Лабораториски DAS ELISA резултати Laboratory DAS ELISA results					
			GLRaV 1+3	GLRaV 1	GLRaV 2	GLRaV 3	GLRaV 7	RT-PCR
Штип	с.Три Чешми	<i>вранец</i>	+	+	-	+	-	+
	м.в.Ежово	<i>вранец</i>	+	-	-	+	-	+
	с.Криви Дол	<i>вранец</i>	/	-	-	-	-	-
	с.Ново Село	<i>вранец</i>	+	+	-	+	-	+
	м.в.Каваклија	<i>црн бургундец</i>	+	+	-	+	-	+
	с.Долни Балван	<i>вранец</i>	+	+	-	+	-	+
	с.Батање	<i>вранец</i>	/	-	-	-	-	НТ
Кочан	м.в.Стари лозја	<i>црн бургундец</i>	/	+	-	-	-	+
Караорман	м.в. Балабанци	<i>вранец</i>	/	-	-	+	-	+
Аргулица	м.в. Тупанец	<i>вранец</i>	/	-	-	-	-	НТ
с.Сарчиево	с.Сарчиево	<i>вранец</i>	+	+	-	+	-	НТ
Свети Николе	с.Ерцелија	<i>италијански ризлинг</i>	-	+	-	+	-	НТ
с.Амзабегово с.Пеширово	м.в. Струга	<i>вранец</i>	/	+	-	-	-	НТ
с.Пеширово	с.Пеширово	<i>вранец</i>	+	+	-	+	-	НТ
с.Црнилиште	с.Црнилиште	<i>вранец</i>	+	-	-	+	-	НТ
Овче Поле	приватно лозје	<i>црн бургундец</i>	+	+	-	+	-	НТ
Велес	м.в. Сопот	<i>каберне совинјон</i>	+	-	-	+	-	НТ
Куманово	Кумановско	<i>вранец</i>	+	-	-	+	-	НТ
Валандово	с.Јосифово	<i>вранец</i>	+	+	-	+	-	+
Гевгелија	м.в.Авлаки	<i>франковка</i>	+	-	-	+	-	+
Скопје	м.в. Четири патишта	<i>вранец</i>	+	+	-	+	-	НТ
Битола	Битолско, Лозар	<i>италијански ризлинг</i>	-	-	-	-	-	НТ



продолжение на табела 4

Регион Region	Локалитет Locality	Сорта Variety	Лабораториски DAS ELISA резултати Laboratory DAS ELISA results					
			GLRaV 1+3	GLRaV 1	GLRaV 2	GLRaV 3	GLRaV 7	RT-PCR
Тиквешко виногорје	Кавадарци, с. Чемерско	<i>црн бургундец</i>	+	+	-	-	-	нт
	Кавадарци, с. Крњево, м.в. Брловец	<i>кратошија</i>	+	+	-	-	-	нт
		<i>вранец</i>	+	-	-	+	-	+
	Кавадарци, Раец	<i>вранец</i>	+	+	-	-	-	нт
	Демир Капија	<i>вранец</i>	+	+	-	-	-	нт
	Неготино, м.в. Ило Виларов	<i>вранец</i>	+	-	-	+	-	нт
	Неготино, с. Лепово	<i>вранец</i>	+	+	-	+	-	нт

**+ - позитивни, - негативни; нт – не тестирани; / - не се добиени резултати**

### 3.3. Детекција на групите на вирусот на свиткување на листовите кај виновата лоза со метод на RT-PCR

Присуството на вирусот на свиткување на листовите кај виновата лоза, поточно групите 1 и 3, беше дополнително утврдено со RT-PCR методот како квантитативна конфирмациона анализа. Примената на мултиплекс RT-PCR методот не ги даде очекуваните резултати. Електрофоретската сепарација на добиените продукти даде многу нејасни бандови. Тие според големината одговараат на неколку различни групи флоемски вируси од кои дел се вклучени во истражувањето, а дел од нив сè уште се необјавени. Дополнителните напори за пурификација и раздвојување на продуктите според висината на базните парови не вродија со плод. Затоа, за успешна детекција со помош на реверзно-транскриптивната полимеразна реакција ги користевме истите прајмерски секвенци како за мултиплекс, но во поединечна верижна реакција.

Присуството на GLRaV-1 беше потврдено со RT-PCR со примена на GLRaV1-M3 / GLRaV1-M4 прајмерските парови, кај десет одбрани серолошки позитивни примероци (слика 7). Присуството на GLRaV-2 беше потврдено со RT-PCR со примена на GLRaV2-CP1 / GLRaV2-CP2 прајмерските парови, кај десет одбрани серолошки негативни примероци, затоа што ELISA анализата не даде позитивни примероци за оваа група



(слика 7). И покрај тоа што немавме позитивни за GLRaV-2 вирусот, направивме RT-PCR, за да го потврдиме ELISA тестот.

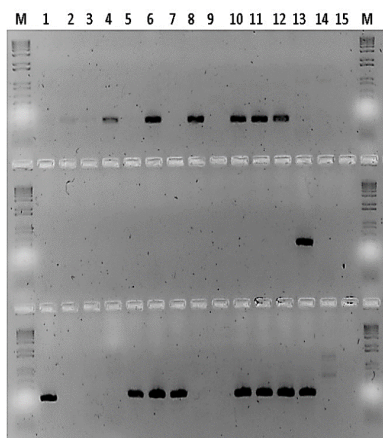
Присуството на GLRaV-3 беше потврдено со RT-PCR со примена на GLRaV3-M3 / GLRaV3-N2 прајмерските парови, кај десет одбрани серолошки позитивни примероци (слика 7). Во табела 5 се дадени детални податоци за неколку примероци кои беа комплетно анализирани, со утврдени: концентрација на изолираната РНК исчитани на спектрофотометар нанодроп: резултати од DAS-ELISA тест и RT-PCR за GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3.

**Табела 5.** Примероци прикажани со комплетна анализа ELISA / RT-PCR  
**Table 5.** Tested samples with complete ELISA / RT-PCR techniques

Ред. бр. Nb.	Шифра на примерок Sample identification	Локалитет / Лозарска единица Locality	Сорта Variety	DAS-ELISA	Екстракција на RNA (Quiagen кит) концентрација	RT-PCR (GLRaV 1) (прајмерски пар M3 и M4) <b>232 bp</b>	RT-PCR (GLRaV2) (прајмерски пар CP1-CP2) <b>543 bp</b>	RT-PCR (GLRaV 3) (прајмерски пар M3 и N2) <b>336 bp</b>
1	31/12	Штип м.в. Ежово	вранец	GLRaV 3	187,6 ng/ul	-	-	+
2	03/12	Гевгелија м.в. Авлаки	франковка	GLRaV 1	158,8 ng/ul	+	-	-
3	05/12	Гевгелија м.в. Авлаки	вранец	GLRaV 3	154,2 ng/ul	+	-	-
4	06/12	Гевгелија м.в. Авлаки	франковка	GLRaV 3	164,5 ng/ul	+	-	+
5	07/12	Гевгелија м.в. Авлаки	вранец	GLRaV 1	187,3 ng/ul	-	-	-
6	09/12	Валандово с. Јосифово	вранец	GLRaV 1	189,7 ng/ul	+	-	+
7	13/12	Валандово с. Јосифово	вранец	GLRaV 3	43,3 ng/ul	-	-	+
8	14/12	Валандово с. Јосифово	вранец	GLRaV 1	77,7 ng/ul	+	-	-
9	22/12	Кавадарци с. Крњево	вранец	GLRaV 3	56,9 ng/ul	-	-	+
10	44/12	Штип м.в. Каваклија	црн бургундец	GLRaV 1	72,6 ng/ul	+	-	-

**Легенда:**

„+“ ----- позитивен примерок  
„-“ ----- негативен примерок



**Слика 7.1%** Агарозен гел на којшто се прикажани резултатите од RT-PCR детекцијата со примена на пражмерски комбинации за GLRaV -1, -2 и -3. Вкупната РНК е прикажана од десет репрезентативни примероци обележани од 1 до 10, со карактеристики за примероците во табела 5. М-маркер (1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen), 11, 12, 13 позитивна контроли GLRaV -1, -2 и -3 од референтни примероци од лабораторијата во Милано, 14 здрав примерок (здрава винова лоза), 15 негативна контрола

**Figure 7.1%** agarose gel showing the results of RT-PCR detection using the prajmerski combinations GLRaV -1, -2 and -3. The total RNA is shown in ten representative samples marked 1-10, features of the samples in Table 5. M -marker (1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen), 11, 12, 13 positive controls GLRaV -1, -2 and -3 of reference samples from the lab in Milan, 14 healthy sample (healthy vines), 15 negative control

### **3.4. Пренос на *Grapevine leafroll-associated virus 1* и *3* (GLRaV-1 и GLRaV3) на тест растенија *Nicotiana benthamiana* L.**

Механичкиот пренос на двете групи на вирусот на свиткување на листовите кај виновата лоза, -1 и -3, резултирало со појава на јасни симптоми кај тест растенијата, споредени во секој однос со негативната контрола. По инокулацијата, тест растенијата контролирано беа следени и фотографирани во текот на целиот процес на следење на развој на симптомите. Првите поинтензивни промени во изгледот на тест растенијата (промени на бојата на лисната маса) беа забележани 20 дена по инокулацијата. Покрај визуелните промени кои јасно се забележуваа на лисната маса (инокулираната и новоформираната), беше направена и конфирмациона DAS - ELISA анализа дијагностика на GLRaV-1 и GLRaV3. Материјалот за лабораториската анализа беше собран по 45 дена од инокулацијата (слика 8). По 45 дена беше направена серолошка реакција ELISA со користење на готови китови BIOREBA, според чекорите на протоколот за докажување на пренесување на вирусот на тест растенијата.



**Слика 8.** Симптоми предизвикани од GLRaV-1 (десно) и GLRaV-3 (лево), по 45 дена од инокулацијата, споредени со негативна контрола – дестилирана вода (во средина)  
**Figure 8.** Symptoms caused by GLRaV-1 (right) and GLRaV-3 (left), after 45 days from the inoculation, compared to the negative control-distilled water (middle)

#### 4. Заклучок

За флоемските вирусни патогени, меѓу кои спаѓа и групата на GLRaV вирусот, кај нас досега не постојат пишани податоци. Со овие истражувања се обидовме да направиме една мапа за присуството и степенот на застапеност на овој вирус кај нас.

Симптоматолошките анализи направени во текот на шестгодишниот период од истражувањето покажаа дека црните вински сорти – *вранец*, *црн бургундец*, *кратошија*, *франковка* имаат најчеста инфекција и јасно изразени симптоми на терен, предизвикани од вирусот на свиткување на листовите кај виновата лоза.

Анализите го потврдија присуството на GLRaV-1 и GLRaV-3. Најчесто застапена е GLRaV-3 група на вирусот (60% од испитуваните примероци), а GLRaV-1 група е застапена со 40%. GLRaV-2 и GLRaV-7, и покрај обидите со модификација на серолошкиот протокол на работа, не беа потврдени. Овие добиени резултати, споредени со литературните податоци за присуството на GLRaV вирусот со групите кои припаѓаат кон овој вирус, покажуваат 20 до 40% застапеност, со посебен акцент на GLRaV-1 и GLRaV-3 група на leafroll вирусот.



При анализите на групите на вирусот беше направено и механичко пренесување на GLRaV-1 и GLRaV3 на тест растенија, тутун – *Nicotiana benthamiana* L, за да се докаже присуството на вирусот на свиткување на листовите кај виновата лоза и да се одржува во лабораториски услови, следејќи ја симптоматологијата и времето на одржување.

Присуството на GLRaV-1, кај десет одбрани серолошки позитивни примероци, беше потврдено и со RT-PCR методот, при што беа користени GLRaV1-M3 / GLRaV1-M4 прајмерските парови. Дополнително, присуството на GLRaV-2, беше утврдено кај десет одбрани серолошки негативни примероци, со помош на RT-PCR методот со примена на GLRaV2-CP1 / GLRaV2-CP2 прајмерските парови. Присуството на GLRaV-3 беше потврдено со RT-PCR методот, со примена на GLRaV3-M3 / GLRaV3-N2 прајмерските парови, кај десет одбрани серолошки позитивни примероци. Вакви истражувања за споредба на големината на геномските секвенци кај различните групи од вирусот на свиткување на листовите кај виновата лоза се правени од страна на голем број научноистражувачки центри и досега постојат бројни публикации за групите на вирусот и нивните карактеристични профили.

## 5. Користена литература

- [1] Borgo M., Angelini E. (2002). Influence de l'enroulement foliaire GLRaV-3 sur les paramètres de la production du Merlot. Bullerin de l'O.I.V., 859-860.
- [2] Cabaleiro C., Seruga A. (1996). Efecto del enrollado de la vid (GLRaV-3) en un vinedo en plena producción del cultivar "Albarino". Investigation Agraria, Produccion y Proteccion Vegetal 11, 451-463.
- [3] Foissac X., Svanella-Dumas L., Gentit P., Dulucq MJ., Candresse T. (2000). Polivalent detection of fruit tree tricho, capillo and foveaviruses by nested RT-PCR using degenerated and inosine containing primers (PRO RT-PCR). 16<sup>th</sup> International Symposium of Virus and Virus-Like diseases on fruit trees. Canterbury p.48. Acta Agricultura, Vol 550, 37-43.
- [4] Hewit W.B. (1970). Virus and Virus diseases of the Grapevine. Review of Applied Mycology 47, 433-455.
- [5] International Committee on Taxonomy of Viruses. (2011). Virus taxonomy. <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2012>
- [6] Mackenzie D. J., McLean M.A., Mukerji S., Green M. (1997). Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by reverse transcription-polymerase chain reaction. Plant Disease 81. 222-226.
- [7] Martelli G.P., Agranovsky A.A., Bar-Joseph M., Boscia D., Candresse





- T., Coutts R.H.A., Dolja V.V., Falk B.W., Gonsalves D., Jelkmann W., Karasev A.V., Minafra A., Namba S., Vetten H.J., Wisler G.C. Yoshikawa N. (2002a). The family *Closteroviridae* revised. *Archives of Virology* 147, 2039-2043.
- [8] Martelli, G.P., Boudon-Padieu, E. (2006). Directory of Infectious Diseases of Grapevines and Viroses and Virus-like Diseases of the Grapevine: Bibliographic Report 1998-2004. *Options Méditerranéennes, Série B: N.55*, pp 297
- [9] Нацрт-стратегија за лозарство и винарство, 2010-2015
- [10] Peake B.K., Mackie A.E., Sivasithamparam K., Habili N., Mckirdy S.J. (2004). First report of grapevine leafroll associated virus 9 (GLRaV-9) in Western Australia. *Australasian Plant Pathology*, 33: 445–446.
- [11] Rowhani A., Uyemoto J.K. (1997): A comparison between serological and biological assay in detecting grapevine leafroll associated viruses. *Plant Disease* 81, 799-801.
- [12] Sforza R., Boudon-Padieu E., Greif C. (2003). New Mealybug Species Vectoring Grapevine Leafroll-Associated Viruses-1 and -3 (GLRaV-1 and -3). *European Journal of Plant Pathology*, Vol 109, 975-981.
- [13] Turturo C., Rott M. E., Minafra A., Saldarelli P., Jelkmann W., Martelli G. P. (2000). Partial molecular characterization and RT-PCR detection of *Grapevine leafroll associated virus 7*. Extended abstracts 13th Meeting of ICVG, Adelaide, Australia, 17-18.
- [14] Voncina D. (2011). Utvrđivanje virusa na autohtonim sortama vinove loze (*Vitis vinifera* L.) u Dalmaciji seroloskim, molekularnim i bioloskim metodama. Sveuciliste u Zagrebu, Agronomski fakultet (doktorska disertacija).



Оригинален научен труд

УДК 665.347.8

## СЕНЗОРНА И АНАЛИТИЧКА ЕВАЛУАЦИЈА НА ЛАДНО-ЦЕДЕНИ МАСЛА ОД СОНЧОГЛЕД

Сања Костадиновиќ Величковска<sup>1\*</sup>, Саша Митрев<sup>1</sup>, Фиданка Илиева<sup>1</sup>,  
Љупчо Михајлов<sup>1</sup>

**Апстракт:** Составот на масните киселини, испарливите компоненти и сензорна евалуација на 16 ладноцедени сончогледови масла беа предмет на ова истражување. Низок удел на мононезаситена олеинска киселина и висок удел на полинезаситена линолеинска киселина (со удел преку 60%) може да предизвика брза оксидација на маслото во споредба со масла кои имаат висок удел на олеинска киселина и да предизвикаат „ужегнат“, „кисел“ или „горчлив“ вкус. Количеството на  $\alpha$ -пинен може да служи како маркер при процесот на производство на ладноцедено сончогледово масло. Овој монотерпен е многу испарлив. Според тоа, екстремно ниски концентрации на овој монотерпен, како и други испитувани монотерпени укажуваат на незадоволителен квалитет на сончогледови зрна или несоодветен третман на зрната пред процесот на ладно цедење.

**Клучни зборови:** ладноцедени сончогледови масла, испарливи компоненти, состав на масни киселини, сензорна евалуација.

## SENSORY AND ANALYTIC EVALUATION OF COLD-PRESSED SUNFLOWER OILS

Sanja Kostadinović Veličkovska<sup>2\*</sup>, Saša Mitrev<sup>2</sup>, Fidanka Ilieva<sup>2</sup>,  
Ljupco Mihajlov<sup>2</sup>

**Abstract:** Fatty acid composition, volatile profile and sensory evaluation of 16 cold pressed sunflower oils were object of this study. Low abundance of monosaturated oleic acid and very high abundance of polyunsaturated linoleic fatty acid (presented in abundance more than 60%) can cause faster oxidation in comparison to high oleic sunflower oils which can induce unpleasant ‘rancid’, ‘sour’ or ‘bitter’ taste. The quantity of  $\alpha$ -pinene can be used as also marker for the process of cold-pressing of sunflower oil. This monoterpene hydrocarbon is very volatile and extremely low level of  $\alpha$ -pinene as well as significant lower concentration of all other monoterpenes can lead us to conclusion that the quality of the seeds is very poor or incorrect pretreatment of the seeds was applied.

<sup>1</sup> Универзитет „Гоце Делчев“, Земјоделски факултет – Штип, Република Македонија  
<sup>2</sup> University Goce Delcev, Faculty of Agriculture – Stip, Republic of Macedonia



**Key words:** *cold-pressed sunflower oils, volatile compounds, fatty acid composition, sensory evaluation*

## 1. Introduction

Vegetable oils are divided in two types. The first one belongs to the oils in terms of energy storage in plants as fatty acids bond in triglycerides, typical for oils derived from different plant seeds. The second one belongs to essential oils which are produced as self-defense or attractant compounds. Most of essential oils are used in flavour industries such as food, beverage, traditional medicine and perfumery because of their terpenic nature. Over 95% of the *Citrus* essential oils are consisted from monoterpenes and sesquiterpenes with domination of limonene as main monoterpene hydrocarbon [1].

Virgin sunflower oil seems to be link between those two types of oil. The sunflower seeds contain fixed oil as the major oil which is mixture of saturated and unsaturated fatty acids mainly bonded as triglycerides and minor quantity of terpenic oil with predominant fraction of monoterpene hydrocarbons [2].

Virgin oils are very popular foodstuff as a 100% natural oils produced only with cold pressing without any step of rafination [3]. Edible oils produced on this way usually had higher concentrations of antioxidant compounds such tocopherols, carotenoids and chlorophylls and stronger impact on human health in comparison to refined oils [4, 5].

It is very well known positive relation between edible oil consumption and reduced risk of coronary hearth diseases, the level of LDL, degenerative diseases and cancer [6]. However, except essential fatty acids and Vitamin E, the chemical composition of edible oils from different plants represents minor grope of phenolic components as special grope of powerful antioxidants responsible for human health benefits [7].

Traditional Balkain cuisine, as well as the other cuisines of South-East European countries, includes sunflower oil as the most used cold-pressed and refined oil for cooking and frying. It has excellent nutritional properties, due to the high level of  $\alpha$ -tocopherol, oleic and linoleic fatty acids. Also, this oil is favorable because of very low level of saturated fatty acids (palmitic and stearic acid) with percentages less than 15%. Abundance of oleic and linoleic acids divide the sunflower oils on two types: high oleic sunflower oils with percentage of oleic acid around 60% and high linoleic sunflower oils with abundance of linoleic acid higher than 80% [8].

However, the most important parameter for the evaluation of the quality of virgin oils is the sensory impression, because more than any other parameter, the appearance and the taste of a product deeply influence the buying decision of the consumer. Cold pressed sunflower oil with acceptable quality has to be



clear oil with pale yellow colour. Typical attributes are sunflower-seed like, terpenic like, citrus like, nutty and sometimes fruity for virgin sunflower oil. Unpleasant flavor of defects in the taste of the oils is usually described as rancid, bitter and sour taste [9].

It is obvious that there are many published papers about volatile compounds in sunflower oils but they are always linked to degree of oxidation [11].

Only few published papers are connected to the volatile fraction of sunflower oil. In the work of Cioni *et al.* the percentages of  $\alpha$ -pinene in two cultivars Carlos and Florom 350 were 53.6 and 43.1 respectively following by other monoterpenes such sabinene,  $\beta$ -pinene and limonene. According to their findings, the fatty acid profile of the cultivar Carlos was dominant linoleic acid with percentage of 58% and the Florom 350 cultivar was dominant oleic acid with percentage of 50.1% [12]. In the work of Krist *at al.*,  $\alpha$ -pinene was used as a marker of adulteration of poppy seed oil with sunflower oil [13].

Oxidation of fatty acid in sunflower oil was object of study in the work of Kockritz and Martin [14]. According to their results, abundance of linoleic acid in high linoleic sunflower oils was in range of 48.3-74 % and abundance of oleic acid in high oleic sunflower oils was in range of 91-92 % [14].

To the best of our knowledge, there are only few published studies on the volatile profile of cold-pressed sunflower oil. At this point of view, this work had two aims. The first aim of this manuscript is to find possible relationship between quantities of five monoterpenes ( $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -pienen, limonene, champhene and  $\alpha$ -phelandrene) and sensory evaluation of the oils and the second aim of the work is to explain how percentages of fatty acid and abundance of monoterpenes can be used as markers of the quality of the seeds from sunflower.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1. Samples**

The first thirteen samples of cold-pressed sunflower oils were commercial oils. Sunflower oils 15 and 16 were cold-pressed in laboratory from the selected seeds with typical musty and fasty flavour.

### **2.2. Reagents and standards**

The standards of monoterpenes  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -pienen, limonene, champhene and  $\alpha$ -phelandrene were purchased from Merck, Germany. SPME cartridge 65  $\mu$ m PDMS/DVB, 50/30  $\mu$ m CRB-DVB-PDMS, 85  $\mu$ m were purchased from Sigma Aldrich, Belgium.



### **2.3. Determination of fatty acid composition**

The fatty acid composition of cold pressed sunflower oils was determined using chiral gas chromatography. The esters were prepared using 2 drops of each oil dissolved in 1 ml of heptane. After addition of 50  $\mu\text{L}$  of sodium methylate with concentration of 2 mol/L, the samples were homogenized. After homogenization, 100  $\mu\text{L}$  of distilled water was added in each sample. Samples were centrifuged and two phases was appeared. The down phase was removed and upper phase was dissolved in 50  $\mu\text{L}$  of 1 M HCl. After second homogenization, the red colour was detected and sodium sulphate anhydride was added in order to remove the water traces. Finally, upper phase was transferred in GC vials and fatty acid methyl esters were analyzed. Fatty acid methyl esters (FAME) were analyzed using a capillary GC equipped with a CP7420 Select FAME column, 100 m x 0.25 mm internal diameter with 0.25  $\mu\text{m}$  film thickness. Analyzes were performed on Agilent 6890 equipped with KAS4Plus and FID. The oven temperature was programmed to increase from 150°C to 240°C with rate of 1.5°C/min and maintained isothermal at 240°C 20 min. The injector and detector temperature were both 260°C. Hydrogen was used as the carrier gas at an average velocity of 25 ml/min. The retention times of separated picks were confirmed by FAME standards.

### **2.4. The extraction of volatile compounds by HS-SPME**

The extraction of free volatiles was performed by application of solid phase microextraction in head-space mode (HS-SPME). Regarding selection of the fibers, the 50/30  $\mu\text{m}$  Carbowax-Divinylbenzene-Polydimethylsiloxan (CRB-DVB-PDMS) fiber was more sensitive than the 85  $\mu\text{m}$  polyacrylate fiber. The contact time between fiber and head-space was 30 min. The most appropriate extraction temperature was 45°C. All analyses were performed in triplicate.

### **2.5. Identification and quantification of monoterpenes in sunflower oils**

The volatile compounds of cold-pressed sunflower oils were analyzed using a HP 6890 GC equipped with a single quad Mass Spectrometer (MS) HP5973 and HP Carbowax cross-linked fused-silica capillary column (i.d. = 0.25 mm, length = 60 m, film thickness = 0.25  $\mu\text{m}$ ). The interface temperature was 280°C; Injector and detector temperatures were set at 260°C, respectively. Acquisition mass range was 40-400m/z and solvent cut 2min. Flame ionization detector was used for quantification of volatile compounds. The temperature gradient was 45°C to 180°C at 3°C/min and then from 180°C to 260°C; Helium was the carrier gas at 35kPa (32 cm/s).

The components of the sunflower oil were identified by comparison of their linear retention indices, with those from pure standards or reported in



literature. Comparison of fragmentation patterns in the mass spectra with those stored on databases and MS data of our collection was also performed.

Quantification of  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -pinene, limonene,  $\alpha$ -phellandrene and champene was performed with external calibration using a standard solution of terpenes (Table 1). Standard solutions used for calibration were prepared in refined sunflower oil with stock solution of 80 mg of monoterpene in 80 mg of refined oil. The standards was mixed with the oil overnight and kept in the dark bottles at room temperature. The calibration curves were established by plotting the area of peaks against different concentrations of monoterpenes with correlation factor given in Table 1.

**Table 1.** Calibration curve of pure standards

Standard of terpenes	Calibration curve	R <sup>2</sup>
$\alpha$ -pinene	$y=224393x-132250$	0.9973
$\beta$ -pinene	$y=95281x+103378$	0.9961
$\alpha$ -phelandrene	$y=79419x+54734$	0.9992
limonene	$y=130416x-52401$	0.9936
camphene	$y=96739x-56442$	0.9985

## 2.6. Sensory evaluation of virgin sunflower oils

According to the standards for sensory evaluation of the working grope of Dr. Mathäus *et al.*, the assessment a scale from 0 (not detectable) to 5 (very strongly perceivable at the level of saturation) was used. Virgin sunflower oil produced from the dehulled seeds with high-quality had very pleasant ‘sunflower seed-like’, ‘nutty’ and sometimes ‘fruity’ taste. According to their opinion, oils from whole seeds have a stronger taste and especially the sensory attributes wood-like, astringent and bitter are predominant, which was not an unpleasant or ‘off’ taste of virgin sunflower oil. On this way, the whole taste and smell of sunflower oils were estimated. However, very frequent unpleasant sensory attributes are described as ‘rancid’, sour ‘fusty’ or ‘musty’. These attributes should not be present in virgin sunflower oil with high quality because the presence of these attributes indicates to failures during storage of the raw material (fusty, musty), during processing (roasty, burnt) or during storage of the oil (rancid).

## 2.7. Statistical analyses

One-way ANOVA and Principal component analysis (PCA) was performed to gain an overview of how the samples were correlated to each other with regard to equilibrium volatile headspace concentration and fatty acid percentages. Correlation matrix was applied in multivariate analysis with



Minitab software release 14 so that the data was auto scaled by variable to give the same weight to all components.

### 3. Results and discussion

Fatty acid composition of the oils is presented in Table 2. Sunflower oils 1 and 10 had the lowest percentage of palmitic acid (3.90%) and the highest percentage had the sunflower oil 3 (7.10 %). Also, sunflower oil 1 and 10 are high-oleic oils with abundance of 83.35% and 81.82% respectively. The abundance of stearic acid in all 16 samples of sunflower oils was in the range between 4.38% and 6.30%. Behenic acid was present in percentages less than 1% in all 16 samples of sunflower oils. All other samples belongs to the high linolenic type of oils with percentage of linolenic acid between 52.32 and 65.61%.

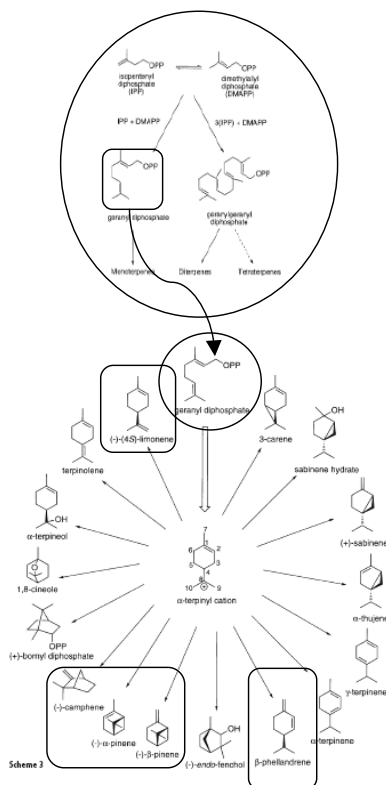
**Table 2.** Fatty acid composition of cold pressed edible oils (%) and relative standard deviations (n=3) of virgin cold pressed sunflower oils

	<b>C16:0</b>	<b>C18:0</b>	<b>C18:1D9</b>	<b>C18:1D11</b>	<b>C18:2</b>	<b>C22:0</b>
<b>Sunflower oil 1</b>	3.90±0.00	4.38±0.05	1.01±0.05	<b>83.35±0.22</b>	<b>5.61±0.01</b>	0.74±0.05
<b>Sunflower oil 2</b>	5.31±0.26	5.21±0.23	0.59±0.15	31.15±0.08	55.98±0.57	0.69±0.09
<b>Sunflower oil 3</b>	<b>7.01±0.01</b>	4.65±0.11	0.74±0.27	25.90±0.11	60.02±0.07	0.54±0.03
<b>Sunflower oil 4</b>	6.71±0.10	5.45±0.00	0.56±0.22	19.97±0.20	65.61±0.01	0.66±0.00
<b>Sunflower oil 5</b>	6.78±0.00	5.31±0.02	0.57±0.18	<b>19.89±0.01</b>	65.91±0.01	0.69±0.00
<b>Sunflower oil 6</b>	6.48±0.07	5.28±0.00	0.85±0.01	24.77±0.03	61.07±0.00	0.66±0.05
<b>Sunflower oil 7</b>	6.53±0.00	5.37±0.04	0.81±0.03	24.87±0.11	60.84±0.14	0.58±0.04
<b>Sunflower oil 8</b>	5.77±0.02	5.66±0.01	0.71±0.06	27.97±0.11	58.67±0.17	0.51±0.01
<b>Sunflower oil 9</b>	6.30±0.00	<b>6.30±0.03</b>	0.63±0.03	27.24±0.03	58.19±0.07	0.52±0.00
<b>Sunflower oil 10</b>	<b>3.89±0.08</b>	4.65±0.03	1.01±0.05	<b>81.82±0.31</b>	<b>7.02±0.26</b>	0.71±0.06
<b>Sunflower oil 11</b>	6.54±0.08	5.69±0.05	0.82±0.03	26.06±0.12	59.44±0.13	0.57±0.00
<b>Sunflower oil 12</b>	6.50±0.18	5.38±0.11	0.98±0.02	25.74±0.12	60.49±0.15	0.52±0.05
<b>Sunflower oil 13</b>	6.39±0.15	5.20±0.08	0.56±0.06	26.76±0.41	59.91±0.07	0.51±0.03
<b>Sunflower oil 14</b>	6.00±0.05	5.07±0.00	0.54±0.05	24.35±0.77	63.02±0.20	0.42±0.02
<b>Sunflower oil 15</b>	6.58±0.09	4.50±0.09	1.02±0.04	33.31±0.13	53.46±0.07	0.61±0.05
<b>Sunflower oil 16</b>	6.76±0.04	4.59±0.01	1.24±0.16	33.91±0.00	52.32±0.19	0.56±0.01

Terpenes as major components of plant essential oils are derived from mevalonic acid pathway. In brief, mevalonic acid is formed by condensation of acetyl-CoA and acetoacetyl-CoA. At the first step is formed 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) which is catalyzed by the enzyme HMG-CoA synthase. In the next step, HMG-CoA reductase (HMGR) catalyses deacylation of HMG-CoA to mevalonate (MVA). Mevalonic acid is converted



to geranylpyrophosphate, the most important precursor of monoterpene biosynthesis pathway. Then, geranylpyrophosphate is further modified to form various monoterpenes and other larger terpenoids (Scheme 1).



**Scheme 1.** Biosynthetic pathway of  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -pinene, limonene,  $\alpha$ -phellandrene and champene

According to the published results,  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -pinene, limonene,  $\alpha$ -phellandrene and champene are the most important monoterpenes, responsible for characteristic citrus-like and terpenic-like flavour of many essential oils [9, 10]. Results from the quantity of those monoterpenes given in Table 3 are in very good correlation with the results in the work of Bocci *et al.* which explain that more than 84% of all volatile compounds belong to  $\alpha$ -pinene. Concentrations of  $\beta$ -pinene, limonene,  $\alpha$ -phellandrene and champene are also in very good correlation with results from the work of Bocci *et al.* [9]

Many published manuscripts had confused results for aroma activity of monoterpenes in food. One part of our work was to estimate the contribution of





each monoterpene in the overall flavor of sunflower oil by gas-chromatography-olfactometry and sniffing of each compound after its eluation from the sniffing port of the FID detector. Although  $\alpha$ -pinene is the major monoterpene in sunflower oil, its aroma potential is not very low and its contribution to the overall flavor of the sunflower oil is minor. In the work of Rychlik *et al.*, odor treshold of  $\alpha$ -pinene in the air is between 18-35 ng/L with typical ‘terpeny’ note which in oils can be recognized as ‘bitter’ taste. However, during its eluation, we consider very weak fresh smell which was minor in comparison to the quantity of this monoterpene in the oil.  $\beta$ -pinene is abundant in much lower concentration and also, its threshold in air is higher than 2000 ng/L. From this result and according to our examination in the range of eluation of this monoterpene, we can conclude that  $\beta$ -pinene cannot contribute in overall flavour and the smell of sunflower oils.  $\alpha$ -phellandrene has much higher odor potential with threshold in air in the range between 40-93 ng/L. Our sniffing impressions in this range of eluation estimated potent ‘fresh’, ‘citrus’ and ‘floral’ smell. This smell was more intense in sunflower oils 3, 8 and 16 with higher concentration of this terpene. Its concentration from 3.51 ppm to 10.19 ppm can be responsible for ‘fruity’ or ‘floral’ smell of this oil. Champhene had higher levels in the same samples including sunflower oil 9. However, during the eluation of this monoterpene, we did not consider potent smell.

The highest abundances of all monoterpenes were presented in sunflower oil 3. Regarding the sensory point of view presented in Table 4, this oils had the highest values for assessment (4 for ‘sunflower seed like’ and 3 for ‘woody like’). However, we cannot conclude that this sensory perception is correlate with the level of monoterpenes, because other sunflower oils had even better sensory properties (4 for ‘sunflower seed like’, 1 for ‘woody like’, 2 for ‘sweet’ and ‘fruity like’ and 2 for ‘nutty’) but, the levels of monoterpenes were not so high. It might be that process of cold-pressing and the quality of the seeds are key factors for the highest quantities of monoterpenes.

The worst taste had sunflower oil 15 with very sour taste (evaluation 4). Regarding the fatty acid profile and the levels of monoterpenes we cannot correlate this taste with some of measured values and probably this oil had failures during storage of the sunflower seeds. The most astringent oil was sunflower oil 4 and the strongest bitter sunflower oil was oil 16. Although many consumers detect the bitterness of the oils as bad taste, the bitterness and astringency can come from the cold-pressing of whole seeds without dehulling or if oils are reach with powerful antioxidant polyphenolic compounds which usually have bitter taste.



**Table 3.** Mean concentrations of free monoterpenes (ppm) and relative standard deviations (n=2) of virgin cold pressed sunflower oils

Sample	$\alpha$ -pinene	Limonene	$\beta$ -pinene	$\alpha$ -phellandrene	Camphene
sunflower oil 1	50.73±1.31	1.05±0.03	1.73±0.31	1.90±0.10	2.35±0.80
sunflower oil 2	98.93±0.31	1.29±0.08	2.93±0.08	2.40±0.10	2.64±0.09
sunflower oil 3	<b>227.01±11.63</b>	2.54±0.01	3.86±0.62	1.19±0.23	1.17±0.12
sunflower oil 4	51.46±0.12	0.73±0.13	3.51±0.29	1.61±0.02	1.80±0.01
sunflower oil 5	52.96±0.78	0.59±0.01	1.86±0.09	1.71±0.02	1.13±0.06
sunflower oil 6	37.31±1.28	0.88±0.04	2.60±0.01	2.33±0.02	2.64±0.03
sunflower oil 7	<b>13.39±0.14</b>	0.61±0.03	<b>0.53±0.01</b>	1.60±0.02	1.37±0.02
sunflower oil 8	90.99±1.85	1.01±0.02	8.10±0.18	<b>4.97±0.13</b>	<b>5.54±0.10</b>
sunflower oil 9	<b>16.92±0.63</b>	1.07±0.04	2.34±0.05	1.37±0.05	<b>7.06±0.08</b>
sunflower oil 10	54.15±0.98	0.88±0.03	4.38±0.03	1.58±0.01	1.48±0.01
sunflower oil 11	36.13±0.90	0.74±0.00	2.22±0.00	1.13±0.00	1.58±0.00
sunflower oil 12	40.37±0.91	0.71±0.00	1.84±0.02	0.88±0.00	1.52±0.00
sunflower oil 13	38.39±1.15	0.71±0.00	1.90±0.01	1.08±0.01	1.51±0.02
sunflower oil 14	<b>4.82±0.45</b>	<b>0.42±0.00</b>	<b>0.30±0.01</b>	<b>0.04±0.00</b>	<b>0.62±0.04</b>
sunflower oil 15	52.47±0.27	0.70±0.01	3.13±0.04	2.17±0.00	2.93±0.00
sunflower oil 16	52.58±0.58	1.09±0.02	5.09±0.05	<b>3.51±0.06</b>	<b>4.69±0.09</b>

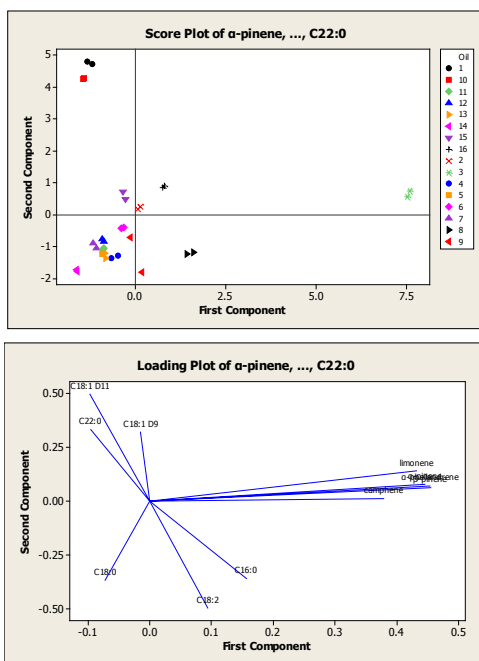
**Table 4.** Sensory evaluation of the taste of cold pressed sunflower oils (Panelist 1 and 2)

	Sunflower seed like	Nutty	Fruity, Sweet	Woody like	Astringent	Bitter	Rancid	Sour
Sunflower oil 1	3	1	2	0	0	0	0	0
Sunflower oil 2	2	2	2	1	0	0	0	0
Sunflower oil 3	2	1	1	3	0	0	0	0
Sunflower oil 4	3	1	1	4	3	2	0	0
Sunflower oil 5	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
Sunflower oil 6	2	1	2	1	1	0	0	0
Sunflower oil 7	2	1	2	1	1	0	0	0
Sunflower oil 8	1	1	1	1	1	1	1	1
Sunflower oil 9	1	1	1	1	1	1	1	1
Sunflower oil 10	1	1	0	1	1	0	0	0
Sunflower oil 11	0	0	0	1	1	2	1	0
Sunflower oil 12	0	1	0	0	0	0	0	0
Sunflower oil 13	1	1	0	0	0	0	0	0
Sunflower oil 14	0	0	0	1	1	1	2	0
Sunflower oil 15	0	0	0	2	2	4	0	4
Sunflower oil 16	1	1	0	3	2	3	0	0



**Table 4.** Sensory evaluation of the taste of cold pressed sunflower oils (Panelist 3 and 4)

	Sunflower seed like	Nutty	Fruity, Sweet	Woody like	Astringent	Bitter	Rancid	Sour
Sunflower oil 1	3	1	2	0	0	0	0	0
Sunflower oil 2	2	1	1	0	0	0	0	0
Sunflower oil 3	2	1	0	1	0	0	0	2
Sunflower oil 4	3	1	0	4	2	1	0	0
Sunflower oil 5	3	1	2	2	2	1	0	0
Sunflower oil 6	2	1	1	1	0	0	0	0
Sunflower oil 7	2	1	1	1	0	0	0	0
Sunflower oil 8	2	0	0	1	1	0	2	1
Sunflower oil 9	2	1	2	0	0	0	0	0
Sunflower oil 10	2	1	0	2	2	0	0	0
Sunflower oil 11	1	0	1	1	0	0	1	1
Sunflower oil 12	1	0	0	1	1	0	0	1
Sunflower oil 13	1	0	0	1	1	0	1	0
Sunflower oil 14	0	0	0	1	1	1	2	0
Sunflower oil 15	1	0	0	3	3	3	0	3
Sunflower oil 16	2	1	0	3	2	3	0	0



**Figure 1.** PCA score and loading plots of monoterpenes and fatty acids in sunflower oils



PCA score plots were used to determine whether sixteen different cold-pressed sunflower oils could be grouped into different classes (Fig. 1). If we compare score plot and loading plot, we can conclude that only for sunflower oil 3 the differentiation or closeness between the volatile flavour compounds directed in positive side of PC 1 was dependent on their quantity values. All monoterpene hydrocarbons namely  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -pinene, limonene, camphene and  $\alpha$ -phellandrene, as volatile compounds, could be classified in one group in PC1, because the coefficients of these volatile compounds were the same positive sign located in PC 1 (Fig. 1). In most cases, the differentiation or closeness between the volatile flavour compounds directed in positive side of PC 1 was dependent on their quantities.

Sunflower oils 16 and 8 were differentiated by the quantity of C18:1 D9 and the quantities of camphene and  $\alpha$ -phellandrene, respectively. As we can see from the table 1, the sunflower oil 16 was differentiated because of the highest percentage of C18:1 D9 with value of  $1.24 \pm 0.16$ . On the other hand, sunflower oil 8 was differentiated because of very high concentrations of  $\alpha$ -phellandrene and camphene with values of  $4.97 \pm 0.13$  ppm and  $5.54 \pm 0.10$  ppm, respectively. Sunflower oils 1 and 10 were differentiated from the other oils and very close on PC 2 because of the highest level of oleic acid and we can classify these oils as high oleic sunflower oils. Also, these oils had lowest and almost identical percentages of palmitic acid. On the basis of their fatty acid profile we can expect that those oils should have the longest oxidation stability.

On the negative part of PC 2 was differentiated sunflower oil 14 because of the lowest percentage of Valeric acid and very low percentage of C18:1 D11 ( $24.35 \pm 0.77\%$ ). Regarding the sensory point of view, this oil is classified as oil with very poor taste and very strong ‘fasty’ and ‘musty’ taste. Two reasons can explain very poor taste and smell of this oil. The first and less important reason is very low concentration of all identified and quantified monoterpenes due to their low impact to the overall flavor of the sunflower oil. On the other hand, more important reason is very low abundance of oleic and very high abundance of linoleic fatty acid. Linoleic acid in this oil (presented as  $63.02 \pm 0.20\%$ ) can cause faster oxidation in comparison with high oleic sunflower oils which can induce unpleasant ‘rancid’, ‘sour’ or ‘bitter’ taste as was general opinion for the taste of this oil. Additionally explanation for very bad sensory characteristic of this oil is extremely low level of  $\alpha$ -pinene ( $4.82 \pm 0.45$  ppm) in comparison to the abundance of concentration of other four estimated monoterpenes.  $\alpha$ -pinene is also marker for the process of cold-pressing [9,10]. This monoterpene hydrocarbon is very volatile and during process of refinement is removed from the oil. Extremely low level of  $\alpha$ -pinene as well as significant lower concentration of all other monoterpenes can lead us



to conclusion that the quality of the seeds is very poor or incorrect pretreatment of the seeds was applied [9,10].

Regarding the bitter taste of the sunflower oil, samples from sunflower oil 15 and 16 had the highest grades (3 and 4) and very sour taste for sunflower oil 15. The strong sour taste cannot be result of the concentration of monoterpenes because the terpenic profile of these oils is very similar to profile of other oils which taste is not described as very sour. The reason might be poor quality of the seeds and laboratory production of the oils with cold-pressing without any stage of seeds pretreatment. Also, during laboratory screw pressing, the process of sedimentation of the oils was excluded. During the process of sedimentation, the waxes and other undesirable compounds responsible for bitter taste are still present in the oils and these compounds might be responsible for ‘bitter’ taste of the oils.

It seems that the best sensory appreciation of sunflower oil 1, 5 and 6 was not related neither by their fatty acid profile neither by their terpenic profile. If we compare results from Tables 1 and 3, we can notice that those oils had very similar and not favorite fatty acid profile with low level of oleic and high level of linoleic acid which can induce instability. Also, terpenic profile of those two oils is similar with higher concentration of  $\beta$ -pinene ( $3.51 \pm 0.20$  ppm) which is not aroma active. However, these oils had grade of 3 for ‘sunflower seed like’ and 4 for ‘woody like’ which can lead us to two conclusions. The first conclusion is connected to the seed pretreatment. Strong ‘woody’ note is usually connected to screw pressing of whole seeds without dehulling. The second conclusion is that neither of five monoterpenes was responsible for typical ‘sunflower-seed’ taste of sunflower oils.

#### 4. Conclusion

Fatty acid composition, volatile profile and sensory evaluation of cold pressed sunflower oils were object of this study. Although  $\alpha$ -pinene was the major monoterpene in all samples, its contribution to the overall taste of the oils is very small. The results from our study we can conclude that  $\beta$ -pinene also cannot contribute in overall flavour and the smell of sunflower oils.  $\alpha$ -phellandrene has much higher odor potential with threshold in air in the range between 40-93 ng/L and its presence in the oils indicated potent ‘fresh’, ‘citrus’ and ‘floral’ smell and taste. This smell was more intense in sunflower oils 3, 8 and 16 with higher concentration of this terpene. The oils which higher level of oleic acid was more stable against oxidation in comparison to high linoleic sunflower oils.



## 5. References

- [1] Kostadinović S., Stefova M., Nikolova D., Nedelcheva D., Martinez N., Lorenzo D., Dellacassa E., Mirhosseini H. (2010). Multivariate analysis discrimination of various cold-pressed lemon oils from different geographical regions, *Journal of Food Agriculture and Environment* 8: 132-136.
- [2] Schwab W., Davidovich-Rikanati R, Lewinsohn E., Biosynthesis of plant-derived flavor compounds. (2008). *The plant journal* 54: 712–732.
- [3] Kostadinović Veličkovska S., Brühl L., Mitrev S., Mirhosseini H., Matthäus B. (2015). Quality evaluation of cold-pressed edible oils from Macedonia, *European Journal of Lipid Science and Technology*. 117: 000-000.
- [4] Kostadinović Veličkovska S., Mitrev S. (2013). Characterization of fatty acid profile, polyphenolic content and antioxidant activity of cold pressed and refined edible oils from Macedonia, *Journal of Food Chemistry and Nutrition* 1: 16-21.
- [5] Varney M. E., Buchanan J. T., Dementieva Y., W. E. Hardman W. E., Sollars V. E. (2011). A high Omega-3 fatty acid diet has different effects on early and late stage myeloid progenitors, *Lipids* 46: 47-57.
- [6] Sullivan T. A. O', Ambrosini G. L., Mori T. A., Beilin L. J., Oddy W. H. (2011). Omega-3 index correlates with reduced cardiovascular disease risk factors in adolescent boys, *Lipids* 46: 59-67.
- [7] Gamazo-Vázquez J., García-Falcón M. S., Simal-Gándara J., (2003). Control of contamination of olive oil by sunflower seed oil in bottling plants by GC-MS of fatty acid methyl esters, *Food Control* 14: 463-467.
- [8] Раџ М., Schein C., Matthaus B. (2008). Virgin sunflower oil. *European Journal Lipid Science and Technology* 110: 618-624.
- [9] Bocci F., Frega N. (1996). Analyses of the volatile fraction from sunflower oil extracted under pressure, *Journal of the American oil chemical society* 73:713-716.
- [10] Bendini A., Barbieri S., Valli E., Buchecker K., Canavari M., Toschi T. G. (2011). Quality evaluation of cold pressed sunflower oils by sensory and chemical analyses. *European Journal Lipid Science and Technology* 113: 1375-1384.
- [11] Keszler A., Kriska T., Nemeth A. (2000). Mechanism of Volatile Compound Production during Storage of Sunflower Oil, *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 48: 5981-5985.
- [12] Cioni P. L., Flamini G., Caponi C., Ceccarini L., Morelli I. (2005). Analysis of volatile fraction, fixed oil and tegumental waxes of the seeds of two different cultivars of *Helianthus annuus*. *Food Chemistry* 90: 713–717.



- [13] Krist S., Stuebiger G., Bail S., Uunerweger H. (2006). Detection of adulteration of poppy seed oil with sunflower oil based on volatiles and triacylglycerol composition, *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 54: 6385-6389.
- [14] Kockritz A., Martin A (2008). Oxidation of unsaturated fatty acid derivatives and vegetable oils, *European Journal Lipid Science and Technology* 110: 812–824.



Оригинален научен труд

УДК 634.21:581.143.5(497.7-11)

## КУЛТУРА НА ЗИГОТСКИ ЕМБРИОНИ ОД КАЈСИЈА (*PRUNUS ARMENIACA* L.)

Фиданка Трајкова<sup>1</sup>, Лилјана Колева-Гудева<sup>1</sup> и Саша Митрев<sup>1</sup>

**Апстракт:** Добивање на *in vitro* регенерирани растенија од касија (*Prunus armeniaca* L.) е важно за производство на подлоги за калемење на висококвалитетни сорти кајсија и за добивање на почетен материјал од кајсија без присуство на болести, посебно вирусот шарка, кој понатаму ќе се користи за калемење и производство на здрави садници. Во ова истражување се користени ембриони извадени од зрели семки на дива кајсија (*Prunus armeniaca* L.) соберени од природни популации или изолирани дрвја во Источна Македонија. MS медиумот збогатен со 1 mg/l BAP + 1 mg/l GA<sub>3</sub>, 1,6 mg/l BAP + 0,3 mg/l GA<sub>3</sub> и 6 mg/l BAP + 1 mg/l GA<sub>3</sub> беше користен како медиум за стимулирање на регенерација на изданоци. Од тестираните регулатори на раст во различни комбинации и концентрации единствено MS + 1 mg/l BAP + 1 mg/l GA<sub>3</sub> даде позитивни резултати. Изненадувачки, поставените експлантанти на медиумот за вкоренување MS + 2 mg/l IBA резултираа со генерирање на корени, калус, новоформирани ембриони и соматски ембриониди.

**Клучни зборови:** кајсија, зиготски ембриони, лисни розети, ембриониди, вкоренување.

## ZYGOTIC EMBRYOS CULTURE FROM APRICOT (*PRUNUS ARMENIACA* L.)

Fidanka Trajkova<sup>2</sup>, Liljana Koleva Gudeva<sup>2</sup> and Sasa Mitrev<sup>2</sup>

**Abstract:** Obtaining *in vitro* regenerated plants from apricot (*Prunus armeniaca* L.) important for production of rootstocks of high quality trait varieties of apricot and for production of starting material for apricot which is disease free, especially from the virus sharka, which will further used for grafting and production of healthy plantlets. In this research are used embryos extracted from mature wild type apricot seeds (*Prunus armeniaca* L.) collected from natural populations and isolated trees in Eastern Macedonia. MS medium with addition of 1 mg/l BAP + 1 mg/l GA<sub>3</sub>, 1,6 mg/l BAP + 0,3 mg/l GA<sub>3</sub> и 6 mg/l BAP + 1 mg/l GA<sub>3</sub> for stimulation of shoots regeneration. From tested

<sup>1</sup> Универзитет „Гоце Делчев“ - Штип, Земјоделски факултет

<sup>2</sup> Goce Delcev University - Stip, Faculty of Agriculture





growth regulators in different combinations and concentrations only MS + 1 mg/l BAP + 1 mg/l GA<sub>3</sub> gave positive results. Surprisingly, explants cultured on the rooting medium MS + 2 mg/l IBA resulted in generation of roots, callus, newly formed embryos and somatic embryoids.

**Key words:** *apricot, zygotic embryos, leaf rosettes, embryoids, rooting.*

## 1. Вовед

Кајсијата (*Prunus armeniaca* L.) најмногу се одгледува во медитеранските земји, Русија, САД, Иран и Пакистан, со вкупна површина во светот од 492.196 ha и вкупно светско производство од 3.956.640 t [1]. Во Република Македонија во 2014 година имало вкупно 181.530 стебла кајсија, од кои 162.399 родни стебла, со вкупно производство од 4.619 t [2].

Во тековните овоштарски практики, размножувањето на кајсијата се врши преку семка, пупки или калемење. Најпогоден метод за размножување на високоприносни сорти кајсија е калемењето, бидејќи ако се користи методот на вкоренување на резници од гранки се соочуваме со проблеми при вкоренувањето. Подлогите за калемење кај кајсијата се добиваат од семки. Користењето на растенијата од *Prunus armeniaca* L. е широко прифатено како подлога за калемење на кајсија. Како дополнување на садници од дива кајсија, можат да се користат и садници од семки од различни генотипови на кајсија. Една од најпосакуваните карактеристики на садниците за калемење е високата 'ртливорост на семките. Дормантноста на семките присутна во регионите со умерена клима го спречува 'ртењето на семките, па за да се надмине овој проблем се практикува стратификација, механичка стратификација, хидролиза во вода, регулатори на раст и аплицирање на витамини [3]. Од друга страна, сите коскести овошни видови, меѓу кои и кајсијата, се осетливи на вирусот шарка или plum rox virus (PPV). Овој вирус е еден од економски најважните болести на коскестото овошје. Иако вирусот е ендемски за Источна Европа, со текот на времето е раширен низ цела Европа, Медитеранот, во последно време на неколку локалитети на западната хемисфера. Неодамна се извршени испитувања поврзани со начинот на наследување на отпорноста на кајсијата кон вирусот на шарка (PPV) како начин за создавање на отпорни сорти и справување со вирусот [4]. Во Република Македонија е утврдено присуство на вирусот шарка кај примероци земени од млад овоштарник на слива што укажува дека заразата настанала во производството на садници [5]. Присуството на вирусот шарка кај млади насади од слива наведуваат дека шарката е присутна и кај насади од кајсија. Сите претходно



наведени факти укажуваат за потребата на воведување *in vitro* методи во создавањето, од една страна на квалитетна подлога за калемење на кајсија, а од друга страна добивање на почетен безвирусен материјал од кајсија што ќе обезбеди садници без присуство на шарка.

Досега не се вршени истражувања за ефектот на факторите во *in vitro* култури врз ртењето на зиготските ембриони соберени од дива кајсија во Република Македонија. Од тие причини, главна цел на ова истражување е да се развие протокол за култивирање на ембриони за дива кајсија како надополнување и алтернатива за веќе постоечките техники за ртење на семки од кајсија. Додатна цел на истражувањето е да се добијат целосно регенерирани растенија од кајсија со *in vitro* техника кои не се инфицирани со вирус на шарка.

## 2. Материјал и методи на работа

Експериментот опишан во овој труд беше спроведен на Катедрата за растителна биотехнологија, Земјоделски факултет при Универзитет „Гоце Делчев“ - Штип, Република Македонија. Како почетен растителен материјал беа користени зиготски ембриони од зрели семки на дива кајсија (*Prunus armeniaca* L.), претходно исушени и извадени од семките на кајсија со внимателно кршење. Семките се соберени од природни популации или изолирани дрвја во Источна Македонија.

### 2.1. Регенерација на изданоци од ембриони на кајсија во *in vitro* услови

Дел од семките и ембрионите беа соодветно третираны со ладен третман на температура од 4°C во времетраење од 15 дена и поставени на MS медиум со определен состав на регулатори на раст. Дел од ембрионите беа извадени од семките и директно беа поставени на MS медиум со определен состав на регулатори на раст.

Ембрионите извадени од семките беа поставени на MS медиум со одредени концентрации на BAP, GA<sub>3</sub> и IBA и беше следен нивниот развој со бележење на соодветните промени. Деталниот опис на составот на MS медиумот збогатен со присуство на одредени концентрации и комбинација од регулаторите на растот е даден во табела 1.

### 2.2. Стерилизација на почетни експлантати – ембриони

Откако ембрионите беа изолирани од семките тие беа површински стерилизирани со:

- потопување во 70% C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH за време од 3 минути,
- потопување во 1,5% Izosan G за време од 10 минути,
- потоа истите беа три пати промиени со стерилна дестилирана вода.



### 2.3. Аклиматизација на растенијата

Аклиматизацијата на регенерантите беше извршена со нивно пренесување на стерилна смеска од перлит и тресет (1:1) во услови со висока влажност. Пред засадувањето во смеската од корењата на регенираните растенија беше убаво исчистен со пинцета вишокот од медиумот, коренчињата беа измиени со дестилирана вода и беа третирани со фунгицид 0,5 ml/l Beveskore. По засадувањето на регенерантите во смеската тие беа третирани со 20 ml 1/2 MS раствор и 20 ml 0,1 mM АВА. На вториот ден од засадувањето на регенерантите на секоја од пластичните чаши е направен по еден отвор, а од третиот ден регенерантите се полевани со 5 ml 1/2 MS раствор.

### 3. Резултати и дискусија

На почетокот на експериментот беше извршен третман со ладно (+4°C) и тоа на:

- семките пред вадењето на ембрионите,
- третман со ладно на ембриони поставени на медиум со регулатори на раст и
- ембриони кои беа директно поставени на медиум со растителни хормони без третман со ладно.

Следењето на развојот на ембрионите во текот на експериментот покажа дека најдобар начин да се прекине дорманцијата на зиготскиот ембрион и да се предизвика *in vitro* реакција се постигнува со третман со ладно на ембриони поставени на хормонален медиум.

Во табела 1 се прикажани резултатите од третманот на изолираните ембриони од семки на кајсија и нивното поставување на MS медиум снабден со соодветна концентрација од регулатори на раст и тоа:

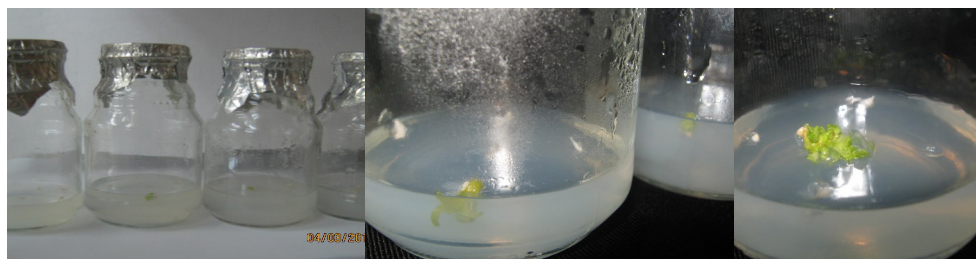
1. MS + 1 mg/l BAP + 1 mg/l GA<sub>3</sub>
2. MS + 1,6 mg/l BAP + 0,3 mg/l GA<sub>3</sub>
3. MS + 6 mg/l BAP + 1 mg/l GA<sub>3</sub>



**Табела 1.** Третман на семки/ембриони и состав на хормоналниот MS медиум за ртење на ембрионите

**Table 1.** Treatment of seeds/embryos and content of hormonal MS medium for embryo germination

Третман на семки/ ембриони Seeds/embryos treatment	Број на семки/ ембриони Number of seeds/embryos	Хормонален MS медиум Hormonal MS medium	Надворешни услови за ртење на ембрионите External conditions for embryos germination
Ембриони поставени во петри садови 15 дена на темно на +4°C	31	1 mg/l BAP + 1 mg/l GA <sub>3</sub>	По 15 дена пренесени на фитотрон, со режим 16 часа светло/8 часа темно
Ембриони поставени во петри садови 15 дена на темно на +4°C	28	1,6 mg/l BAP + 0,3 mg/l GA <sub>3</sub>	По 15 дена пренесени на фитотрон, со режим 16 часа светло/8 часа темно
Семки од кајсија поставени 15 дена на темно на +4°C	55	1 mg/l BAP + 1 mg/l GA <sub>3</sub>	По 15 дена пренесени на фитотрон, со режим 16 часа светло/8 часа темно
Семки од кајсија поставени 15 дена на темно на +4°C	44	1,6 mg/l BAP + 0,3 mg/l GA <sub>3</sub>	По 15 дена пренесени на фитотрон, со режим 16 часа светло/8 часа темно
Ембриони извадени од семки и директно поставени на медиум	49	1 mg/l BAP + 1 mg/l GA <sub>3</sub>	Директно поставени на фитотрон, со режим 16 часа светло/8 часа темно
Ембриони извадени од семки и директно поставени на медиум	37	6 mg/l BAP + 1 mg/l GA <sub>3</sub>	Поставени на фитотрон, со режим 16 часа светло/8 часа темно



**Слика 1.** Про’ртување и формирање лисна розета од ембриони поставени на MS + 1 mg/l BAP + 1 mg/l GA<sub>3</sub>

**Figure 1.** Germination and formation of leaf rosette from embryos cultured in MS + 1 mg/l BAP + 1 mg/l GA<sub>3</sub>



Повеќе различни автори го имаат испитувано влијанието на различни регулатори на раст за регенерација на растенија од различни вегетативни делови на касија и други видови од родот *Prunus* и во најголем дел од истражувањата имаат добиено лисни изданоци [6-8].

По околу еден месец од првичното поставување на ембрионите од касија на MS + 1 mg/l BAP + 1 mg/l GA<sub>3</sub> тие дадоа различни видови регенерации, а *in vitro* органогенезата одеше во правец на формирање на 3 лисни розети, 11 *de novo* формираны регенеранти и 2 соматски ембриоиди (табела 2). Добиените регенеранти беа различно третирани во понатамошниот експеримент. Четири *de novo* формираны регенеранти беа засадени на стерилна смеска од тресет и перлит. Нивниот развој и аклиматизација беа следени во понатамошниот тек на експериментот (слика 1).

**Табела 2.** Ефектот на MS медиумот и различни регулатори на раст на ембрионите од касија по еден месец

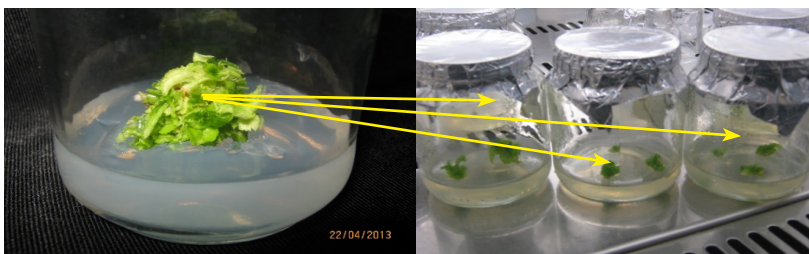
**Table 2.** Effect of MS medium and different growth regulators on apricot embryos after one month

Почетен хормонален MS медиум Starting hormonal MS medium	Резултати по 1 месец Results after 1 month	Број на почетни експлантанти за пасажирање Number of starting explants for sub-culturing
1 mg/l BAP + 1 mg/l GA <sub>3</sub>	3 лисни розети	30 изданоци
1 mg/l BAP + 1 mg/l GA <sub>3</sub>	11 <i>de novo</i> растенија	6 <i>de novo</i> растенија
1 mg/l BAP + 1 mg/l GA <sub>3</sub>	2 соматски ембриоиди	2 соматски ембриоиди (SME0)



**Слика 2.** *De novo* регенеранти засадени во стерилна смеска од тресет и перлит и третирани со ABA регулатор на раст за аклиматизација

**Figure 2.** *De novo* regenerants transplanted into peat and perlite sterile potting mix and treated with ABA growth regulator for acclimatization



**Слика 3.** Лисна розета поделена на поголем број изданоци кои се пасажирани на MS медиум за вкоренување со 2 mg/l IBA

**Figure 3.** Leaf rosette divided into numerous number of shoots which are transferred on MS rooting medium with 2 mg/l IBA (b)

Триесет изданоци добиени од 3 лисни розети, 3 *de novo* регенеранти и 2 соматски ембриоиди беа пасажирани на MS медиум за вкоренување во присуство на ауксинот IBA во концентрација од 2 mg/l (слика 3).

Иако поставени на медиум во присуство на ауксин, кој би требало да фаворизира вкоренување, експлантантите различно реагираа на овој медиумот MS + 2 mg/l IBA. Изданоците дадоа калус и со нивно пасажирање на свеж медиум за вкоренување (MS + 2 mg/l IBA) дадоа 4 *de novo* ембриони. Едно *de novo* растение даде калус, 6 растенија корени, 12 соматски ембриоиди и 1 *de novo* ембрион (табела 3, слика 4, слика 5.). Од достапната литература и истражувања се дадени позитивни резултати поврзани со добивање на *in vitro* регенеранти, нивно вкоренување и успешна аклиматизација, но не и успешни протоколи за регенерација на ембриоиди од *Prunus* видови [9-12].



**Слика 4.** Соматски ембриоиди формирани на *de novo* регенерант на MS + 2 mg/l IBA

**Figure 4.** Somatic embryoids formed on *de novo* plantlet on MS + 2 mg/l IBA



**Слика 5.** Новоформиран калус на лисна розета на MS + 2 mg/l IBA  
**Figure 5.** Newly formed callus on leaf rosette on MS + 2 mg/l IBA

**Табела 3.** Ефектот на медиумот MS + 2 mg/l IBA врз различни типови експлантанти добиени од зиготските ембриони од кајсија по еден месец

**Table 3.** Effect of MS + 2 mg/l IBA on different explants generated from the apricot zygotic embryos after one month

Хормонален MS медиум Hormonal MS medium	Број на експлантанти Number of explants	Резултати по 1 месец Results after 1 month
2 mg/l IBA	30 изданоци	- новоформиран калус на лисните розети - пасажирање на свеж MS медиум + 2 mg/l IBA - 4 <i>de novo</i> ембриони
2 mg/l IBA	6 <i>de novo</i> регенеранти	- калус на 1 регенерант - калус + корени на 6 регенеранти - 11 соматски ембриониди (SME 1) и 1 <i>de novo</i> ембрион од 1 <i>de novo</i> регенерант (ME1) - 1 соматски ембрион (SME 2) од 1 регенерант (ME2)
2 mg/l IBA	2 соматски ембриониди (SME0)	- пасажирање на свеж медиум MS + 2 mg/l IBA

#### 4. Заклучок

Анализата на добиените резултати покажува дека третманот со ладно (4°C) на ембриони поставени на MS хормонален медиум влијае најповолно за прекин на дорманцијата на ембрионот и негово про’ртување.

Од тестирањето на MS медиум обезбеден со различна комбинација на регулатори на раст во дадени лабораториски услови за регенерација на изданоци од ембриони од кајсија (*Prunus armeniaca* L.), единствено



комбинацијата MS + 1 mg/l BAP + 1 mg/l GA<sub>3</sub> даде позитивни резултати. На овој медиум се формираа 3 лисни розети, 11 *de novo* регенеранти и 2 соматски ембриони. За вкоренување на добиените експлантанти беше користен MS медиум со 2 mg/l IBA што резултираше со генерирање на корени, но и на калус, *de novo* ембриони и *de novo* регенеранти. Тоа укажува дека истиот медиум може да се користи за иницирање не само на корени кај регенерантите, туку и за добивање на различен тип на експлантанти и нивно понатамошно *in vitro* истражување. Во текот на експериментот не беше постигната целосна регенерација на соматските ембриони во растенија.

Неколките добиени регенерирани растенија со корен немаа успешна аклиматизација во *in vivo* услови, што значи дека во иднина треба да се подобрат условите за аклиматизација на регенерираните растенија со цел да се добијат растенија што ќе се користат за понатамошна истражувачка и апликативна работа. Аклиматизацијата на регенерираните растенија беше стимулирана и со апликација на апсцизинска киселина (ABA) со цел да се намали транспирацијата и да се зголеми успешноста на адаптацијата на трансферот од *in vitro* во *in vivo*, но во овој случај не покажа повolen ефект.

Методите за работа и резултатите за култура на зиготски ембриони на касијата (*Prunus armeniaca* L.) во *in vitro* услови презентирани во овој труд се првични во Република Македонија, истите укажуваат на фактот дека се потребни долгорочни и дополнителни *in vitro* методи и молекуларни истражувања во комбинација со фитопатолошки анализи за да се добијат подетални резултати кои ќе имаат практична примена во земјоделското производство.

### Користена литература

- [1] FAOSTAT Agriculture (2012). FAO statistical database. <http://www.fao.org/corp/statistics/en/> read on 12.11.2015.
- [2] Полјоделство, овоштарство и лозарство, 2014 (2015). Државен завод за статистика на Република Македонија, стр. 60.
- [3] Yildirim, H., Tilkat, E., Onay, A., Ozen, H.Ç. (2007). In vitro embryo culture of apricot, *Prunus armeniaca* L. cv. Nacihaliloğlu. International Journal of Science & Technology, 2(2), 99-104.
- [4] Karayiannis, I., Thomidis, T., Tsiftaris, A. (2008). Inheritance of resistance to Plum pox virus in apricot (*Prunus armeniaca* L.). Tree Genetics & Genomes, 4(2), 143-148.
- [5] Mitrev, S., Karov, I., Rusevski, R., Kostadinovska, E. (2012). Presence of Plum Pox virus in the Republic of Macedonia. Plant Protection Society of





- the Republic of Macedonia, 23(24/25), 35-40.
- [6] Mante, S., Scorza, R., Cordts, J. M. (1989). Plant regeneration from cotyledons of *Prunus persica*, *Prunus domestica*, and *Prunus cerasus*. Plant cell, tissue and organ culture, 19(1), 1-11.
- [7] Goffreda, J.C., Scopel, A. L., & Fiola, J. A. (1995). Indole butyric acid induces regeneration of phenotypically normal apricot (*Prunus armeniaca* L.) plants from immature embryos. Plant growth regulation, 17(1), 41-46
- [8] Pooler, M. R., Scorza, R. (1995). Regeneration of peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] rootstock cultivars from cotyledons of mature stored seed. HortScience, 30(2), 355-356.
- [9] Lane, W.D., Cossio, F. (1986). Adventitious shoots from cotyledons of immature cherry and apricot embryos. Canadian journal of plant science, 66(4), 953-959.
- [10] Kukharchyk, N., & Kastrickaya, M. (2006). Embryo rescue techniques in *Prunus* L. breeding. Journal of fruit and ornamental plant research, 14, 129.
- [11] Ning, G. G., Bao, M. Z. (2007). Plant regeneration from callus derived from immature embryo cotyledons of *Prunus mume*. HortScience, 42(3), 744-747.
- [12] Nagaty, M. A. (2012). Establishment of regeneration system for Taif peach (*Prunus persica* L. Batsch) cultivar (balady cultivar) in Taif, KSA. J Am Sci, 8(4), 232-239.



Оригинален научен труд УДК 631.453:546.48]:502.174:635.655(497.7)

## ФИТОРЕМЕДИЈАЦИЈА СО СОЈА НА ЗАГАДЕНИ ЗЕМЈОДЕЛСКИ ПОЧВИ СО КАДМИУМ

Љупчо Михајлов<sup>1</sup>, Весна Зајкова Панова<sup>1</sup>, Биљана Балабанова<sup>1\*</sup>

**Апстракт:** Загадувањето на почвата со кадмиум се должи на засилениот индустриски развој, особено во области на ископување, искористување и обработка на минерални сировини. На територијата на Република Македонија има неколку области со значајно високи содржини на кадмиум во почвата, меѓу кои е и околината на Рудникот за олово и цинк „Злетово“, во околината на градот Пробиштип. Фиторемедијацијата е една од најпогодните техники за ремедијација на тешки метали од загадени почви. Целта на ова истражување беше да се утврди ефикасноста на неколку сорти соја за фиторемедијација на земјоделски обработливи почви со повисока содржина на кадмиум. За таа цел беа користени три сорти соја со кратка вегетација: *Pella*, *Avigea* и *OW* во симбиоза со ризобактеријата *Bradyrhizobium japonicum*. Вкупната и достапната содржина на кадмиум беше одредувана во одделни делови на растението (корен, стебло, лист, семе и мешунка). Дополнително беа направени и физичко-хемиски анализи на почвата. Од направените анализи се утврди дека сортите *Pella* и *OW* покажуваат висок потенцијал за фитостабилизација/фитоекстракција на кадмиум од почвата.

**Клучни зборови:** кадмиум, соја, фиторемедијација, почва, загадување.

## SOYBEAN PHYTOREMEDIATION OF CADMIUM POLLUTED AGRICULTURAL SOILS

Ljupco Mihajlov<sup>2</sup>, Vesna Zajkova Panova<sup>2</sup>, Biljana Balabanova<sup>2\*</sup>

**Abstract.** Soil pollution with cadmium is a result of the strengthened industrial development, especially in the areas of drilling, exploitation and processing of mineral raw materials. On the territory of the Republic of Macedonia there are several areas with significant higher content of cadmium in the soil, including the vicinity of the mine lead and zinc “Zletovo” near the town of Probištip. Phytoremediation is one of the most convenient techniques

<sup>1</sup> Земјоделски факултет, Универзитет „Гоце Делчев“, Штип

<sup>2</sup> Faculty of Agriculture, University “Goce Delchev”, Štip, Republic of Macedonia



for remediation of heavy metals from contaminated soils. The main purpose of the present study was to determine the effectiveness of soybean varieties for phytoremediation of agricultural soils with higher content of cadmium. For that purpose, three soybean varieties with short vegetation were used: *Pella*, *Avigea* and *OW* in association with rhizobacterium *Bradyrhizobium japonicum*. The total and available content of cadmium were determined in separate parts of the plant (root, stem, leaf, seed and pod). Additionally, physicochemical analyses were conducted for determination soil properties. The analysis showed that varieties *Pella* and *OW* had higher potential for phytostabilization/ phytoextraction of cadmium from the soil.

**Key words:** *Cadmium, soybean, phytoremediation, soil, pollution.*

## 1. Introduction

Phytoremediation basically refers to use of plants and associated soil microbes for reducing the concentration or toxic effects of contaminants in the environment [1, 2]. It can be used for removal of heavy metals as well as for organic pollutants [3, 4]. Plants generally handle the contaminants without affecting topsoil, thus conserving its utility and fertility. They may improve soil fertility with inputs of organic matter [5]. The term “phytoremediation” is a combination of two words: Greek “phyto” (meaning plant) and Latin “remedium” (meaning to correct or remove an evil). Green plants have an enormous ability to uptake pollutants from the environment and accomplish their detoxification by various mechanisms. Phytoremediation technology is a relatively recent technology with research studies conducted mostly during the last two decades. The concept of phytoremediation (as phytoextraction) was suggested by Chaney [6]. It is suitable for application at very large field sites where other remediation methods are not cost effective or practicable [7]. Phytoremediation has low installation and maintenance costs compared to other remediation options [8]. The establishment of vegetation on polluted soils also helps prevention of erosion and metal leaching [9]. Furthermore, fast-growing and high-biomass producing plants could be used for both phytoremediation and energy production [10]. Phytoremediation also enjoys popularity with the general public as a “green clean” [11]. This method is not hazardous to human health, it is environment friendly and from economic point of view is very cost effective. There are different types of phytoremediation: phytoextraction, phytovolatilization, phytostabilization and rhizofiltration. The most suitable method for Cd extraction of soil is phytoextraction. This method is based on excluding cadmium from soil by plant through water received from the root system, sorption or through some other mechanism. A great number of plant species have been studied in their ability for remediation of Cd from



soil, including several varieties of soybean. Wei et al. [12] reported *S. nigrum* as hyper-accumulator of Cd. Ishikawa et al. in 2006 published results of the research made on two varieties of soybean (cv. Enrei and cv. Suzuyutaka), two varieties of rice (cv. Nipponbare and cv. Milyang 23) and one variety of maize (cv. Gold dent) in their ability for remediation of cadmium from soil [13]. Studies have shown that there are differences in the phytoremediation ability among different varieties of the same culture. Soybean variety “Suzuyutaka” and rice variety “Milyang 23” have been proved as most effective in removing cadmium from the soil, but in soybean falling of leaves after 60 days was observed, at concentration of cadmium from 4.29 mg/kg. Similar studies were made with three varieties of soybean (Enrei, Tsurunoko and Tsukui) [14]. The ideal plant used for phytoremediation should have fast growth, produce large quantities of biomass and have tolerance and ability to accumulate high concentration of metals in the root system or branches. Plants that have been known as good remediators have poor growth and generally produce reduced amounts of biomass when the concentration of available metals in soil is high. One of the alternatives that are offered as a solution is to use a certain plant species that have a low capacity for accumulation of metals, and on the other hand have a high growth, such as *Brassica juncea* [13]. Another alternative is to use plants that have rapid growth in symbiosis with rhizobacteria [15]. This kind of combination between plant and rhizobacteria is expected to show high efficiency for remediation [16].

Soil pollution with cadmium is a major problem in the world. In Republic of Macedonia there are approximately 1000 ha in the region along the Zletovska river contaminated with cadmium [17]. Therefore, the main purpose of this study is to evaluate the efficiency of three soybean varieties with short vegetation in incorporation with rhizobacterium *Bradyrhizobium japonicum* for cadmium phytoextraction/phytostabilization.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Field settings

The experiment was set up in an open field conditions with selected soybean varieties with short vegetation (*Pella*, *Avigea* and *OW*). The experiment was performed in appropriate pots for growing soybeans set according to the method of randomized block system, with duration from June to October, 2011. The soil, where the soybean seeds were planted, was collected from the surface layer (0-15 cm) downstream from the potentially polluted area from Zletovska river. Five locations were selected, wherefrom the soil was collected (Z1, Z2, Z3, Z4 and Z5). This is an area where the Pb-Zn mine “Zletovo” is operating for more than 20 years. Many studies have shown that this is an area with polymetallic pollution [17]. Four seeds of each variety were sown in each



container and reduced into two plants after growing. Before the sowing, seeds were treated with a suspension of rhyzobacterium *Bradyrhizobium japonicum*.

## 2.2. Soil sampling and analysis

Soil properties [pH, cation exchange capacity (CEC), electrical conductivity (EC), organic matter (OM), soil texture, available potassium and phosphorus, total and available Cd] were examined before planting of soybean seeds. Standard reference methods were applied for soil pretreatment [18-20].

## 2.3. Soybean analysis

Total cadmium content was determined in specific plants parts (root, stem, leaves and seeds), for each soybean varieties: “Pella”, “Avigea” and “OW”. After vegetation, plants were collected and brought to the laboratory. Every plant was washed with distilled water and dry to a constant mass. Each plant part was separated from each other and mild. The total digestion of the samples was performed using open wet digestion method with a mixture of 5 mL hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ , 33%w/w, with ultra-trace purity, Sigma Aldrich, Germany) and 10 mL nitric acid ( $HNO_3$ , 69 %w/w, with ultra-trace purity, Sigma Aldrich, Germany). The inductively coupled plasma mass spectrometer (ICP-MS, model 7500cx, Agilent technologies, USA) was used for cadmium content measurements.

## 3. Results and discussion

Large number of factors control the metal accumulation and bioavailability associated with soil and climatic conditions, plant genotype and agronomic management, including: active/passive transfer processes, sequestration and speciation, redox states, the type of plant root system and the response of plants to elements in a relation to seasonal cycles. Structure of the sediment has also been considered very important that affect the extent of the metals taken up by the plants. Clay particles also play an important role in availability of the metals. Metals solubility in soils is predominantly controlled by pH, amount of metals cations exchange capacity, organic carbon content and oxidation state of the system [21]. The basic chemical/mechanical parameters determined in this study for the soil composition are given in Table 1. Soil 1 (Z1), was sandy loam with pH of 6.9, EC of 0.4 mS/cm and 1.4% organic matter. Second and third soil (Z2 and Z3) very similar to Z1, were sandy loam with pH of 6.0 and 6.9, with lower cationic exchange capacity (2.5 and 0.3 cm/mol, respectively) compared to Z1 (9.1 cm/mol). The total cadmium content in the first three soils (Z1, Z2 and Z3) was determined as 2.3, 4.2 and 1.3 mg/kg, respectively; while the available content of Cd was 1.1, 2.3 and 0.84 mg/kg, respectively for Z1, Z2 and Z3 soil. Considering this, the calculated



activity ratio for the bioavailable content of cadmium in these soils was 48% for Z1, 54% for Z2 and maximum ratio was obtained for Z3 (64%). Soil of sites 4 and 5 was loamy sand with dominant soil texture class and very similar pH (3.3). Higher pH may restrain the absorbability of elements from the soil solution and translocation into plant tissues [14]. The significant differences occurred for electrical conductivity (EC), observing values of 12.1 mS/cm for Z4 and 2.37 mS/cm for Z5. Maximum value for the organic matter content was obtained for Z4 soil (5.24%). The total cadmium content in Z4 soil was 17.6 mg/kg, while the available content of cadmium was 3.9 mg/kg. Therefore, the activity ratio for the cadmium in Z4 soil was 22%, compared to the first three soils is significantly lower. Minimum value for cadmium content was obtained for Z5 soil (0.97 mg/kg). The available content of cadmium in this soil was 0.32 mg/kg, which gives 32% activity ratio.

**Table 1.** Chemical/mechanical soil composition from Zletovska River region (n=5/5)

Soil parameters	Determined Range	Median
Cation exchange capacity, CEC (cm/mol)	0.3-9.8	5.7
Electrical conductivity, EC (msS/cm)	0.22-12.1	1.72
pH/KCl	3.2-6.9	3.2
Organic matter, OM (%)	0.92-5.24	1.47
K <sub>2</sub> O (mg/100g)	1.4-15.3	4.9
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (mg/100g)	1.4-12	3.4
Total Cd (mg/kg)	0.97-17.6	2.3
Available Cd (mg/kg)	0.32-3.9	1.1
Loam (%)	0.01-10.2	1.9
Sand (60-2000 μm)	69.5-97.2	78.7

Considering the basic chemical/mechanical parameters for soil composition, bivariate analysis was applied to investigate the correlations between these parameters. For that issue the linear coefficient of correlation was used. Matrix of the dominant correlation coefficients is given in Table 2. The significant correlation data ( $r > 0.50$ ) are given as bolded values. The available content of cadmium is significantly correlated with soil pH and electrical conductivity of soil solution. Increased soil pH may reduce the availability of Cd<sup>2+</sup> to plants through increased adsorption at cation exchange sites. Soil organic matter can either increase or decrease the availability of Cd<sup>2+</sup> by binding it, or increasing its mobility.



**Table 2.** Matrix of correlation coefficients (soil properties)

<b>CEC</b>	1.00								
<b>pH</b>	0.27	1.00							
<b>EC</b>	<b>0.62</b>	-0.40	1.00						
<b>OM</b>	<b>0.91</b>	0.43	0.49	1.00					
<b>Loam</b>	-0.01	0.31	-0.34	-0.15	1.00				
<b>Sand</b>	0.05	0.28	-0.03	0.27	<b>-0.75</b>	1.00			
<b>K<sub>2</sub>O</b>	<b>0.85</b>	<b>0.58</b>	0.31	<b>0.96</b>	-0.01	0.25	1.00		
<b>P<sub>2</sub>O<sub>5</sub></b>	<b>0.86</b>	<b>0.53</b>	0.36	<b>0.97</b>	-0.19	0.39	<b>0.95</b>	1.00	
<b>Av(Cd)</b>	0.01	<b>-0.54</b>	<b>0.67</b>	-0.15	-0.29	-0.04	-0.26	-0.28	1.00
	<b>CEC</b>	<b>pH</b>	<b>EC</b>	<b>OM</b>	<b>Loam</b>	<b>Sand</b>	<b>K<sub>2</sub>O</b>	<b>P<sub>2</sub>O<sub>5</sub></b>	<b>Av(Cd)</b>

Crops vegetate on the Z1, Z2, Z3 and Z5 soils, while seeds planted on Z4 soils didn't sprout. Values for total content of cadmium in separate plants parts (stem, leaf, root, seed and pod) are given in Table 3. In plant roots, the Cd total content was highest in *OW* variety root (5.41 mg/kg) from Z5 soil and lowest in *Avigea* (0.15 mg/kg). In general, total Cd content in all variety samples were greater in shoots (green parts above root) than in roots. Total Cd content in stem ranged between 0.13 to 7.7 mg/kg (Table 3). Maximum value for Cd was obtained for *Pella's* variety leaf (13.5 mg/kg). Very similar data were obtained for *OW's* leaf too (13.4 mg/kg). These varieties were also characterized with higher Cd content in seed and pod compared to *Avigea* variety. Maximum value for Cd content in seed (2.6 mg/kg) was obtained for *OW's* variety from soil Z5. For the same variety 3.52 mg/kg of Cd in pod was obtained.

**Table 3.** Total content of Cd in soybean varieties with short vegetation in different parts of plants (values given in mg/kg)

	<i>Avigea</i>					<i>OW</i>					<i>Pella</i>				
	Root	Stem	Leaf	Seed	Pod	Root	Stem	Leaf	Seed	Pod	Root	Stem	Leaf	Seed	Pod
<b>Z1</b>	0.15	0.37	1.20	0.27	0.36	0.75	0.96	6.02	0.77	1.70	0.57	1.09	4.60	0.49	0.88
<b>Z2</b>	0.33	0.55	1.43	0.39	0.91	3.34	6.29	13.4	0.95	3.35	0.63	0.65	1.72	0.45	0.70
<b>Z3</b>	0.26	0.13	0.84	0.08	0.10	1.27	1.31	2.42	0.61	0.79	4.52	4.72	13.5	1.29	3.52
<b>Z5</b>	0.42	1.45	3.10	0.36	0.93	5.72	7.73	7.60	2.57	5.41	4.92	2.55	7.87	0.94	1.85



Translocation factor (TF), Biological Accumulation Coefficient (BAC) and Biological Concentration Factor (BCF) values were used to evaluate the potential of plant species for phytoextraction and phytostabilization of the soybean varieties with short vegetation [22, 23]. Biological accumulation coefficient was calculated as a ratio of heavy metal in shoots to that in soil [22]. The BAC for *Avigea* variety ranged from 0.14 to 9.65 for different plant parts (Table 4). The *OW* and *Pella* varieties showed better accumulation ability for Cd, considering these varieties more suitable for phytostabilization. For the *OW*'s stem and leaf BAC was 24.1 and 23.7, respectively, while for *Pella*'s leaf ranged from 0.76-24.5 (Table 4). BCF was also calculated as a metal concentration ratio of plant roots to soil [23]. Phytostabilisation is a process which depends on roots ability to limit the contaminant mobility and bio-availability in the soils which occurs through the sorption, precipitation, complexation or metal valance reduction [21]. Heavy metals tolerant species with high BCF and low TF can be used for phytostabilisation of contaminated soils. The *Avigea* variety showed lower BCF (<1) vs. *OW* and *Pella* varieties.

**Table 4.** Biological Accumulation Coefficient (BAC) and Biological Concentration Factor (BCF) in soybean varieties

	<i>Avigea</i>					<i>OW</i>					<i>Pella</i>				
	Root	Stem	Leaf	Seed	Pod	Root	Stem	Leaf	Seed	Pod	Root	Stem	Leaf	Seed	Pod
<b>Z1</b>	0.14	0.34	1.10	0.25	0.33	0.68	0.88	5.51	0.70	1.56	0.52	1.00	4.22	0.45	0.80
<b>Z2</b>	0.15	0.24	0.63	0.17	0.40	1.48	2.78	5.94	0.42	1.48	0.28	0.29	0.76	0.20	0.31
<b>Z3</b>	0.31	0.15	1.00	0.10	0.12	1.52	1.56	2.89	0.73	0.94	5.39	5.63	16.1	1.53	4.20
<b>Z5</b>	1.31	4.51	9.65	1.11	2.88	17.8	24.1	23.7	8.01	16.9	15.3	7.95	24.5	2.94	5.76

Translocation factor (TF) was described as a ratio of heavy metals in plant shoot to that in root [22, 23]. These soybean varieties had high biomass and based on the high TF values could have enormous potential to be used for phytoextraction of Cd than other species which also showed TF>1 for different metals. Higher cadmium accumulation may be attributed to well develop detoxification mechanism based on sequestration of cadmium ions in vacuoles, by binding them on appropriate ligands and metal exclusion strategies of soybean varieties [21]. For the analysed soybean varieties translocation factor values above 1 was obtained.





**Table 5.** Translocation Factor (TF) in soybean variety (*Avigea*, *OW* and *Pella*)

	Stem	Leaf	Seed	Pod
<b>Min</b>	0.49	1.33	0.19	0.38
<b>Max</b>	3.44	8.05	1.81	2.72
<b>Median</b>	1.28	3.22	0.48	1.00

#### 4. Concluding remarks

The present investigation revealed that soybean varieties with short vegetation, *OW* and *Pella* could be efficient plants for phytoextraction of Cd from contaminated soil. Highest efficiency of Cd phytoextraction occurred when soil was contaminated. The soybean variety *Avigea* showed lower ability for phytostabilization and phytoextraction. Both, BAC and TF values higher than 1 indicated that *OW* and *Pella* are potentially useful for remedying Cd-contaminated soil and can be introduced as a good potential Cd-hyper accumulator plants.

#### 5. References

- [1] Greipsson, S. (2011). Phytoremediation. *Nature Education Knowledge*, 3(10), 7.
- [2] Ali, H., Khan, E., Sajad, M.A. (2013). Phytoremediation of heavy metals concepts and applications. *Chemosphere*, 91(7): 869-881.
- [3] Sarma, H. (2011). Metal hyperaccumulation in plants: a review focusing on phytoremediation technology. *Journal of Environmental Science and Technology*, 4(2), 118-138.
- [4] Vithanage, M., Dabrowska, B. B., Mukherjee, A. B., Sandhi, A., Bhattacharya, P. (2012). Arsenic uptake by plants and possible phytoremediation applications: a brief overview. *Environmental Chemistry Letters*, 10(3), 217-224.
- [5] Mench, M., Schwitzguébel, J. P., Schroeder, P., Bert, V., Gawronski, S., Gupta, S. (2009). Assessment of successful experiments and limitations of phytotechnologies: contaminant uptake, detoxification and sequestration, and consequences for food safety. *Environmental Science and Pollution Research*, 16(7), 876-900.
- [6] Chaney, R.L.(1983). Plant uptake of inorganic waste constituents. In: Parr, J.F.E.A. (Ed.), *Land Treatment of Hazardous Wastes*. Noyes Data Corp., Park Ridge, NJ, 50-76.
- [7] Garbisu, C., Alkorta, I. (2003). Basic concepts on heavy metal soil bioremediation. *European Journal of Mineral Processing and Environmental Protection*, 3(1), 58-66.
- [8] Van Aken, B. (2009). Transgenic plants for enhanced phytoremediation of toxic explosives. *Current Opinion in Biotechnology*, 20(2), 231-236.
- [9] Chaudhry, T. M., Hayes, W. J., Khan, A. G., Khoo, C. S. (1998).



- Phytoremediation-focusing on accumulator plants that remediate metal-contaminated soils. *Australasian Journal of Ecotoxicology*, 4(1), 37-51.
- [10] Abhilash, P. C., Powell, J. R., Singh, H. B., Singh, B. K. (2012). Plant-microbe interactions: novel applications for exploitation in multipurpose remediation technologies. *Trends in Biotechnology*, 30(8), 416-420.
- [11] Pilon-Smits, E. (2005). Phytoremediation. *Annual Reviews of Plant Biology*, 56, 15-39.
- [12] Wei, S., Q. Zhou, and P.V. Koval. 2006. Flowering stage characteristics of cadmiumhyperaccumulator *Solanum nigrum* L., and their significance to phytoremediation. *Science of the Total Environment*, 369, 441-446.
- [13] Ishikawa, S., Noriharu, A. E., Murakami, M., Wagatsuma, T. (2006). Is *Brassica juncea* a suitable plant for phytoremediation of cadmium in soils with moderately low cadmium contamination?–Possibility of using other plant species for Cd-phytoextraction. *Soil Science and Plant Nutrition*, 52(1), 32-42.
- [14] Li, M.S., Luo Y.P., Su, Z.Y. (2007). Heavy metal concentrations in soils and plant accumulation in a restored manganese mine land in Guangxi, South China. *Environmental Pollution*, 147:168-175.
- [15] Glick, B. R. (2003). Phytoremediation: synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment. *Biotechnology Advances*, 21(5), 383-393.
- [16] Abou-Shanab, R. A., Angle, J. S., Delorme, T. A., Chaney, R. L., Van Berkum, P., Moawad, H., et al., Ghozlan, H. A. (2003). Rhizobacterial effects on nickel extraction from soil and uptake by *Alyssum murale*. *New Phytologist*, 158(1), 219-224.
- [17] Boev, B., & Lepitkova, S. (2004). Tertiary intrusive rocks in the central part of the Vardar zone. In *5th International Symposium on Eastern Mediterranean Geology*, 3, 1095-1097.
- [18] ISO 11464:1994, Soil quality- Pretreatment of samples for physico-chemical analysis.
- [19] ISO 11464:2006, Soil quality - Pretreatment of samples for physico-chemical analysis.
- [20] ISO 14869-1:2001 Soil quality - Dissolution for the determination of total element content - Part 1: Dissolution with hydrofluoric and perchloric acids.
- [21] Ghosh, M., Singh, S.P. (2005). A review on phytoremediation of heavy metals and utilization of its byproducts. *Applied Ecology and Environmental Research*, 3, 1-18.
- [22] Cui, S., Zhou, Q., Chao, L. (2007). Potential hyper-accumulation of Pb, Zn, Cu and Cd in endurant plants distributed in an old smeltery, northeast China. *Environmental Geology*, 51, 1043-1048.
- [23] Yoon, J., Cao, X., Zhou, Q., Ma, L.Q. (2006). Accumulation of Pb, Cu, and Zn in native plants growing on a contaminated Florida site. *Science of the Total Environment*, 368, 456-464.





Оригинален научен труд

УДК 663.2:[546.815.027:543.51  
664.32:[546.815.027:543.51

## ОДРЕДУВАЊЕ НА ИЗОТОПИ НА ОЛОВО ВО ВИНО И МАСЛО ЗА ЈАДЕЊЕ СО ПРИМЕНА НА ИНДУКТИВНО СПРЕГНАТА ПЛАЗМА СО МАСЕНА СПЕКТРОМЕТРИЈА

Биљана Балабанова<sup>1\*</sup>, Саша Митрев<sup>1</sup>, Виолета Иванова-Петропулос<sup>1</sup>,  
Рубин Гулабоски<sup>1</sup>

**Апстракт:** Преку определувањето на односот на изотопите на олово може да се добие информација за изворот на загадување со олово во примероци од животната средина. Од друга страна, овие анализи можат да обезбедат корисна информација за географското потеклото на анализираните примероци. Многу мали варијации во изотопскиот однос се јавуваат во природата и тоа најчесто зависат од некои локални извори на загадување. Индуктивно спрегната плазма со масена спектрометрија (ICP-MS) беше користена како работна техника, со цел да се утврди дали оваа техника е соодветна во практично справување со полиатомските интерференци при анализата на органски матрикси. Овој труд опфаќа оптимизација на инструменталната метода за мерење на изотопите на олово во дигестирани примероци на вино и масло за јадење. Покрај тоа, изотопските односи на олово беа одредени во примероци од исто и различно географско подрачје. Вкупната концентрација на олово во испитуваните примероци на вино се наоѓа во опсегот од 3,74-16,3  $\mu\text{g/L}$ , не надминувајќи ги максимално дозволените концентрации за олово во вино (200  $\mu\text{g/L}$ ). Вредностите за односите на концентрациите на изотопите  $^{207}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$  и  $^{208}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$  се наоѓаат во опсег од 0,98 – 1,12 и 2,22 – 2,99, соодветно. Вкупната содржина на олово во примероците на масло за јадење се наоѓа во опсегот од 18,3 до 29,6  $\mu\text{g/kg}$ , не надминувајќи ги максимално дозволените концентрации за олово во масло за јадење. Статистички значајна разлика помеѓу вредностите за односите на концентрациите на изотопите  $^{207}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$  и  $^{208}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$  е утврдена за примероците со различно географско потекло.

**Клучни зборови:** *изотопи на олово, вино, масло за јадење, ICP-MS.*

<sup>1</sup> Земјоделски факултет, Универзитет „Гоце Делчев“, Штип, Р. Македонија



## ISOTOPIC LEAD MEASUREMENTS IN WINE AND EDIBLE OIL USING INDUCTIVELY COUPLED PLASMA WITH MASS SPECTROMETRY

Biljana Balabanova<sup>2\*</sup>, Sasa Mitrev<sup>2</sup>, Violeta Ivanova-Petropulos<sup>2</sup>,  
Rubin Gulaboski<sup>2</sup>

**Abstract:** Lead isotope ratios provide analytical information related to the source of lead contamination in naturally occurring samples. On the other hand, these measurements can provide useful information for routine means of “fingerprinting” the components grown in different habitats. Small Pb isotope abundance variation occurs in nature and the isotopic composition of lead in the environment is dependent on the local pollution sources. In this study, inductively coupled plasma with mass spectrometry (ICP-MS) was used to investigate whether this chemical application can offer a reliable and practical solution to the problem of the polyatomic overlap in the presence of organic based matrix samples. The study summarizes the instrument optimization procedure for Pb isotope measurements in wine and edible oil samples. Also, the isotopic ratios were presented for samples from same and from different geographical region. The total lead concentration in wine samples ranges from 3.74-16.3 µg/L, not exceeding the maximum allowable concentrations of lead in wine (200 µg/L). Values for the isotopes concentration ratios  $^{207}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$  and  $^{208}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$  ranges from 0.98-1.12 and 2.22-2.99, respectively. The total lead content in edible oil samples ranges from 18.3 to 29.6 µg/kg, not exceeding the maximum allowable concentrations of lead in edible oil (100 µg/kg). Statistically significant differences between the values for the isotopes concentration ratios  $^{207}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$  и  $^{208}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$  were determined for samples from different geographic origin.

**Kew words:** *lead isotope, wine, edible oil, ICP-MS.*

### 1. Introduction

Due to the complex environmental chemistry, transport patterns, meteorological conditions, the mixing of emissions from multiple sources, and uncertainties associated with receptor modeling, it remains difficult to quantify the relative impact of emissions from different sources on metal accumulation in different food stuffs [1, 2]. The emission and deposition of hazardous trace metals such as lead (Pb) is of significant concern because it can affect human and environmental health [3, 4]. Lead isotope ratio analysis is important as it is used for Pb-Pb dating in geochronology, and to trace the

<sup>2</sup> Faculty of Agriculture, “Goce Delčev” University, Stip, R. Macedonia



origin of artifacts, precious metals and even foodstuffs [5, 6]. Lead isotope ratio measurement can provide analytical information related to the source of lead contamination in naturally occurring samples [7]. Studies of the isotopic composition of lead are therefore commonly used in the environmental, geological and anthropological studies [8]. Small Pb abundance variations occur in nature and the isotopic composition of lead in the environment is dependent on the local pollutant source. If lead is present in the soil, a plant will take up small amounts and subsequent isotope ratio studies might provide unique means of differentiating between different plant sources of origin [6]. Local lead level may become mixed with external source of contamination that vary with time depending on the anthropogenic activity. There are four stable isotopes of Pb with the following approximate abundances:  $^{208}\text{Pb}$  (52.4%),  $^{207}\text{Pb}$  (24.1%),  $^{206}\text{Pb}$  (22.1%), and  $^{204}\text{Pb}$  (1.4%).  $^{204}\text{Pb}$  is non-radiogenic and was not measured in this study because of its low relative abundance.  $^{208}\text{Pb}$ ,  $^{207}\text{Pb}$ , and  $^{206}\text{Pb}$  are formed by the radioactive decay of  $^{232}\text{Th}$  (half-life = 14 billion years),  $^{235}\text{U}$  (half-life = 0.7 billion years), and  $^{238}\text{U}$  (half-life = 4.5 billion years), respectively [9]. Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) has been increasingly used in isotope ratio measurements in recent years [6, 9, 10]. The main purpose of this work was to test the sensitivity of inductively coupled plasma with mass spectrometry (ICP-MS) for measurements of stable lead isotopes ( $^{206}\text{Pb}$ ,  $^{207}\text{Pb}$  and  $^{208}\text{Pb}$ ). The lead isotope ratios were also calculated for Vranec wine samples from Tikveš wine region and edible oils produced from same seed variety as well as from same and different geographical origin.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Sample preparation

Wine and edible oil samples, before the isotopic measurements, were totally digested with application of a closed digestion system (Model MARS 5, CEM Corporation, USA). A representative sample (0.5 g) was placed in a digestion vessel. For digestion of vine samples 5 mL nitric acid ( $\text{HNO}_3$ , 65% w/w, ultra-trace purity) was used for total dissolution of organic compounds [11]. For digestion of oil samples 5 mL of nitric acid and 2 mL of hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , 30% w/w, ultra-trace purity) were added in order to achieve total dissolution of the organic compounds. The vessels were closed and settled in the microwave system and the four step program was applied for total dissolution of the organic matrix samples (Table 1).

**Table 1.** Microwave digestion program for digestion of oil and wine samples

Step	Initial <i>T</i> (°C)	Final <i>T</i> (°C)	Power (W)	Time (min.)
1	25	150	600	15
2	150	150	600	5
3	150	180	800	10
4	180	180	800	10

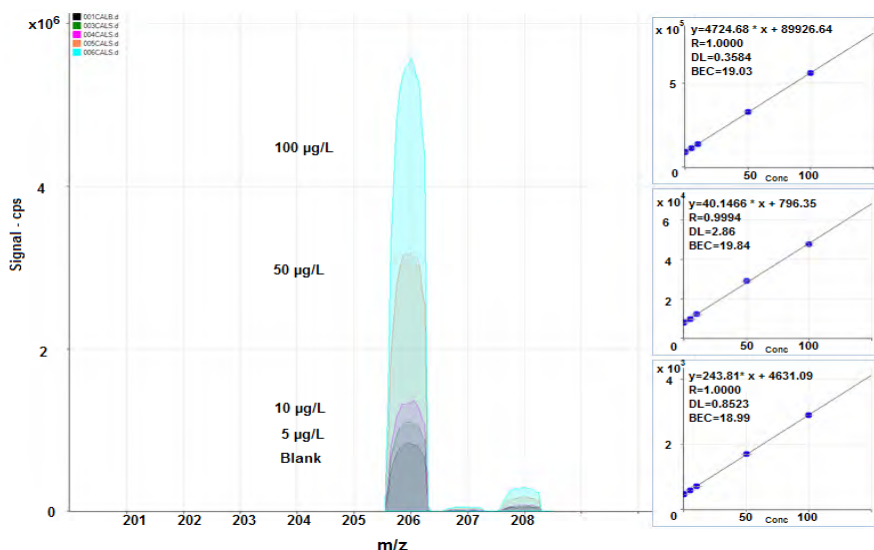
## 2.2. ICP-MS measurements

The single quadrupole inductively coupled plasma mass spectrometer (ICP-MS) was used for all isotopic measurements (model 7500cx, Agilent technologies, USA). The instrument was tuned for standard robust plasma conditions, equipped with micro-mist nebulizer and octopole reaction system (ORS). The operating conditions of the ICP-MS instrument were optimized before the analysis was performed. The integration time of analysis was set for 0.5 s per one point, with 5 replications for one measurement. First ionization was set at -3 V and -150 V for the second ionization. The CeO/Ce ratio was 0.58% (reference value <0.65%) and for the double charge ions (Ce<sup>++</sup>/Ce ratio) was obtained a satisfactory value of 2.05% (reference value <3%). For the quantitative analysis of the digested wine samples, external calibration curves were built at different concentration levels: 5, 10, 50 and 100 µg/L. Ten sample blanks (ultra-pure water with 2.5% w/w HNO<sub>3</sub>) were run to determine instrument detection limits (DL). Background equivalent concentration (BEC) was calculated as an indicator for the calibration offset expressed as a concentration, due to elemental contamination of the blank.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Method validation

Whichever methodology is selected, the natural or “common lead” <sup>204</sup>Pb isotope is measured as a reference to calculate the original (primordial) level of the other (mainly radiogenic) Pb isotopes, so accurate measurement of <sup>204</sup>Pb is essential. Unfortunately, for measurements made using inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), <sup>204</sup>Pb suffers an isobaric interference from <sup>204</sup>Hg (an isobaric overlap is where isotopes of different elements occur at the same nominal mass) meaning that any mercury present as a contamination or as a component of the sample would bias the measurement of <sup>204</sup>Pb. Very good sensitivity was obtained for <sup>206</sup>Pb, <sup>207</sup>Pb and <sup>208</sup>Pb isotopes concentration measurements (Figure 1). Satisfactory linearity (R) was obtained in the range from 5 to 100 µg/L (Figure 1). The instrumental detection limits for the three isotopes (<sup>206</sup>Pb, <sup>207</sup>Pb and <sup>208</sup>Pb) were calculated as 0.35, 2.86 and 0.85 µg/L, respectively.



**Figure 1.** Mass spectrum and linearity for  $^{206}\text{Pb}$ ,  $^{207}\text{Pb}$  and  $^{208}\text{Pb}$  calibration curves

To confirm that Pb does not undergo a charge-transfer reaction (and to check if any cluster ions are formed), 20 µg/L Pb solution was aspirated and a mass scan was performed. The sum of the signal for these clusters amounted to <0.5% of the total Pb signal (the sum of the unreacted precursor and reacted product Pb ions); at this level the product ions can be considered negligible and ignored. Pb did not appear to undergo any charge transfer reaction, as the Pb signal with argon gas in the cell remained at practically the same level as with no reaction gas.

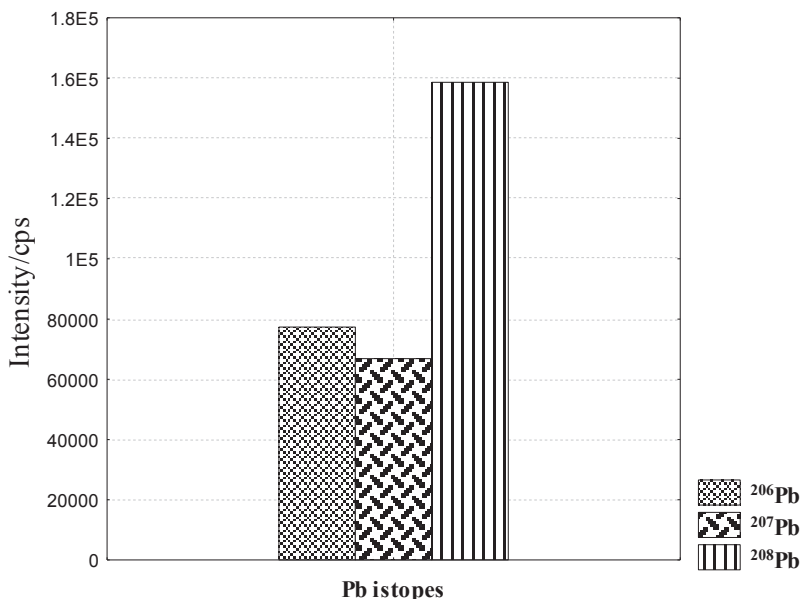
**Table 2.** Short-term stability of Pb isotope ratio determination (20 µg/L lead standard solution)

Acquisition time	1 replica	2 replica	3 replica	4 replica	5 replica	RSD (%)
	10:22 AM	10:26 AM	10:29 AM	10:31 AM	10:34 AM	
$^{206}\text{Pb}$ (µg/L)	0.241	0.241	0.214	0.241	0.241	0.05
$^{207}\text{Pb}$ (µg/L)	0.221	0.220	0.220	0.220	0.220	0.05
$^{208}\text{Pb}$ (µg/L)	0.523	0.524	0.523	0.522	0.523	0.03
$^{207}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$	0.916	0.914	0.914	0.914	0.914	0.08
$^{208}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$	2.169	2.168	2.169	2.167	2.165	0.08





The obtained signal expressed as counts per seconds for all three lead isotopes showed very strong stability among the time measurements. The median value for  $^{206}\text{Pb}$  was 79260 cps (RSD=5.5%), for  $^{207}\text{Pb}$  was 67500 cps (RSD=8.2%), for  $^{208}\text{Pb}$  was 157330 cps (RSD=8.9%).



**Figure 2.** Intensities of measurements for  $^{206}\text{Pb}$ ,  $^{207}\text{Pb}$  and  $^{208}\text{Pb}$

### 3.2. Lead isotopes measurements for wine samples

Ten different Vranec wines samples fermented with different yeasts were analysed for total lead concentration and lead isotopes ratio. The total Pb concentration ranged from 3.74-16.3  $\mu\text{g/L}$  [11]. Maximal acceptable limits for total lead content in wine samples is 200  $\mu\text{g/L}$  [12]. In none of the analysed wines values above the critical value for total lead concentration were obtained. The calculated isotope ratios ranged: a)  $^{207}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$ : from 0.985 to 1.122 with standard deviation of data distribution of 0.038 and b)  $^{208}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$ : from 2.221 to 2.998 with standard deviation of data distribution 0.21 (Table 3) presenting no significant variation, probably because of the same geographical origin of the grapes. In fact, Vranec wines were produced from Vranec grapes (*Vitis vinifera* L.) grown in Tikveš wine region in R. Macedonia [11]. Similar analyses were conducted with wine samples from different geographical regions in Italy [13]. For the Italian wines the isotopes concentration ratio  $^{208}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$  ranges from 2.09 to 2.14, while the  $^{207}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$  concentration ratio ranges from 1.14 to



1.19 [13]. These data were also compared to data obtained for the Australian and South Africa wines [13]. Significant variation occurs for the isotopes concentration ratio  $^{208}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$ .

**Table 3.** Lead concentration and lead isotopic ratio for wines

Wine samples	Lead isotopes concentration ratio		Total Pb concentration ( $\mu\text{g/L}$ ) [1]
	$^{207}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$	$^{208}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$	
<b>Vranec 1</b>	0.998	2.569	6.35
<b>Vranec 2</b>	1.011	2.356	8.79
<b>Vranec 3</b>	1.122	2.578	3.74
<b>Vranec 4</b>	1.055	2.356	3.81
<b>Vranec 5</b>	0.985	2.345	9.75
<b>Vranec 6</b>	1.012	2.221	11.2
<b>Vranec 7</b>	1.055	2.365	10.2
<b>Vranec 8</b>	1.036	2.998	16.3
<b>Vranec 9</b>	0.997	2.457	9.58
<b>Vranec 10</b>	1.022	2.345	10.4

### 3.3. Lead isotopes measurements for edible oil samples

Total lead contents and lead isotope concentration ratios in sunflower and oilseed rape oil were determined (Table 4). The total lead content in sunflower oil from R. Macedonia (N=22, cold press) ranges between 18.3-29.6  $\mu\text{g/kg}$ , while the lead content in sunflower oil produced sunflower seed (N=10, refined) ranged from 6.25-15.4  $\mu\text{g/kg}$  (Table 4). For none of the analyzed oil samples values above the maximum allowed content 100  $\mu\text{g/kg}$  [12] for total lead in edible oils were obtained. Therefore, the pollution factor in the analyzed samples has not been considered. Very similar values were obtained for the lead isotopes concentration ratio  $^{207}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$  and  $^{208}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$ , for sunflower and oilseed rape oil produced from seeds planted in R. Macedonia. For the sunflower oil produced from seed with foreign origin 0.859 for  $^{207}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$  ratio and 2.044 for  $^{208}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$  ratio were obtained. Furthermore, these isotopic ratios probably could be correlated with the origin of the seeds.

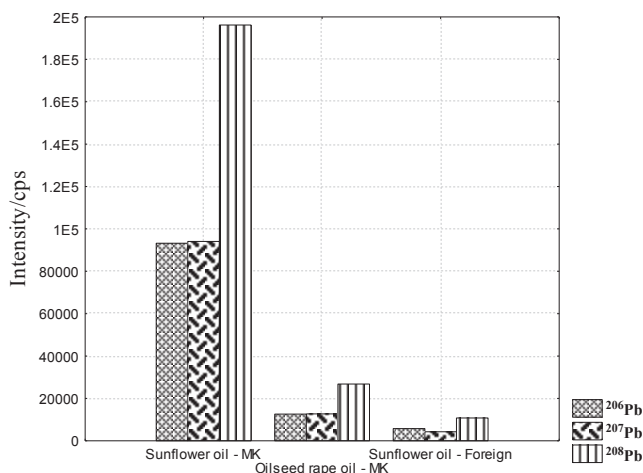


**Table 4.** Lead isotopic ratio for sunflower and oilseed rape oils

Oil sample seed variety	Geographical origin of seed used for oil production	N	Lead isotopes concentration ratio		Range for Pb total content (µg/kg)
			$^{207}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$	$^{208}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$	
Sunflower oil	RM	22	$1.078 \pm 0.30$	$2.769 \pm 0.11$	18.3-29.6
Sunflower oil	Unknown origin	10	$0.859 \pm 0.18$	$2.044 \pm 0.28$	6.25-15.4
Oilseed rape oil	RM	6	$1.09 \pm 0.25$	$2.596 \pm 0.08$	11.5 -33.6

RM - oil produced from seed planted in R. Macedonia; Unknown origin - oil produced from seed imported in R. Macedonia

The intensities of the isotopic measurements are presented by using bar-plots, in order to visualize the chemical abundance of the single lead isotopes, as mean value, for all three groups of edible oils (Figure 3). For the sunflower oil (produced from seed planted in R. Macedonia) the relative abundance of the Pb isotopes is  $^{206}\text{Pb} < ^{207}\text{Pb} < ^{208}\text{Pb}$ , the same sequence follows the oilseed rape oil (produced from seed planted in R. Macedonia); while for the sunflower oil (produced from seed imported in R. Macedonia) the relative abundance of the Pb isotopes is  $^{206}\text{Pb} < ^{207}\text{Pb} < ^{208}\text{Pb}$  (Figure 3). Kelly et al. in 2005 introduce very similar approach in tracing the geographical origin of various food [14]. No significant variation occurs in values obtained for the isotopes concentration ratio  $^{207}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$ . However, the  $^{208}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$  isotopes concentration ratio, has been shown to vary significantly depending on the geographical origin for numerous varieties of plant foods, including olive oil [14].



**Figure 3.** Intensities of measurements for  $^{206}\text{Pb}$ ,  $^{207}\text{Pb}$  and  $^{208}\text{Pb}$  in edible oil samples



#### 4. Concluding remarks

The use of ICP-MS for measuring the isotopic composition to identify the origin of the anomalous lead content in wine and edible oil samples proved to be a powerful technique. The precision and accuracy of ICP-MS analysis made it possible to satisfactorily discriminate among the likeliest lead sources in the studied samples. The performance of the applied techniques allowed measuring three lead isotopes ( $^{206}\text{Pb}$ ,  $^{207}\text{Pb}$  and  $^{208}\text{Pb}$ ) with very good sensitivity. For the  $^{204}\text{Pb}$ , a very low sensitivity was obtained due to the isobaric interference from  $^{204}\text{Hg}$ . The total lead contents in all of the analysed samples did not exceed the maximum allowed concentration for that kind of samples. The isotope ratios for wine samples ( $^{207}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$  and  $^{208}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$ ) didn't show any significant variation, probably because the wines were produced from grapes with identical geographical origin. For the edible oil samples, significant variation occurred for the same variety of the seed taken from different geographical region for both isotope ratios. Therefore, these isotopic analyses can provide useful information correlated with the geographical origin of wine and edible oil.

#### 5. References

- [1] Prego, R., Cobelo-Garcia, A. (2004). Cadmium, copper and lead contamination of the seawater column on the Prestige shipwreck (NE Atlantic Ocean). *Analytica Chimica Acta*, 524(1), 23-26.
- [2] Spiro, B., Weiss, D. J., Purvis, O. W., Mikhailova, I., Williamson, B. J., Coles, B. J., Udachin, V. (2004). Lead isotopes in lichen transplants around a Cu smelter in Russia determined by MC-ICP-MS reveal transient records of multiple sources. *Environmental Science & Technology*, 38(24), 6522-6528.
- [3] Ndung'u, K., Hibdon, S., Véron, A., Flegal, A. R. (2011). Lead isotopes reveal different sources of lead in balsamic and other vinegars. *Science of the Total Environment*, 409(14), 2754-2760.
- [4] MacKenzie, A. B., Pulford, I. D. (2002). Investigation of contaminant metal dispersal from a disused mine site at Tyndrum, Scotland, using concentration gradients and stable Pb isotope ratios. *Applied Geochemistry*, 17(8), 1093-1103.
- [5] Krachler, M., Le Roux, G., Kober, B., Shoty, W. (2004). Optimising accuracy and precision of lead isotope measurement ( $^{206}\text{Pb}$ ,  $^{207}\text{Pb}$ ,  $^{208}\text{Pb}$ ) in acid digests of peat with ICP-SMS using individual mass discrimination correction. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 19(3), 354-361.
- [6] Marguá, E., Iglesias, M., Queralt, I., Hidalgo, M. (2006). Lead isotope ratio measurements by ICP-QMS to identify metal accumulation in vegetation specimens growing in mining environments. *Science of the Total Environment*, 367(2), 988-998.



- [7] Lee, K., Do Hur, S., Hou, S., Burn-Nunes, L. J., Hong, S., Barbante, C., Rosman, K. J. (2011). Isotopic signatures for natural versus anthropogenic Pb in high-altitude Mt. Everest ice cores during the past 800years. *Science of the Total Environment*, 412, 194-202.
- [8] Barling, J., Weis, D. (2012). An isotopic perspective on mass bias and matrix effects in multi-collector inductively-coupled-plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 27(4), 653-662.
- [9] Taylor, R. N., Ishizuka, O., Michalik, A., Milton, J. A., & Croudace, I. W. (2015). Evaluating the precision of Pb isotope measurement by mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 30(1), 198-213.
- [10] Liu, Y., Hu, Z., Zong, K., Gao, C., Gao, S., Xu, J., Chen, H. (2010). Reappraisal and refinement of zircon U-Pb isotope and trace element analyses by LA-ICP-MS. *Chinese Science Bulletin*, 55(15), 1535-1546.
- [11] Ivanova-Petropulos, V., Balabanova, B., Mitrev, S., Nedelkovski, D., Dimovska, V., Gulaboski, R. (2015). Optimization and validation of a microwave digestion method for analysis of elements in wine using ICP-MS. *Food Analytical Methods*, in press.
- [12] Official gazette of the R. Macedonia, No. 118, 2005. Rules on general requirements for food safety. Skopje: Sluzben vesnik na R.M; 2005 (in Macedonian).
- [13] Barbaste, M., Halicz, L., Galy, A., Medina, B., Emteborg, H., Adams, F. C., Lobinski, R. (2001). Evaluation of the accuracy of the determination of lead isotope ratios in wine by ICP MS using quadrupole, multicollector magnetic sector and time-of-flight analyzers. *Talanta*, 54(2), 307-317.
- [14] Kelly, S., Heaton, K., Hoogewerff, J. (2005). Tracing the geographical origin of food: The application of multi-element and multi-isotope analysis. *Trends in Food Science & Technology*, 16(12), 555-567.



Оригинален научен труд

УДК: 635.71-181.198  
635.74-181.198

## СТИМУЛИРАЊЕ НА ВЕГЕТАТИВНОТО РАЗМНОЖУВАЊЕ СО АУКСИНИ КАЈ РУЗМАРИН (*ROSMARINUS OFFICINIALIS* L.) И ЖАЛФИЈА (*SALVIA OFFICINIALIS* L.)

Лилјана Колева-Гудева<sup>1</sup>, Фиданка Трајкова<sup>1</sup> и Јулијана Троицки<sup>1</sup>

**Апстракт:** Фитохормоните се во центарот на истражувањата во растителната физиологија повеќе од еден век. Истражувањата за растителните хормони на моменти се сметале како прилично нејасна тема, но со систематската примена на генетичките и молекуларните техники доведоа до клучни согледувања кои ја ревитализираа оваа област. Од откривањето на ауксините па сè до денес е тесна поврзаноста на овие фитохормони во стимулацијата на развојот на кореновиот систем. Во последните децении улогата на ауксините во вегетативното размножување, особено во расадничкото производство, е значајна во процесот на стимулирањето на оживувањето на расад и садници.

Во ова истражување е стимулирано вегетативното размножување на резници од ароматичните видови рузмарин (*Rosmarinus officinalis* L.) и жалфија (*Salvia officinalis* L.), со користење ауксини IAA, IBA, NAA и комерцијален хормон K1 - Radicin, во споредба со контролата K, каде што не е употребено ауксин. Истражувањата се изведени во три поставувања, во два различни периоди пролет/лето и есен/зима во адаптирани пластенички услови, при што се следени некои морфолошки карактеристики и процентот на вкоренување на резниците. Истражувањата покажаа дека со употреба на IAA, IBA и NAA во концентрација од 5 ppm може да се зголеми процентот на вкоренетите резници кај рузмарин до 100%, што се изедначува со ефектот на комерцијалниот препарат во периодот пролет/лето.

**Клучни зборови:** оживување, вегетативно размножување, IAA индол-3-оцетна киселина, IBA индол-3-бутерна киселина, NAA  $\alpha$  нафтил оцетна киселина.

<sup>1</sup> Универзитет „Гоце Делчев“ - Штип, Земјоделски факултет



## STIMULATION OF VEGETATIVE PROPAGATION WITH AUXINS IN ROSEMARY (*ROSMARINUS OFFICINALIS* L.) AND SAGE (*SALVIA OFFICINALIS* L.)

Liljana Koleva Gudeva<sup>2</sup>, Fidanka Trajkova<sup>2</sup> and Julijana Troicki<sup>2</sup>

**Abstract:** Phytohormones have been at the center of plant physiology research for more than a century. Research of plant hormones, has at times been considered as a rather vague subject, but the systematic application of genetic and molecular techniques has led to key insights that have revitalized the field. Since the discovery of auxin until today, the relationship of these phytohormones with the development of the root system is very close. In recent decades the role of auxin in the vegetative propagation, especially in the production of seedlings, is important at the stimulation of rooting process of seedlings and cuttings.

In this research is examined the stimulation of vegetative propagation of cuttings from aromatic species rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and sage (*Salvia officinalis* L.), using auxins IAA, IBA, NAA and commercial hormone K1 - Radicin, compared to control K where there is no presence of auxin. Research is carried out in three settings, at two different periods spring/summer and autumn/winter, in adapted plastic tunnel conditions, where some morphological characteristics and the percentage of rooted cuttings were examined. Studies have shown that the use of IAA, IBA and NAA at concentration of 5 ppm may increase the percentage of rooted cuttings in rosemary up to 100%, which equals with the effect of the commercial product during spring/summer period.

**Key words:** *rooting, vegetative propagation, IAA indole-3-acetic acid, IBA indole-3-butric acid, NAA  $\alpha$  naphthaleneacetic acid.*

### 1. Вовед

Република Македонија се издвојува со една посебна природна карактеристика, а тоа е неспоредливо богатиот биодиверзит кој избобилува со ендемски и реликтни видови на растителни и животински форми. Богатството на природни ресурси со ароматични и лековити растенија придонело за развој на традиционалната медицина во современата фармацевтска индустрија, којашто претставува значаен стопански субјект во економијата на земјата. Меѓутоа со денешната транзиција на економијата кон пазарно ориентираното стопанисување, овој значаен дел од биодиверзитетот е доведен во голема опасност поради неконтролираното искористување [1].

<sup>2</sup> Goce Delcev University - Stip, Faculty of Agriculture



Од друга страна, во државата не постои ниту една институција или организација, која се занимава со организирано производство на семенски или саден материјал, за што уште во старт се јавуваат проблеми за почеток во производство на ароматични и лековити растенија. Со вегетативното размножување може да се надмине опишаната состојба, а оваа техника на размножување се применува во расадничкото производство за оживување и добивање на посадочен материјал (расад/садници) за многу економски значајни култури. Вегетативното размножување особено се користи во случаи кога ртливоста на семињата на некои видови е под 50%, а кај најголем број ароматични и лековито-зачински растенија тој процент е под 50%, што уште повеќе го усложнува процесот на нивно организирано производство. Така се постигнува голема униформност на посадочниот материјал, без да има никакви измени во генетските особини на садниците [2].

Примената на фитохормоните, особено на ауксините како регулатори на растот, во расадничкото производство се користат за зголемување на бројот на вкоренетите садници, скратување на времето за оживување, зголемување на бројот на корени по садница и за униформност на кореновиот систем [3]. Индол-3-бутерна киселина и  $\alpha$ -нафтил оцетна киселина најчесто се користат за комерцијални цели заради нивната конзистентност во промовирање на вкоренувањето на резниците [4].

Лековитите и ароматичните растенија се карактеризираат со кратка долговечност на семето, како и со мал капацитет за ртење, како резултат на недостаток на програма за селекција и обработка на семе [5] иако примената на некои биостимулатори може да го зголеми ртењето [6]. Некои растителни видови тешко се вкоренуваат без употреба на хормони за вкоренување, затоа е неопходно користење на оптимална концентрација на ИВА и/или NAA [7]. Ауксините ја забрзуваат транслокацијата на хранливите материи од погорните делови на резниците во базалните делови, каде што ја зголемуваат активноста на ензимите. Тоа ја зголемува хидролизата на јаглехидратите за добивање на доволно енергија во клетките кои се одговорни за ризогенеза [8].

Рузмаринот (*Rosmarinus officinalis* L.) припаѓа на фамилијата *Lamiaceae*, претставува зимзелена повеќегодишна дрвенеста грмушка, распространета по целиот Медитеран, а видот е култивиран уште од античко време. Има мали побарувања од вода, често се одгледува како градинарска култура. Заради ароматичните својства, листовите се користат во кулинарството за подобрување на аромата и вкусот на храната, а етеричните масла од рузмаринот се искористени во фармацевтската индустрија како природен извор на антиоксиданти.

Жалфија (*Salvia officinalis* L.) е претставник на фамилијата





*Laminaceae*, распространета по целиот Медитерански регион, но опстанува и во континенталните региони. Во Република Македонија ова растение има многу ограничено распространување и расте само во областа по течението на реката Црн Дрим, помеѓу градовите Струга и Дебар (во близина на селата Модрич и Луово Поле), затоа е неодржливо да се собира за комерцијални цели [1]. Расте како мала полугрмушка со повеќегодишни дрвенести стебла. Растителните фиданки може да достигнат висина до 70 cm. Остриот и пријатен мирис доаѓа од етеричното масло кое е застапено 1 - 2,5%, а горчливиот вкус доаѓа од присуството на танини и други секундарни метаболити. Широко се употребува како зачинско и лековито растение заради неговите антисептички, антиинфламаторни и антиканцерогени особини [9].

И двата истражувани вида се среќаваат на територијата на Р. Македонија, нивата природна експлоатација за комерцијални цели е неоправдана, затоа се неопходни научни податоци со кои ќе се фаворизира вегетативното размножување на овие значајни лековито ароматични и зачински видови.

## 2. Материјал и методи на работа

Истражувањата опишани во овој труд беа изведени во адаптиран пластенички простор со димензии 5 m x 2,5 m, каде што беа поставени три леи со димензии 5 m x 0,5 m во Штип (41.7375° N, 22.1936° E). Местото на подигнување на пластеникот беше добро обработено, почвата дезинфицирана со соларизација, постоечките плевели беа отстранети, а леите исполнети со смеса од тресет и перлит во сооднос 1 : 1. Експериментот беше поставен во три поставувања во периодите од:

- 20.5.2011 г. - 27.8.2011 г., пролет/лето за првото поставување;
- 8.10.2011 г. - 15.1.2012 г., есен/зима за второто поставување и
- 8.10.2012 г. - 15.1.2013 г., есен/зима за третото поставување.

Користени се по 50 резници од рузмарин (*Rosmarinus officinalis* L.) и жалфија (*Salvia officinalis* L.) со висина од 15 cm и истите беа поставувани за вжилување во пластеничките леи. Резниците беа потопувани во подготвените свежи раствори од ауксини, пред поставувањата во леите и тоа:

- К - контрола, без употреба на ауксин,
- К1 - комерцијален препарат за ожилување, Radicin (0,003% IBA),
- IAA - 5 ppm индол-3-оцетна киселина,
- IBA - 5 ppm индол-3-бутерна киселина,
- NAA - 5 ppm  $\alpha$  нафтил оцетна киселина.

Ефектот на третманот беше согледуван по 100 дена од поставувањата, а беа регистрирани промените во некои морфолошки карактеристики на резниците и во процентот на вкоренети изданоци.



## **2.1. Одредување на климатските услови со климадијаграм по Walter**

Со оглед на фактот дека експериментот беше поставен во три повторувања, но во два климатски периоди пролет/лето и есен зима, се јави потреба да се одредат климатските услови во периодите во кои беа поставувани резниците за вжилување. За секој период на поставување на резници за вжилување беше одреден клима-дијаграм за Штип по Walter, според податоците за средномесечните температури и средномесечните врнежи земени од Управата за хидрометеоролошки работи на Република Македонија, Скопје.

## **2.2. Статистичка обработка на податоци**

За статистичка обработка на резултатите е користена софтверската програма IBM SPSS Statistics Software 19.0 (IBM SPSS Statistics 19 Brief Guide, 2010). За оценка на експериментот во целина е применета статистичка анализа на варијансата за секој испитуван фитохормон (One-Way ANOVA тест). За утврдување на значењето на разликата помеѓу испитуваните фитохормони е користен Duncan многукратен тест за рангирање (Duncan's Multiple Range Test).

## **3. Резултати и дискусија**

Резултатите добиени во спроведениот експеримент укажуваат на фактот дека употребуваните ауксини и комерцијалниот хормон Radicin имаат влијание во стимулирањето на вжилувањето во процесот на вегетативното размножување на рузмарин (*Rosmarinus officinalis* L.) и жалфија (*Salvia officinalis* L.).

### **3.1. Рузмарин (*Rosmarinus officinalis* L.)**

Резултатите од трите поставувања за влијанието на ауксините кај рузмаринот се прикажани табеларно во табелите 1-6. Неспорен е фактот дека рузмаринот реагира на третманот со ауксини, што е најочигледно во второто поставување каде што сите третмани дале максимално вкоренување од 100%, во споредба со контролата каде што процентот на вкоренети резници изнесувал 64% (табела 4, слика 1).

Испитуваните морфолошки карактеристики, прикажани во табелите 3, 5 и 7 покажале соодветно зголемување на вредностите. Во II и III поставување кај некои третмани се забележува намалување на бројот на листови, што е логична последица од намалувањето на фотосинтетската активност за време на есенскиот и зимскиот период.



**Табела 1.** Морфолошки карактеристики на резници од *Rosmarinus officinalis* L. при вегетативното размножување стимулирано со ауксини во I поставување пролет/лето

**Table 1.** Morphological characteristics of cuttings form *Rosmarinus officinalis* L. due to vegetative propagation stimulated by auxins in I setting spring/summer

	Висина cm		Број на нодии		Број на интернодии		Број на листови		Ширина на лист cm		Должина на лист cm	
	старт	по 100 дена	старт	по 100 дена	старт	по 100 дена	старт	по 100 дена	старт	по 100 дена	старт	по 100 дена
K	15	28,35a	9,24a	13,07a	8,24a	12,07a	36,02a	44,33a	0,60a	0,85a	1,10a	1,10a
K1	15	26,17b	8,22b	11,05b	7,22b	10,05b	27,70b	42,11a	0,52a	0,85a	1,06a	1,10a
IAA	15	21,95d	8,20b	8,86c	7,20b	7,86c	37,12a	34,18b	0,56a	0,65a	1,00a	1,00a
IBA	15	20,40d	7,90b	8,04c	6,90b	7,04c	27,92b	34,88b	0,56a	0,70a	1,00a	1,10a
NAA	15	23,85c	8,12b	11,22b	7,12b	10,22b	36,12a	32,81b	0,46a	0,70a	1,00a	1,00a

Средните вредности во секоја колона кои се означени со исти букви не се разликуваат сигнификантно за  $p < 0,05$  според тестот на Duncan.

**Табела 2.** Вкоренување при вегетативното размножување на *Rosmarinus officinalis* L. стимулирано со ауксини во I поставување пролет/лето

**Table 2.** Rooting at the vegetative propagation of *Rosmarinus officinalis* L. stimulated by auxins in I setting spring/summer

	почетни резници		вкоренување по 100 дена				
	број	висина cm	висина на резница cm	број на вкоренети	број на корени	должина на корен cm	вкоренување %
K	50	15	28,35a	14c	9,33a	6,10ab	28c
K1	50	15	26,17b	17b	10,33a	6,55a	34b
IAA	50	15	21,95d	22b	12,66a	5,55b	44b
IBA	50	15	20,40d	25a	9,66a	5,30b	50a
NAA	50	15	23,85c	27a	11,66a	6,05ab	54a

Средните вредности во секоја колона кои се означени со исти букви не се разликуваат сигнификантно за  $p < 0,05$  според тестот на Duncan.

**Табела 3.** Морфолошки карактеристики на резници од *Rosmarinus officinalis* L. при вегетативното размножување стимулирано со ауксини во II поставување есен/зима

**Table 3.** Morphological characteristics of cuttings form *Rosmarinus officinalis* L. due to vegetative propagation stimulated by auxins at II setting autumn/winter

	Висина cm		Број на нодии		Број на интернодии		Број на листови		Ширина на лист cm		Должина на лист cm	
	старт	по 100 дена	старт	по 100 дена	старт	по 100 дена	старт	по 100 дена	старт	по 100 дена	старт	по 100 дена
K	15	17,12ab	8,00b	10,06a	7,00b	9,06a	30,52a	39,19b	0,66a	0,85a	1,10a	4,10a
K1	15	16,24c	7,22c	8,58b	6,22c	7,57b	28,38b	36,60c	0,70a	0,85a	1,30a	4,10a



IAA	15	17,84a	8,22ab	10,34a	7,20ab	9,39a	31,60a	42,06a	0,52a	0,70b	0,90a	3,33ab
IBA	15	16,60bc	8,46a	10,04a	7,46a	9,04a	27,46b	31,72d	0,62a	0,55c	1,05a	2,93b
NAA	15		17,40a	7,26c	9,40b	6,26c	8,40a	31,70a	24,88e	0,52a	0,55c	0,95a

Средните вредности во секоја колона кои се означени со исти букви не се разликуваат сигнификантно за  $p < 0,05$  според тестот на Duncan.

**Табела 4.** Вкоренување при вегетативното размножување на *Rosmarinus officinalis* L. стимулирано со ауксини при II поставување есен/зима

**Table 4.** Rooting at the vegetative propagation of *Rosmarinus officinalis* L. stimulated by auxins at II setting autumn/winter

	почетни резници		вкоренување по 100 дена				
	број	висина cm	висина на резница cm	број на вкоренети	број на корени	должина на корен cm	вкоренување %
K	50	15	17,12ab	32b	8,00a	5,75a	64b
K1	50	15	16,24c	50a	11,00a	5,60a	100a
IAA	50	15	17,84a	50a	12,33a	5,10a	100a
IBA	50	15	16,60bc	50a	10,66a	3,10b	100a
NAA	50	15	17,40a	50a	10,00a	2,30b	100a

Средните вредности во секоја колона кои се означени со исти букви не се разликуваат сигнификантно за  $p < 0,05$  според тестот на Duncan.

**Табела 5.** Морфолошки карактеристики на резници од *Rosmarinus officinalis* L. при вегетативното размножување стимулирано со ауксини на ауксини во III поставување есен/зима

**Table 5.** Morphological characteristics of cuttings form *Rosmarinus officinalis* L. due to vegetative propagation stimulated by auxins at III setting autumn/winter

	Висина cm		Број на нодии		Број на интернодии		Број на листови		Ширина на лист cm		Должина на лист cm	
	старт	по 100 дена	старт	по 100 дена	старт	по 100 дена	старт	по 100 дена	старт	по 100 дена	старт	по 100 дена
K	15	18,95d	8,16a	8,53b	7,16a	7,96b	40,54ab	38,65c	0,66a	0,90a	1,35a	2,70
K1	15	21,52c	7,40b	8,26b	6,40b	7,26c	37,98b	37,09d	1,02a	0,90a	1,45a	2,60
IAA	15	23,44b	8,20a	10,13a	7,20a	9,13a	41,96a	40,21b	0,74a	0,70ab	1,25a	3,33
IBA	15	25,17a	6,52c	10,47a	5,52c	9,40a	34,68c	37,86bd	0,74a	0,55b	1,40a	2,60
NAA	15	23,00b	8,12a	8,87b	7,12a	7,87b	40,00ab	43,30a	0,66a	0,58b	1,55a	4,16

Средните вредности во секоја колона кои се означени со исти букви не се разликуваат сигнификантно за  $p < 0,05$  според тестот на Duncan.

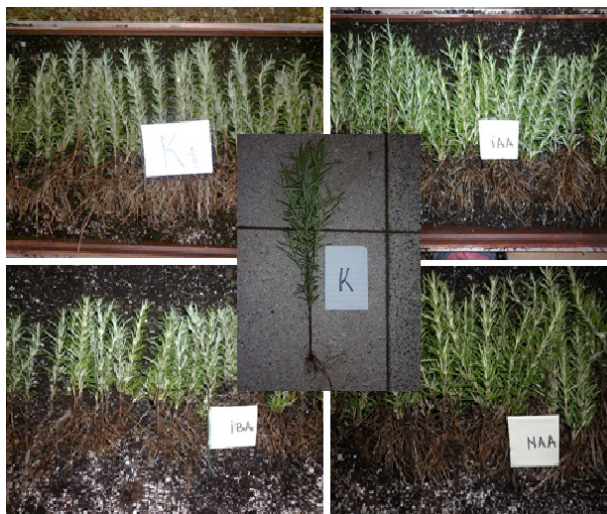


**Табела 6.** Вкоренување при вегетативното размножување на *Rosmarinus officinalis* L. стимулирано со ауксини при III поставување есен/зима

**Table 6.** Rooting at the vegetative propagation of *Rosmarinus officinalis* L. stimulated by auxins at III setting autumn/winter

	почетни резници		вкоренување по 100 дена				
	број	висина cm	висина на резница cm	број на вкоренети	број на корени	должина на корен cm	вкоренување %
K	50	15	18,95d	43b	21,00a	5,57a	86b
K1	50	15	21,52c	42b	23,00a	6,10a	84b
IAA	50	15	23,44b	38c	22,00a	5,10a	76c
IBA	50	15	25,17a	46a	15,33a	3,10b	92a
NAA	50	15	23,00b	39c	25,33a	2,80b	78c

Средните вредности во секоја колона кои се означени со исти букви не се разликуваат сигнификантно за  $p < 0,05$  според тестот на Duncan.



**Слика 1.** Вкоренување при вегетативното размножување на *Rosmarinus officinalis* L. стимулирано со ауксини

**Figure 1.** Rooting in the vegetative propagation of *Rosmarinus officinalis* L. stimulated by auxins

### 3.2. Жалфија (*Salvia officinalis* L.)

Резултатите од трите поставувања за влијанието на ауксините кај рузмаринот се прикажани табеларно во табелите 7-12. Жалфијата покажа послаб стимулативен ефект на ауксините во вкоренувањето, споредено



со рузмаринот (слика 2), а во односот на третманите најповолно влијаел Radicin K1, со 94% вкоренети резници (табела 8, слика 2).

**Табела 7.** Морфолошки карактеристики на резници од *Salvia officinalis* L. при вегетативното размножување стимулирано со ауксини во I поставување пролет/лето

**Table 7.** Morphological characteristics of cuttings form *Salvia officinalis* L. due to vegetative propagation stimulated by auxins at I setting spring/summer

	Висина cm		Број на нодии		Број на интернодии		Број на листови		Ширина на лист cm		Должина на лист cm	
	старт	по 100 дена	старт	по 100 дена	старт	по 100 дена	старт	по 100 дена	старт	по 100 дена	старт	по 100 дена
K	15	22,16a	6,18a	8,68a	5,18a	20,48a	23,80ab	39,25a	0,66a	0,90a	3,35a	4,10a
K1	15	21,25ab	5,00b	8,78a	4,10b	7,78b	22,26ab	37,77a	1,02a	0,90a	3,45a	4,10a
IAA	15	19,00b	4,20c	6,50b	3,20c	5,50b	21,48b	18,90b	0,74a	0,70a	2,80ab	3,33ab
IBA	15	16,20c	5,50b	4,00c	4,42b	2,83b	23,12ab	17,20b	0,74a	0,55a	2,35ab	3,00b
NAA	15	15,00c	5,12b	4,00c	4,12b	3,00b	24,69a	12,00c	0,66a	0,85a	1,55b	3,56ab

Средните вредности во секоја колона кои се означени со исти букви не се разликуваат сигнификантно за  $p < 0,05$  според тестот на Duncan.

**Табела 8.** Вкоренување при вегетативното размножување на *Salvia officinalis* L. стимулирано со ауксини во I поставување пролет/лето

**Table 8.** Rooting at the vegetative propagation of *Salvia officinalis* L. stimulated by auxins at I setting spring/summer

	почетни резници		вкоренување по 100 дена				
	број	висина cm	висина на резница cm	број на вкоренети	број на корени	должина на корен cm	вкоренување %
K	50	15	22,16a	35b	8,00a	5,75a	70b
K1	50	15	21,25ab	47a	11,00a	6,10a	94a
IAA	50	15	19,00b	10c	12,33a	5,10a	20c
IBA	50	15	16,20c	5d	10,66a	3,10a	10d
NAA	50	15	15,00c	10a	11,00a	2,10a	20c

Средните вредности во секоја колона кои се означени со исти букви не се разликуваат сигнификантно за  $p < 0,05$  според тестот на Duncan.



**Табела 9.** Морфолошки карактеристики на резници од *Salvia officinalis* L. при вегетативното размножување стимулирано со ауксини во II поставување есен/зима

**Table 9.** Morphological characteristics of cuttings form *Salvia officinalis* L. due to vegetative propagation stimulated by auxins at II setting autumn/winter

	Висина cm		Број на нодии		Број на интернодии		Број на листови		Ширина на лист cm		Должина на лист cm	
	старт	по 100 дена	старт	по 100 дена	старт	по 100 дена	старт	по 100 дена	старт	по 100 дена	старт	по 100 дена
K	15	17,06a	6,68a	7,50ab	5,68a	6,50b	20,22b	15,79a	0,66a	0,90a	3,35a	3,35a
K1	15	16,28bc	6,20b	7,00bc	5,20b	6,00c	21,90b	14,88ab	1,02a	0,90a	3,45a	3,45a
IAA	15	16,80ab	6,94a	7,11b	5,94a	6,11bc	18,18c	15,50a	0,74a	0,70ab	2,80ab	2,80ab
IBA	15	16,00c	5,56b	8,00a	5,18b	7,30a	24,36a	13,49b	0,74a	0,55b	2,35ab	2,35ab
NAA	15	15,96c	6,30ab	6,77c	5,30b	5,69c	17,28c	11,31c	0,66a	0,85a	1,55b	1,55b

Средните вредности во секоја колона кои се означени со исти букви не се разликуваат сигнификантно за  $p < 0,05$  според тестот на Duncan.

**Табела 10.** Вкоренување при вегетативното размножување на *Salvia officinalis* L. стимулирано со ауксини при II поставување есен/зима

**Table 10.** Rooting at the vegetative propagation of *Salvia officinalis* L. stimulated by auxins at II setting autumn/winter

	почетни резници		вкоренување по 100 дена				
	број	висина cm	висина на резница cm	број на вкоренети	број на корени	должина на корен cm	вкоренување %
K	50	15	17,06a	32b	7,66a	4,75a	64b
K1	50	15	16,28bc	32b	11,00a	4,30ab	64b
IAA	50	15	16,80ab	18d	11,33a	4,10ab	36d
IBA	50	15	16,00c	37a	10,66a	3,10bc	74a
NAA	50	15	15,96c	26c	9,33a	2,30c	52c

Средните вредности во секоја колона кои се означени со исти букви не се разликуваат сигнификантно за  $p < 0,05$  според тестот на Duncan.



**Табела 11.** Морфолошки карактеристики на резници од *Salvia officinalis* L. при вегетативното размножување стимулирано со ауксини во III поставување есен/зима

**Table 11.** Morphological characteristics of cuttings form *Salvia officinalis* L. due to vegetative propagation stimulated by auxins at III setting autumn/winter

	Висина cm		Број на нодии		Број на интернодии		Број на листови		Ширина на лист cm		Должина на лист cm	
	старт	по 100 дена	старт	по 100 дена	старт	по 100 дена	старт	по 100 дена	старт	по 100 дена	старт	по 100 дена
K	15	19,40b	6,24b	7,40b	5,24b	6,55b	23,08ab	40,50a	0,66a	9,90a	1,13ab	2,35a
K1	15	21,63a	5,26cd	7,00b	4,26cd	7,00bc	22,92ab	37,16b	1,02a	0,90a	1,26a	2,45a
IAA	15	19,41b	7,24a	9,00a	6,24a	8,13a	20,60b	39,75a	0,74a	0,70ab	0,90ab	2,30a
IBA	15	20,29b	5,74bc	7,44b	4,74bc	6,44b	20,96b	37,44b	0,74a	0,55b	0,90ab	2,35a
NAA	15	19,48b	5,12d	8,56a	4,12d	7,56ab	24,36a	27,24c	0,66a	0,85a	0,83b	1,55b

Средните вредности во секоја колона кои се означени со исти букви не се разликуваат сигнификантно за  $p < 0,05$  според тестот на Duncan.

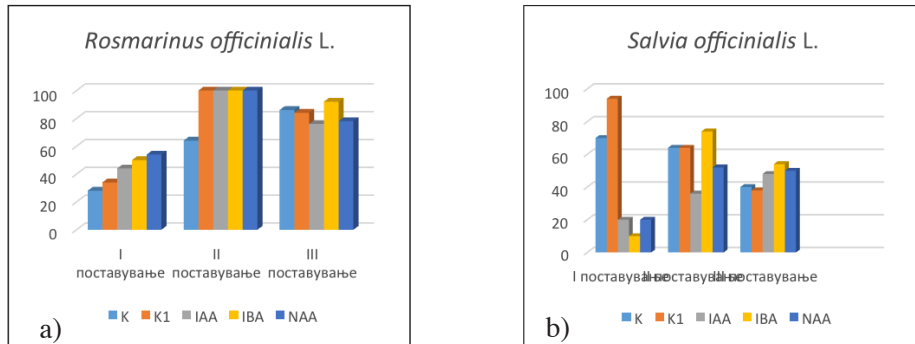
**Табела 12.** Вкоренување при вегетативното размножување на *Salvia officinalis* L. стимулирано со ауксини при III поставување есен/зима

**Table 12.** Rooting at the vegetative propagation of *Salvia officinalis* L. stimulated by auxins at III setting autumn/winter

	почетни резници		вкоренување по 100 дена				
	број	висина cm	висина на резница cm	број на вкоренети	број на корени	должина на корен cm	вкоренување %
K	50	15	19,40b	20c	8,66a	5,25a	40c
K1	50	15	21,63a	19c	10,33a	5,60a	38c
IAA	50	15	19,41b	24b	12,33a	4,10b	48b
IBA	50	15	20,29b	27a	10,66a	3,10c	54a
NAA	50	15	19,48b	25a	9,00a	2,30c	50a

Средните вредности во секоја колона кои се означени со исти букви не се разликуваат сигнификантно за  $p < 0,05$  според тестот на Duncan.



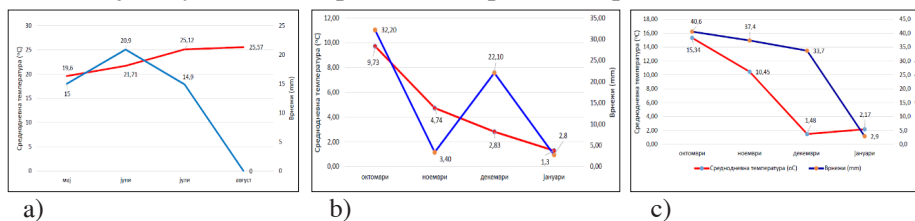


**Слика 2.** Влијанието на ауксините IAA, IBA, NAA и Radicin во процентот на вкоренување во трите поставувања на експериментот на резници од а) рузмарин и б) жалфија

**Figure 2.** The effect of auxins IAA, IBA, NAA and Radicin in the percentage of rooting at the three settings of the experiment cuttings of a) rosemary and b) sage

### 3.3. Климатски услови за Штип, одредени со клима дијаграм по Walter

Климатските услови во периодот на трите поставувања се одредени според клима-дијаграм по Walter прикажани на слика 3. Во првото поставување се јавува ариден период во јуни, што се очекуваше во истражувањето. Есенско-зимските периоди, и во II и во III поставување, покажаа поволно влијание во вегетативното размножување, со фактот што на графиконите на слика 3 (b и c) нема појава на негативни температури. Опаѓањето на листовите во есенско-зимските периоди, и кај двата испитувани вида, се препишува на намалување на активноста на фотосинтетските пигменти за овој период и е резултат на нормална адаптација во услови на стрес од надворешната средина.



**Слика 3.** Клима-дијаграми по Walter за Штип, за периодите во трите поставувања на експериментот, а) I поставување, б) II поставување, в) III поставување

**Figure 3.** Climate diagram for Stip, for the period of three settings of experiment, a) I setting, b) II setting, c) III setting



#### 4. Заклучок

Спроведените истражувања покажаа дека користените регулатори на раст, ауксини и комерцијалниот препарат Radicin влијаат во ожилувањето кај рузмариноот и кај жалфијата. Добиените резултати се во согласност со консултираната научна и стручна литература за оваа проблематика [10 - 13]. Користењето на IAA и NAA во серија од 0, 20, 40, 60, 80 и 100 ppm покажало стимулативен импулс уште во третманот од 20 и 40 ppm [10]. Некои автори [11, 12, 13] укажуваат на користење на ауксини во концентрација од 100, 200, 300 па и до 1000 ppm аускини за стимулирање на вкоренувањето на видови кои тешко се вкоренуваат, во којашто група како по правило спаѓаат лековитите и ароматичните растенија. Резултатите од нашите истражувања покажаа дека ауксините IAA, IBA и NAA во концентрација од само 5 ppm дејствуваат стимулативно во вкоренувањето на рузмариноот и жалфијата.

Резултатите презентирани во овој труд укажуваат на фактот дека вегетативното размножување на ароматичните и лековитите видови може да се стимулира со користење на ауксини. Потребни се дополнителни истражувања во оваа проблематика кои ќе дадат јасни насоки за примената на овие фитохормони во вегетативното размножување на оваа значајна група на растенија кои имаат и економско големо значење.

#### Користена литература

- [1] Кулеванова, С. и Стефков, Ѓ. (2007). Лековити и ароматични растенија, упатство и монографија за собирачи според принципите за органско производство, МЗШВ, Скопје 2007.
- [2] Hartmann, H.T., Kester, D.E., Davies, F.T. and Geneve, R.L. (1997). Plant Propagation: principles and practices. Prentice Hall, Inc., New Jersey.
- [3] Paradikovic, N., Zelkovic, S., Tkalec, M., Vinkovic, T., Devic, I., Maric, M. (2013). Influence of rooting powder on propagation of sage *Salvia officinalis* L. and rosemary *Rosmarinus officinialis* L. with green cuttings. Poljoprivreda 19:2013 (2): 10-15.
- [4] Boyer, N.Z., Graves, W.R. (2009): NAA is more effective than IBA for rooting stem cuttings of two Nyssa spp. Journal of Environmental Horticulture 27(3): 183-187.
- [5] Nicola, S. Fontana, E., Hoeberechts, J. and Saglietti, D. (2005): Rooting products and cutting timing on sage (*Salvia officinalis* L.) propagation. Acta Horticulturae 676: 135-141.
- [6] Parađiković, N., Vinković, T., Radman, D. (2008): Influence of biostimulant on seed germination of some flower species. Sjemenarstvo. 25(1): 25-33.



- [7] Taleb, R. A. and Ahmad N.A. (2013). Influence of auxin concentration on different ornamental plants. *International Journal of Botany*. 2013 9 (2): 96-99.
- [8] Arya, S., Tomar, R., Tokoyt O.P. (1994). Effect of plant age and auxin treatment on rooting response in stem cuttings of *Prosopis cineraria*. *Journal of arid environments*. 27: 99-103.
- [9] Bauer, J., Kuehnl, S., Rollinges, JM., Scherer, O., Northoff, H., Stuppner, H., Werz, O., Koberle, A. (2012). Carnosol and Carnosic acid from *Salvia officinalis* L. inhibit microsomal prostaglandin E<sub>2</sub> synthetase-1. *The Journal of Pharmaceutical and Experimental Therapeutics* 342(1): 169-176.
- [10] Elhaak, M.A., Matter, M.Z., Zayed, M.A. and Gad, D.A. (2015). Propagation principles in using indole-3-butyric acid for rooting rosemary stem cuttings. *Journal of Horticulture*, 2015 2:1.
- [11] Talia, M., Viola F., Forelo, LR. (2004). Vegetative propagation of two species of mediterian maquis (*Rosmarinus officinalis* L., *Viburnum tinus* L.) for application in naturalistic engineering. *Italus-Hortus*, 11: 89-92.
- [12] Rowezak, M. (2001). Response of some ornamental plants to treatment with growth substances. *Fac Agric Cairo Egypt*, 2001.
- [13] Azimi, M. (1975). Rooting of hardwood cuttings. *Exp Hortic* 27: 22-27.



Оригинален научен труд

УДК 633.16-152.61(497.7)“2012/2014”

## КВАЛИТЕТНО-ТЕХНОЛОШКИ СВОЈСТВА КАЈ ДОМАШНИ ДВОРЕДНИ ФОРМИ НА ЈАЧМЕН

Наталија Маркова Руждиќ<sup>1</sup>, Љупчо Михајлов<sup>1</sup>, Верица Илиева<sup>1</sup>,  
Соња Ивановска<sup>2</sup>

**Апстракт:** Главна цел во ова истражување е да се утврдат квалитетно-технолошките својства кај домашни дворедни форми на зимски јачмен.

Полските опити од ова истражување се реализирани на опитните површини на производната единица „Унисервис агро“ на два локалитета - Овче Поле и Струмица, во текот на две години (2012-2013 и 2013-2014). Опитите се поставени според методот на случаен блок-систем, во три повторувања за секој генотип и локалитет, со примена на стандардна агротехника за јачменот.

Како експериментален материјал се употребени вкупно пет домашни генотипови на зимски дворедни форми јачмен. Три од нив се регистрирани сорти (*хит*, *извор* и *егеј*) и две се перспективни линии (*линија 1* и *линија 2*).

Од квалитетно-технолошките својства на зрното на јачменот се анализирани следниве параметри: содржина на протеини (%), изедначеност на зрната од I класа (%), водоосетливост (%), степен на на киснување (%), маса на 1.000 зрна (g) и хектолитарска маса (kg/hl).

Содржината на протеините е одредена преку утврдување на содржината на вкупен азот, по методот на Kjeldahl, додека одредувањето на изедначеноста на зрната од I класа, водоосетливоста и степенот на на киснување се работени според стандардите на Европската конвенција за производство на пиво. За утврдување на хектолитарската маса е користен стандардот ISO 797.

Добиените резултати од анализата на квалитетно-технолошките својства статистички се обработени со статистичкиот пакет (Stat Soft, 8.0). Освен дескриптивната статистика, податоците за овие својства се анализирани и со методот на кластер анализа (Cluster Analysis, CA), со цел да се утврди поврзаноста односно оддалеченоста на испитуваните генотипови врз основа на квалитетно-технолошките својства.

Генерално, на двата локалитета добиените просечни вредности за сите квалитетно-технолошки својства, за сите генотипови заедно, просечно за периодот на истражување се во граница на оптималните вредности, со исклучок на содржината на протеини, која кај сите генотипови е над 12%.

<sup>1</sup> Земјоделски факултет, Универзитет „Гоце Делчев“ – Штип

<sup>2</sup> Факултет за земјоделски науки и храна, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ – Скопје



Генотиповите *линија 1* и *линија 2* се издвоија со најдобри квалитетно-технолошки својства и во двата локалитета, но со добар квалитет на зрното се покажа и генотипот *извор*, анализиран на локалитетот Овче Поле.

Со примена на кластер-анализата, направена врз основа на квалитетно-технолошките својства, добивме дека сите анализирани генотипови и на двата локалитета се блиско поврзани меѓусебе, издиференцирани во еден кластер, со ислучок на генотипот *линија 1*, испитуван локалитетот Овче Поле.

**Клучни зборови:** *квалитет на зрно, технолошки својства, јачмен, генотип.*

## QUALITATIVE - TECHNOLOGICAL PROPERTIES AT DOMESTIC TWO ROW BARLEY GENOTYPES

Natalija Markova Ruzdik<sup>3</sup>, Ljupcho Mihajlov<sup>3</sup>, Verica Ilieva<sup>3</sup>,  
Sonja Ivanovska<sup>4</sup>

**Abstract:** The main objective of this research is to determine the qualitative - technological properties at domestic two row winter barley genotypes.

The field trial of this study was conducted on the experimental area “Uniservis Agro” in two locations, Ovche Pole and Strumica, during two years (2012-2013 and 2013-2014). The experiment was set up according to the method of random block system in three repetitions for each genotype and locality by applying standard agro-techniques for barley.

As experimental material were used five domestic two row winter barley genotypes. Three of them are registered varieties (*Hit*, *Izvor* and *Egej*) and two are promising lines (*Line 1* and *Line 2*).

Barley genotypes were analyzed for the following qualitative - technological properties: protein content (%), grain uniformity from I class (%), water sensitivity (%), the degree of soaking (%), the weight of 1 000 grains (g) and hectoliter mass (kg/hl).

The content of protein was determined by content of total nitrogen using the method of Kjeldahl, while determining the grain uniformity from the I class, water sensitivity and degree of soaking were done according to the standards of the European Convention for the production of beer. Hectoliter mass was determined by standard ISO 797.

<sup>3</sup> Faculty of Agriculture, “Goce Delcev” University, Stip, Macedonia

<sup>4</sup> Faculty of Agricultural Sciences and Food, “Ss. Cyril and Methodius” University - Skopje



The results of the analysis of qualitative - technological properties were statistically processed with statistical package (Stat Soft, 8.0). Besides descriptive statistics, data of these properties were analyzed by the method of cluster analysis (Cluster Analysis, CA), in order to establish the connection or the distance of the tested genotypes based on qualitative - technological properties.

Generally, in both locations, obtained average dates for all qualitative - technological properties for all genotypes, average for the period of study, were in the optimal limit values, with exception of protein content, which in all genotypes was above 12 %. Genotypes *Line 1* and *Line 2* were singled out with the best qualitative - technological properties in both localities, but good grain quality also proved genotype *Izvor* analyzed in *Ovche Pole* locality. By applying the cluster analysis, based on the qualitative - technological properties, we got that all analyzed genotypes in both localities were closely interconnected, differentiated in one cluster, with the exception of genotype *Line 1*, grown in *Ovche Pole* locality.

**Key words:** *grain quality, technological properties, barley, genotype.*

## 1. Вовед

Производството на јачмен во Република Македонија е високо и квалитетно и истото може да ги задоволи европските стандарди за квалитет. Квалитетот на зрното, како и квантитетот на приносот зависи првенствено од сортата, а потоа и од други фактори, како што се: спроведената агротехника во производството и почвено-климатските фактори во кои се произведува сортата.

На Балканскиот Полуостров најголемо производство на јачмен за 2013 година има остварено Бугарија (819.000 t), а по неа следуваат Грција (353.400 t), Србија (344.357 t), Хрватска (201.339 t), Македонија (125.565 t), Босна и Херцеговина (70.844 t), Словенија (69.303 t), Албанија (7.500 t) и Црна Гора (1.650 t) [6].

Во нашата земја, во однос на засеана површина и вкупно производство, јачменот го зазема второто место, веднаш по пченицата. Во 2013 година, површините засеани со јачмен изнесуваат 42.234 ha, со просечен принос на единица површина 2.993 kg/ha [34].

Јачменот е едногодишна култура која првенствено се користи во производството на слад и пиво, но и во индустријата за производство на добиточна храна. Многу малку наоѓа примена во исхраната на човекот.

Освен приносот на зрно на единица површина, како примарна цел во селекцијата на секоја култура, многу важна задача во селекцијата на јачменот претставува и постигнувањето на висок квалитет на зрното.



Едни од најважните квалитетно-технолошки својства на јачменот кои влијаат врз квалитетот на зрното наменето за производство на пиво се: хектолитарската маса, изедначеноста на зрната од I класа, содржината на протеини и содржината на јаглехидрати [12, 30, 33, 38].

Висококвалитетните сорти на јачмен кои се користат во пиварската индустрија содржат 10-11% протеини, 63-65% јаглехидрати, имаат изедначеност на зрната од I класа над 85%, маса на 1.000 зрна од 40 g до 46 g, при влажност на зрното од 13% до 14%, степен на наакиснување од 42% до 47% и ниска водоосетливост [36].

Содржината на азот, односно протеини, претставува значајна квалитетна карактеристика и истата може да варира од 8,5% до 12,5% [8]. Во споредба со останатите житни култури, содржината на протеини во зрното од јачменот и пченицата е речиси многу слична (11 – 12%) и таа е повисока од содржината на протеините во зрното од пченката (9,5 %) и оризот (7,5 %) [18].

Употребата на јачменот со висока содржина на протеини во производниот процес на пиво води до неправилно разградување на протеините, а присуството на полифенол доведува до потемнување и тешко избистрување на пивото [28].

Познато е дека содржината на протеините кај житните култури се наследува полифакторијално, но исто така е под силно влијание на надворешните услови [3, 17, 26]. Недостатокот од врнежи во текот на вегетацијата кај житните култури, освен што предизвикува намалување на приносот на зрното, истовремено ги влошува и квалитетните својства на зрното кај јачменот [29, 31]. При повисока влажност во почвата, во зрното се формираат повеќе јаглехидрати и помалку протеини, додека при сушни периоди се намалува количеството на непротеинскиот азот [30]. Содржината на протеините, заедно со приносот на зрното кај јачменот, можат да бидат зголемени само со правилно и балансирано аплицирање на NP ѓубривата [1, 22]. Вишокот од овој тип на ѓубриво го намалува квалитетот на зрното од јачменот, предизвикува полегнување на растенијата и ја зголемува содржината на протеините во зрното [9]. Освен климатските фактори и ѓубривата, како фактори кои дополнително влијаат врз зголемување на содржината на азот во зрното се полегнувањето на растенијата и појавата на различни болести во текот на вегетацијата [35].

Масата на 1.000 зрна е квалитетно својство кое служи како индикатор за големината и збиеноста на зрната [16]. Проучувањата за наследување на ова својство покажуваат дека масата на 1.000 зрна зависи од генетските карактеристики на сортата, но во голема мера и од влијанието на условите на средината, особено во периодот кога настанува налевање на зрното



[10]. Од друга страна, пак, масата на 1.000 зрна е помалку осетлива на климатските фактори во споредба со приносот на зрно [25]. Најчесто дворедните форми на јачмен имаат повисоки вредности за ова својство во споредба со повеќередните форми [10]. Масата на 1.000 зрна е карактеристика која е силно поврзана со способноста на сортата за братање и со бројот на зрната во главниот клас [5, 24].

Хектолитарската маса е параметар за квалитетот на зрното и претставува важно технолошко својство на јачменот. Таа е меѓународно прифатен индустриски стандард за оценување на зрната кај житните култури. Ова својство е директно поврзано со густината на зрното, односно е показател за исполнетоста на семето. Хектолитарската маса најмногу зависи од климатските услови, агротехниката и потенцијалот на сортата [2, 16] и истата е во позитивна корелација со приносот на зрно. Сортите кои имаат повисоки вредности за ова својство се повеќе барани од производителите на пиво и фармерите [7]. Од тие причини, хектолитарската маса е предмет на проучување во голем број студии [11, 19, 21, 23, 27].

Целта на ова истражување е да се утврдат квалитетно-технолошките својства кај домашните дворедни форми на јачмен.

## **2. Материјал и метод на работа**

Полските опити за ова истражување беа поставени на опитните површини на производната единица „Унисервис агро“, во два локалитета, во текот на 2012-2013 и 2013-2014 година. Едниот локалитет беше Овче Поле, а другиот Струмица. Република Македонија е поделена на осум климатско-вегетациско почвени подрачја [40]. Според оваа класификација, двата локалитета на кои беше поставен опитот припаѓаат на континентално-субмедитеранско подрачје. Овчеполската Котлина спаѓа во најсушните региони на Балканскиот Полуостров, карактеризирајќи се со годишна сума од врнежи под 500 mm [39]. Во поглед на врнежите, во оваа Котлина владее значителна нерамномерност по месеци. Струмичката Котлина, пак, се одликува со релативно благи зими, долги суви лета и високи среднодневни температури. Просечните врнежи во оваа Котлина изнесуваат околу 600 литри на m<sup>2</sup>.

Опитите беа поставени според методот на случаен блок-систем, во три повторувања за секој генотип и локалитет, со примена на стандардна агротехника за јачменот. Сеидбата на двата локалитета и во двете години на поставување на опитот беше извршена рачно, во оптимален рок за сеидба на оваа култура.

Како експериментален материјал за овој труд беа употребени вкупно пет домашни генотипови на зимски дворедни форми на јачмен. Три од нив





се регистрирани сорти (*хит, извор и егеј*) и две се перспективни линии (*линија 1 и линија 2*).

Од квалитетно-технолошките својства на зрното на јачменот беа анализирани следниве параметри: содржина на протеини (%), изедначеност на зрната од I класа (%), водоосетливост (%), степен на наkisнување (%), маса на 1.000 зрна (g) и хектолитарска маса (kg/hl).

Содржината на протеините беше детерминирана преку утврдување на содржината на вкупен азот според методот на Kjeldahl [15]. Одредувањето на изедначеноста на зрната од I класа, водоосетливоста и степенот на наkisнување беа работени според стандардите на Европската конвенција за производство на пиво [4], додека хектолитарската маса беше анализирана со примена на стандардот ISO 797 [14].

Добиените резултати од испитувањето на квалитетно-технолошките својства, статистички се обработени со статистичкиот пакет (Stat Soft, 8.0). Освен дескриптивната статистика, податоците за овие својства беа анализирани и со методот на кластер анализа (Cluster Analysis, CA) [20], со цел да се утврди поврзаноста односно оддалеченоста на испитуваните генотипови, направена врз основа на квалитетно-технолошките својства.

Во табела 1 се дадени климатските карактеристики за Овче Поле и Струмица за периодот кога се вршени испитувањата, како и просечните вредности за истите од повеќегодишниот период (2001-2012 година).

**Табела 1.** Климатски карактеристики за периодот на вегетација на јачменот во двата локалитета

**Table 1.** Climate characteristics for the period of vegetation on barley for both locations

Година	Месеци										Просек/сума
	X	XI	XII	I	II	III	IV	V	VI		
Средномесечна температура на воздухот во Овче Поле (°C)											
2001-2012	13,6	7,7	3,1	0,0	0,2	8,6	13,7	17,2	24,4		9,8
2012 -2013	16,6	10,5	1,5	2,4	15,3	9,1	13,2	18,6	21,7		12,1
2013 - 2014	13,0	9,1	0,3	3,9	7,0	9,6	12,2	16,6	20,3		10,2
Месечна сума на врнежи во Овче Поле (mm)											
2001-2012	70,6	33,4	47,3	9,9	19,6	28,4	39,3	95,9	34,0		378,4
2012 -2013	40,6	37,4	33,7	33,6	119,3	35,0	63,2	44,8	23,8		431,4
2013 - 2014	11,8	65,8	20,3	42,1	12,8	25,0	148,2	59,3	69,3		454,6
Средномесечна температура на воздухот во Струмица (°C)											
2001-2012	13,3	7,3	3,0	-0,3	0,7	9,3	13,5	17,6	24,7		9,9
2012 -2013	15,3	9,6	1,5	3,2	16,7	8,9	15,2	20,4	22,1		12,5
2013 - 2014	13,0	9,4	1,5	4,5	7,2	10,1	12,8	17,5	21,7		10,9
Месечна сума на врнежи во Струмица (mm)											
2001-2012	83,2	44,5	79,4	40,9	53,0	35,7	49,1	155,4	18,6		559,8
2012 -2013	77,2	32,6	53,3	67,3	140,8	57,0	43,0	37,6	129,3		638,1
2013 - 2014	11,8	58,5	25,1	36,7	12,1	61,3	109,9	41,9	8,5		365,8



Од табела 1 се гледа дека и на двата локалитета и во двете експериментални години просечните средномесечни температури на воздухот се многу блиски. Генерално, на двата локалитета во првата година од поставување на опитот (2012-2013) се регистрирани повисоки просечни средномесечни температури на воздухот (во Овче Поле 12,1°C и 12,5°C во Струмица) во споредба со истите во втората експериментална година (2013-2014).

Што се однесува до сумата на врнежи, постојат значајни разлики во однос на двете години од поставување на опитот и на двата локалитета (табела 1). Значајно поголема сума на врнежи беше регистрирана во Струмица, во првата година од поставување на опитот (638, 1 mm).

### 3. Резултати и дискусија

Во табела 2 и 3 се презентирани просечните вредности добиени за квалитетно-технолошките својства кај испитуваните генотипови, одделно за двата локалитета.

Од табела 2 и 3 се гледа дека просечните вредности за содржината на протеините, кај сите генотипови заедно, анализирани во Овче Поле и во двете експериментални години се повисоки во споредба со просечните вредности за ова својство, добиени за генотиповите одгледувани на локалитетот Струмица.

Генерално, кај сите испитувани генотипови беше утврдена повисока содржина на протеини од 12%. Просечната вредност за содржината на протеини, за генотиповите одгледувани во Овче Поле, за периодот на испитување беше 14,22%, додека истата за генотиповите испитувани на локалитетот Струмица изнесуваше 13,49%. Од сите анализирани генотипови на локалитетот Овче Поле, просечно за периодот на испитување, за генотипот *извор* беше добиен најмал процент за содржината на протеини (13,17 %), додека на локалитетот Струмица таков генотип беше *линија 1* (12,87 %).

Познато е дека сортите кои се користат во производството на пиво треба да имаат пониска содржина на протеини во зрното [37]. Од друга страна пак, високата содржина на протеини во зрното на јачменот, придонесува истиот да биде погоден за употреба во сточарското производство [13].

Издначеноста на зрната кај јачменот е својство кое силно варира и може да изнесува од 55,2% до 96,9% [32].

Резултатите од нашето истражување, за ова својство, покажуваат дека и на двата локалитета и во двете години од поставување на опитот анализираниите генотипови имаат висок процент на издначеност на зрната од I класа и се во оптималните граници (табела 2 и 3).



Просечните вредности за изедначеноста на зрната од I класа, кај сите анализирани генотипови заедно, одгледувани во Овче Поле и во двете експериментални години беа повисоки, во споредба со истите добиени за генотиповите одгледувани на локалитетот Струмица. Средната вредност за ова својство, пресметана за сите анализирани генотипови во Овче Поле изнесуваше 84,9% и 82,0% во Струмица.

И на двата локалитета, просечно за периодот на испитување, највисок процент за изедначеноста на зрната од I класа имаше генотипот *линија 2*.



**Табела 2.** Просеци вредности за квалитетно-технолошките својства кај анализираниите генотипови испитувани на локалитетот Овче Поле  
**Table 2.** Average values for qualitative – technological properties on analyzed genotypes grown in Ovche Pole locality

Генотип	Содржина на протеини (%)				Изданченост на зрнага од I класа (%)				Водоосетливост (%)				Степен на накупенување (%)				Маса на 1.000 зрна (g)				Хектолитарска маса (kg/hl)									
	2012-2013	2013-2014	2012-2013	2013-2014	2012-2013	2013-2014	2012-2013	2013-2014	2012-2013	2013-2014	2012-2013	2013-2014	2012-2013	2013-2014	2012-2013	2013-2014	2012-2013	2013-2014	2012-2013	2013-2014	2012-2013	2013-2014	2012-2013	2013-2014	2012-2013	2013-2014	2012-2013	2013-2014	2012-2013	2013-2014
	Просек	Просек	Просек	Просек	Просек	Просек	Просек	Просек	Просек	Просек	Просек	Просек	Просек	Просек	Просек	Просек	Просек	Просек	Просек	Просек	Просек	Просек	Просек	Просек	Просек	Просек	Просек	Просек	Просек	Просек
<i>Хит</i>	14,09	14,50	14,30	14,30	78,6	86,3	82,5	26,0	67,0	46,5	46,28	45,32	45,80	41,0	46,5	43,8	60,35	53,60	60,35	53,60	56,98	56,98	56,98	56,98	56,98	56,98	56,98	56,98	56,98	56,98
<i>Изаор</i>	13,59	12,75	13,17	13,17	79,5	93,1	86,3	32,0	60,0	46,0	46,80	45,05	45,93	40,5	51,0	45,8	56,82	56,08	56,82	56,08	56,45	56,45	56,45	56,45	56,45	56,45	56,45	56,45	56,45	
<i>Езеј</i>	13,85	14,91	14,38	14,38	70,8	86,4	78,6	20,0	60,5	40,3	44,20	44,12	44,16	35,1	47,0	41,1	56,10	58,29	56,10	58,29	57,20	57,20	57,20	57,20	57,20	57,20	57,20	57,20	57,20	
<i>Линија 1</i>	14,17	14,91	14,54	14,54	80,1	89,1	84,6	36,0	79,5	57,8	44,58	44,58	43,86	43,0	47,5	45,3	62,15	58,30	62,15	58,30	60,23	60,23	60,23	60,23	60,23	60,23	60,23	60,23	60,23	60,23
<i>Линија 2</i>	15,16	14,25	14,71	14,71	91,7	88,2	90,0	21,0	64,5	42,8	44,58	45,59	45,09	45,5	47,5	46,5	60,35	56,97	60,35	56,97	58,66	58,66	58,66	58,66	58,66	58,66	58,66	58,66	58,66	58,66
Просек	14,17	14,26	14,22	14,22	80,1	88,6	84,9	27,0	66,3	46,7	45,00	44,93	44,97	41,0	47,9	44,5	59,15	56,65	59,15	56,65	57,90	57,90	57,90	57,90	57,90	57,90	57,90	57,90	57,90	57,90
Мин.	13,59	12,75	13,17	13,17	70,8	86,3	78,6	20,0	60,0	40,3	43,14	44,12	43,86	35,1	46,5	41,1	56,10	53,60	56,10	53,60	56,45	56,45	56,45	56,45	56,45	56,45	56,45	56,45	56,45	
Мак.	15,16	14,91	14,71	14,71	93,1	93,1	90,0	36,0	79,5	57,8	46,80	45,59	45,93	45,5	51,0	46,5	62,15	58,30	62,15	58,30	60,23	60,23	60,23	60,23	60,23	60,23	60,23	60,23	60,23	60,23
StDev.	0,60	0,89	0,61	0,61	7,48	2,77	4,24	6,93	7,93	6,70	1,51	0,59	0,94	3,85	1,78	2,16	2,58	1,95	2,58	1,95	1,54	1,54	1,54	1,54	1,54	1,54	1,54	1,54	1,54	1,54
CV (%)	4,21	6,25	4,27	4,27	9,33	3,13	5,02	25,66	11,96	14,37	3,36	1,31	2,08	9,39	3,72	4,85	4,36	3,43	4,36	3,43	2,65	2,65	2,65	2,65	2,65	2,65	2,65	2,65	2,65	2,65

**Табела 3.** Просеци вредности за квалитетно-технолошките својства кај анализираниите генотипови испитувани на локалитетот Струмица  
**Table 3.** Average values for qualitative – technological properties on analyzed genotypes grown in Strumica locality

Генотип	Содржина на протеини (%)				Изданченост на зрнага од I класа (%)				Водоосетливост (%)				Степен на накупенување (%)				Маса на 1.000 зрна (g)				Хектолитарска маса (kg/hl)									
	2012-2013	2013-2014	2012-2013	2013-2014	2012-2013	2013-2014	2012-2013	2013-2014	2012-2013	2013-2014	2012-2013	2013-2014	2012-2013	2013-2014	2012-2013	2013-2014	2012-2013	2013-2014	2012-2013	2013-2014	2012-2013	2013-2014	2012-2013	2013-2014	2012-2013	2013-2014	2012-2013	2013-2014	2012-2013	2013-2014
	Просек	Просек	Просек	Просек	Просек	Просек	Просек	Просек	Просек	Просек	Просек	Просек	Просек	Просек	Просек	Просек	Просек	Просек	Просек	Просек	Просек	Просек	Просек	Просек	Просек	Просек	Просек	Просек	Просек	Просек
<i>Хит</i>	12,06	14,75	13,41	13,41	87,4	83,0	85,2	44,0	77,0	60,5	45,09	45,08	45,09	42,0	42,5	42,3	60,91	56,89	60,91	56,89	58,90	58,90	58,90	58,90	58,90	58,90	58,90	58,90	58,90	
<i>Изаор</i>	12,68	14,42	13,55	13,55	81,4	85,6	83,5	26,0	71,0	48,5	45,62	46,44	46,03	40,0	42,5	41,3	53,98	55,35	53,98	55,35	54,67	54,67	54,67	54,67	54,67	54,67	54,67	54,67	54,67	
<i>Езеј</i>	13,35	14,91	14,13	14,13	62,8	81,3	72,1	34,0	73,5	53,8	45,63	46,46	46,05	35,0	40,0	37,5	59,03	54,08	59,03	54,08	56,56	56,56	56,56	56,56	56,56	56,56	56,56	56,56	56,56	
<i>Линија 1</i>	12,81	12,93	12,87	12,87	73,7	88,5	81,1	41,0	83,5	62,3	46,02	44,90	45,46	40,0	44,5	42,3	61,25	53,67	61,25	53,67	57,46	57,46	57,46	57,46	57,46	57,46	57,46	57,46	57,46	
<i>Линија 2</i>	12,85	14,17	13,51	13,51	85,9	90,5	88,2	14,0	58,0	36,0	46,13	46,83	46,48	40,5	43,5	42,0	61,30	56,59	61,30	56,59	58,95	58,95	58,95	58,95	58,95	58,95	58,95	58,95	58,95	
Просек	12,75	14,24	13,49	13,49	78,2	85,8	82,0	31,8	72,6	52,2	45,70	45,94	45,82	39,5	42,6	41,1	59,29	55,32	59,29	55,32	57,31	57,31	57,31	57,31	57,31	57,31	57,31	57,31	57,31	
Мин.	12,06	12,93	12,87	12,87	62,8	81,3	72,1	14,0	58,0	36,0	45,09	44,90	45,09	35,0	40,0	37,5	53,98	53,67	53,98	53,67	54,67	54,67	54,67	54,67	54,67	54,67	54,67	54,67	54,67	
Мак.	13,35	14,91	14,13	14,13	87,4	90,5	88,2	44,0	83,5	62,3	46,13	46,83	46,48	42,0	44,5	42,3	61,30	56,89	61,30	56,89	58,95	58,95	58,95	58,95	58,95	58,95	58,95	58,95	58,95	
StDev.	0,46	0,78	0,45	0,45	10,14	3,79	6,14	12,13	9,42	10,59	0,41	0,89	0,55	2,65	1,67	2,03	3,11	1,44	3,11	1,44	1,79	1,79	1,79	1,79	1,79	1,79	1,79	1,79	1,79	
CV (%)	3,63	5,51	3,33	3,33	12,96	4,42	7,49	38,15	12,97	20,28	0,90	1,93	1,20	6,70	3,93	4,94	5,25	2,61	4,94	5,25	2,61	3,12	3,12	3,12	3,12	3,12	3,12	3,12	3,12	



Водоосетливоста кај јачменот е доста варијабилно својство и има широк опсег на варирање од 14% до 70% [32, 41]. Од табела 2 и 3 се гледа дека и во двете експериментални години просечните вредности за ова својство се повисоки кај генотиповите анализирани на локалитетот Струмица, во споредба со истите испитувани во Овче Поле. Во првата експериментална година (2012-2013) и на двата локалитета имаше пониски просечни вредности за водоосетливоста (за генотиповите анализирани во Овче Поле 27,0%, додека во Струмица 31,8%), во споредба вредностите добиени во втората година од поставување на опитот (2013-2014). Средната вредност за водоосетливоста пресметана за сите анализирани генотипови во Овче Поле за периодот на испитување изнесуваше 46,7% и 52,2% во Струмица. Генотипот *линија 1* на двата локалитета, просечно за периодот на истражувањето, покажа највисок процент за водоосетливост (на локалитетот Овче Поле 57,8% и 62,3% во Струмица).

Оптималните вредности за степенот на наkisнување кај висококвалитетните генотипови на јачмен наменети за производство на пиво изнесуваат од 42% до 47% [36]. Во нашето истражување просечните вредности за ова квалитетно-технолошко својство, за периодот на испитување, на двата локалитета се многу блиски (на локалитетот Овче Поле 44,97%, а во Струмица 45,82%) и се во граница на оптималните вредности. Генотипот *извор* покажа највисока просечна вредност за степенот на наkisнување (45,93 %), за периодот на испитување во Овче Поле, додека на локалитетот Струмица највисок процент за ова својство добивме за генотипот *линија 2* (46,48 %).

Добиените вредности од испитувањето на масата на 1.000 зрна, за двата локалитета одделно, се дадени во табели 2 и 3. Просечните вредности за ова својство, во двете години на испитување, се повисоки за генотиповите одгледувани на локалитетот Овче Поле, во споредба со истите добиени за генотиповите анализирани во Струмица. Средната вредност за масата на 1.000 зрна, за сите генотипови одгледувани во Овче Поле, за периодот на испитување, изнесуваше 44,5 g, додека на локалитетот Струмица 41,4 g. Од истражувањата спроведени на локалитетот Овче Поле, за ова својство, највисока средна вредност, просечно за двете години на испитување, добивме за генотипот *линија 2* (46,5 g), додека на локалитетот Струмица такви генотипови беа *хит* и *линија 1* (42,3 g).

Просечните вредности за масата на 1.000 зрна кај некои сорти може да изнесуваат од 34,5 g до 59,5 g [41]. Добиените вредностите за ова квалитетно својство, од нашето истражување се во границите на овие оптимални вредности.

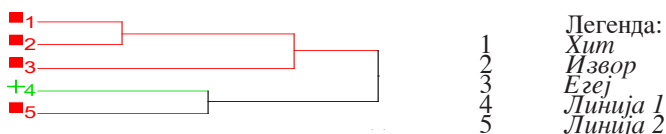
Хектолитарската маса е важен параметар за квалитетот на зрното кај јачменот и е поврзана со големината и исполнетоста на зрната.



Ако се направи споредба на просечните вредности за ова својство, за периодот на испитување, ќе се види дека и на двата локалитета овие средни вредности се многу блиски (во Овче Поле 57,90 kg/hl, додека во Струмица 57,31 kg/hl). Во првата експериментална година (2012-2013) и на двата локалитета се добиени повисоки средни вредности за ова својство, во однос на втората година од истражувањето. Во нашето истражување спроведено во Овче Поле добивме дека генотипот *линија 1* има највисока средна вредност за хектолитарската маса (60,23 kg/hl), за периодот на испитување, додека на локалитетот Струмица како таков генотип беше *линија 2* (58,95 kg/hl).

На двата локалитета, од сите анализирани квалитетно-технолошки својства, најмало варирање покажа својството степен на наkisнување (во Овче Поле 2,08%, додека во Струмица 1,20%).

Поврзаноста односно оддалеченоста на испитуваните генотипови направена врз основа на податоците за квалитетно-технолошките својства за двата локалитета одделно е претставена со кластер анализа (слики 1 и 2). Од слика 1 се гледа дека сите анализирани генотипови во Овче Поле се поврзани меѓу себе во еден кластер, со исклучок на генотипот *линија 1*. Најмногу блиски врз основа на овие својства се генотиповите *хит* и *извор*, додека најоддалечени се *хит* и *линија 2*.



**Слика 1.** Кластер анализа врз основа на квалитетно-технолошките својства кај анализираниите генотипови за периодот на испитување на локалитетот Овче Поле  
**Figure 1.** Cluster analysis based on qualitative – technological properties on analyzed barley genotypes during the period of study in Ovche Pole locality

Што се однесува до степенот на поврзаност, односно оддалеченост на анализираниите генотипови на локалитетот Струмица, од слика 2 се гледа дека сите тие врз основа на квалитетно-технолошките својства се меѓусебно поврзани во еден кластер. Најголема поврзаност постои помеѓу генотиповите *хит* и *линија 1*, како и помеѓу генотиповите *извор* и *линија 2*. На овој локалитет, најоддалечени се покажаа генотиповите *хит* и *егеј*.



**Слика 2.** Кластер анализа врз основа на квалитетно-технолошките својства кај анализираниите генотипови за периодот на испитување на локалитетот Струмица

**Figure 2.** Cluster analysis based on qualitative – technological properties on analyzed barley genotypes during the period of study in Strumica locality

#### 4. Заклучок

Од ова истражување, врз основа на резултатите добиени за квалитетно-технолошките својства можат да се утврдат следниве заклучоци:

- сите анализирани квалитетно-технолошки својства се во границите на оптималните вредности со исклучок на содржината на протеини, која кај сите анализирани генотипови е повисока од 12%;
- во двата локалитета, во првата година од испитувањето, добивме повисоки просечни вредности за степенот на на киснување и хектолитарската маса;
- за сите генотипови кои беа предмет на проучување на локалитетот Овче Поле, просечно за периодот на истражување, повисоки средни вредности добивме за следниве квалитетно-технолошки својства: содржина на протеини, изедначеност на зрната од I класа, маса на 1.000 зрна и хектолитарска маса;
- генотиповите *линија 1* и *линија 2* се издвоија со најдобри квалитетно-технолошки својства и во двата локалитета, но со добар квалитет на зрното се покажа и генотипот *извор*, анализиран на локалитетот Овче Поле;
- со кластер анализата направена врз основа на квалитетно-технолошките својства се покажа дека сите анализирани генотипови и на двата локалитета се блиско поврзани меѓусебе, издиференцирани во еден кластер, со исклучок на генотипот *линија 1*, испитуван на локалитетот Овче Поле.

#### 5. Користена литература

- [1] Aguirre, A., Rubiolo, J.O., Ribotta, D.P., Luján, S.J., Pérez, T.G., León D.E. (2006). Effects of incident radiation and nitrogen availability on the quality parameters of triticale grains in Argentina. *Experimental Agriculture*, 42: 311–322.



- [2] Bregitzer, P., Mornhinwig, D., Jones B. (2003). Resistance to Russian wheat aphid damage derived from STARS9301B Protects agronomic performance and malting quality when transferred to adapted barley germplasm. *Crop Science* 43: 2050-2057.
- [3] Drezner G., Dvojković, K., Horvat, D., Novoselović, D., Lalić A. (2007). Environmental impacts on wheat agronomic and quality traits. *Cereal Research Communications*, 35(2): 357-360.
- [4] European Brewery Convention (1998). Analytical, European Brewery Convention. Nurnberg, Germany, Verlag Hans Carl Getranke, Fachverlag.
- [5] Evans, L.T., Wardlaw I.F. (1976). Aspects of the comparative physiology of grain yield in cereals. In: N.C. Brady (Ed). *Advance in Agronomy*, 28: 301-359.
- [6] FAOSTAT, (2014). Food and Agriculture Organization of the United Nations, <http://faostat3.fao.org/home/E>.
- [7] Fox, G.P., Stuart, J., Kelly A. (2007). Value of the test weight method in assessing barley quality. *Proceedings of the 13th Australian Barley Technical Symposium*, Fremantle, Australia.
- [8] Gali, V.J., Brown C.G. (2000). Assisting decision-making in Queensland barley production through chance constrained programming. *Australian Journal Agricultural Resource Economics*, 44: 269–287.
- [9] Glamoclija, D., Lazarevic, J., Kovacevic, D., Ružicic L. (1998). Effects of nitrogen top dressing and microelements foliar fertilization on the yield and yield components of malting barley. *Proceedings, Breeding of Small Grains*, 401-40.
- [10] Hadjichristodoulou A. (1990). Stability of 1000-grain weight and its relation with other traits of barley in dry stress. *Euphytica*, 51: 11-17.
- [11] Hatfield, PG., Hopkins, JA., Pritchard, GT., Hunt CW. (1997). The effects of the amount of whole barley, barley bulk density and form of roughage on feedlot lamb performance, carcass characteristics and digest kinetics. *Journal of Animal Science*, 75: 3353 – 3356.
- [12] Hayesa P., Castroa, A., Marquez-Cdilloa, L., Coreya, A., Henson, C., Jones, B., Klinga, J., Matherd, D., Matusa, I., Rossia, C., Satoe K. (2004). Genetic diversity for quantitatively inherited agronomic and malting quality traits. *Plant Breeding*, 119: 130-139.
- [13] Hunt C.W. (1996). Factors affecting the feeding quality of barley for ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, 62: 37–48.
- [14] ISO 797 - Determination of mass per hectoliter.
- [15] Kjeldahl J. (1883). A new method for the estimation of nitrogen in organic compounds. *Journal of Analytical Chemistry*, 22: 366.





- [16] Lalevic, D., Biberdzic M. (2012). The influence of weather conditions and nitrogen fertilization of some characteristics of winter barley. Book of proceedings. Third International scientific symposium “Agrosym Jahorina 2012”, 245-249. (ISBN 978-99955-751-0-6).
- [17] Lalić, A., Kovačević, J., Šimić, G., Drezner, G., Guberac V. (2007). Environmental effects on grain yield and malting quality parameters of winter barley. *Cereal Research Communications*, 35(2): 709-712.
- [18] Lockhart, H.B., Hurt D.H. (1986). Nutrition of oats. In: WEBSTER, F.H.(Ed.) *Oats: Chemistry and Technology*, St Paul: AACC, 297-308.
- [19] Mathison, GW., Hironaka, R., Kerrigan, BK., Vlach, I., Milligan, LP., Weisenburger RD. (1991). Rate of starch digestion, apparent digestibility and rate and efficiency of steer grain as influenced by barley grain volume-weight and processing method: *Canadian Journal of Animal Science*, 71: 867-878.
- [20] Mohammadi, S.A., Prasanna B.M. (2003). Analysis of genetic diversity in crop plants-salient statistical tools and considerations. *Crop Science*, 43: 1235-1248.
- [21] Oddy, VH., Ewoldt, CL., Jones, AW., Warren HM. (1990). Metabolisable energy content of diets based on oats grain: *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 30: 503-506.
- [22] Pawlonka, Z., Skrzyczyńska J. (2004). The effect of selected agro technical factors and weather conditions on the weeding of winter triticale. *Annals UMCS, Sec. E*, 59: 1037-1047.
- [23] Perttila, S., Valaja, J., Partanen, K., Jalave T. (2001). Effect of volume-weight on apparent ileal and excreta amino acid digestibility and feeding value of barley for poultry. *Journal of Animal and Feed Science*, 10: 671-685.
- [24] Reid, D.A., Wiebe G.A. (1979). Taxonomy, botany classification and world collection. Barley: Origin, botany, culture, winter hardiness, genetics, utilization, pests. *USDA Agriculture Handbook*, 338: 79-104.
- [25] Tapsell, C.R., Thomas W.T.B. (1981). Estimating the genetically components for cross-prediction of yield and its components in barley, Edinburgh. *Barley Genetics*, IV: 79-83.
- [26] Varga, B., Svečnjak, Z., Jurković, Z., Pospišil M. (2007). Quality responses of winter wheat cultivars to nitrogen and fungicide applications in Croatia. *Acta Agronomica Hungarica*, 55(1): 37-48.
- [27] Wiseman J. (2000). Correlation between physical measurements and dietary energy values of wheat for poultry and pigs. *Animal Feed Science and Technology*, 84: 1-11.



- [28] Аткисон Б. (1990). Технически възможности при производство на малц и пиво. IX Национална научно-техническа Конференција по пивоварна промишленост, Варна.
- [29] Вълчев Д. (2007). Проблеми, постижения и перспективи в селекцията по сухоустойчивост и студоустойчивост при ечемика. *Field Crops Studies*, IV(1): 5-18.
- [30] Вълчева Д. (2000). Адаптивен потенцијал и селекционо-генетични възможности за подобряване качеството на пивоварниот ечемик. Докторска дисертација. Селскостопанска Академија, Институт по ечемика, Карнобат, Бугарија, 163.
- [31] Вълчева, Д., Вълчев, Д., Навушанов С. (1996). Адаптивни възможности на американски сортове ечемик към условията на Югоизточна България, *Научни трудове*, VII: 42-47.
- [32] Вълчева, Д., Вълчев Д. (2005). Подобряване качеството на зърното в селекцията на пивоварен ечемик. Балканска научна конференция, Карнобат.
- [33] Вълчева, Д., Вълчев, Д., Димова, Д., Гочева, М., Дюолерова, Б., Попова Т. (2011). Проблеми, насоки, постижения и перспективи и селекцијата на зимниот ечемик. *Селскостопанска Наука*, 44: 22-35.
- [34] Државен завод за статистика на Република Македонија (2013). Полјоделство, овоштарство и лозарство, 2013. Статистички преглед, земјоделство, стр. 60. ISBN 978-608-227-135-4. Преземено на 12.09.2014 г. (<http://www.stat.gov.mk/publikacii/5.4.14.02.pdf>).
- [35] Костадинова, С., Ганушева Н. (2012). Съдржание на макроелементи в нови генотипове пивоварен ечемик. *Field Crops Studies*, VIII(1): 7-14.
- [36] Манчев СТ. (1975). Изисквания към пивоварните качества на ечемика. Пивоварен ечемик, Пловдив, 47-58.
- [37] Палмар Д.Ж. (1990). Влияние на качеството на малца върху работата на варилното отделение. X Международна научно-техническа конференция по пивоварна промишленост, Варна.
- [38] Степанов А.Н. (1986). Влияние удобрений на урожай и пивоварне качества ячмена. *Научнотехнички бюлетин*.
- [39] Филиповски Ѓ. (1959). Генеа, еволуција и научне основе мелиорација слатина Овчег Појла. Докторска дисертација, Белград.
- [40] Филиповски, Ѓ., Ризовски, Р., Ристевски П. (1996). Карактеристики на климатско-вегетационо почвените зони (региони) во Република Македонија. Македонска академија на науките и уметностите, Скопје, 177.
- [41] Хараланов, В., Костова С. (1968). Сравнителни проучвания на зимни сортове двуреден ечемик. *Растениевъдни науки*, 5(8): 43-50.





Оригинален научен труд

УДК 543.51:546

**МЕТОД ЗА ОДРЕДУВАЊЕ НА СОДРЖИНАТА НА 35 ЕЛЕМЕНТИ  
ВО РАЗЛИЧНИ ПРИМЕРОЦИ СО ПРИМЕНА НА  
МИКРОБРАНОВА ДИГЕСТИЈА И ИНДУКТИВНО СПРЕГНАТА  
ПЛАЗМА СО МАСЕНА СПЕКТРОМЕТРИЈА (ICP-MS)**

Биљана Балабанова<sup>1\*</sup>, Блажо Боев<sup>2</sup>, Саша Митрев<sup>1</sup>,  
Виолета Иванова-Петропулос<sup>1</sup>

**Апстракт:** Индуктивно спрегната плазма со масена спектрометрија (ICP-MS) и микробранов систем за дигестија беа користени како работни техники за одредување на содржината на 35 елементи (Ag, Al, As, B, Ba, Be, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cs, Cu, Fe, Ga, Ge, Hg, K, Li, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, P, Pb, Rb, Sb, Se, Sn, Sr, Ti, V и Zn) во примероци од масло за јадење, овошје, зеленчук и алкохолни пијалаци. Овој труд опфаќа оптимизација и валидација на условите за мерење на изотопите на елементите во дигестираните примероци. Валидацијата на методата е направена преку определување на границата на детекција и квантификација, линеарноста, мерниот опсег и мерната неодреденост, како и точноста и прецизноста (повторливост и репродуктивност) на мерењата. Испитуваните параметри укажуваат дека методата ги задоволува барањата за предвидената употреба.

**Клучни зборови:** елементи, масло за јадење, овошје, зеленчук, алкохолни пијалаци, микробранова дигестија, ICP-MS.

**METHOD FOR DETERMINATION OF 35 ELEMENTS CONTENT  
IN VARIOUS SAMPLES WITH APPLICATION OF MICROWAVE  
DIGESTION AND INDUCTIVELY COUPLED PLASMA WITH MASS  
SPECTROMETRY (ICP-MS)**

Biljana Balabanova<sup>3\*</sup>, Blazo Boev<sup>4</sup>, Sasa Mitrev<sup>3</sup>,  
Violeta Ivanova-Petropulos<sup>3</sup>

**Abstract:** Inductively coupled plasma with mass spectrometry (ICP-MS) and microwave digestion system were used as working techniques for

<sup>1</sup> Земјоделски факултет, Универзитет „Гоце Делчев“, Штип, Р. Македонија

<sup>2</sup> Факултет за природни и технички науки, Универзитет „Гоце Делчев“, Штип,

<sup>3</sup> Faculty of Agriculture, “Goce Delčev” University, Stip, R. Macedonia

<sup>4</sup> Faculty of Natural and Technical sciences, “Goce Delčev” University, Stip, R. Macedonia



determining the content of 35 elements (Ag, Al, As, B, Ba, Be, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cs, Cu, Fe, Ga, Ge, Hg, K, Li, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, P, Pb, Rb, Sb, Se, Sn, Sr, Ti, V and Zn) in various samples: edible oils, fruits, vegetables and alcoholic beverages. This paper includes optimization and validation of the conditions for measurement of the elements isotopes in prepared samples. Method validation was done using calculation of the limit of detection and quantification, lineary, measurement range and measurement uncertainty, as well as the accuracy and precision of the measurements. The examined parameters indicated that the method meets the requirements for the intended use.

**Kew words:** *elements, edible oils, fruits, vegetables, alcoholic beverages, microwave digestion, ICP-MS.*

## 1. Introduction

The objective of any analytical measurement is to obtain consistent, reliable and accurate data [1]. Validated analytical methods play a major role in achieving this goal. The results from method validation can be used to judge the quality, reliability and consistency of analytical results, which is an integral part of any good analytical practice. Validation of analytical methods is also required by most regulations and quality standards that impact laboratories. The objective of validating an analytical procedure is to demonstrate the “suitability for its intended purpose” [1, 2]. The intent of analytical measurement is to generate accurate and reliable data. Method validation alone cannot guarantee this, but it should be part of integrated quality assurance for analytical measurement. Instrument qualification and method validation are equally important. Instrument qualification means that the specifications are defined, tested and confirmed so that the instrument is suitable for the methods to be validated [3]. The analytical methods are then validated on qualified instruments to prove that the method works as intended. This is independent of any specific instrument. If we want to use the method with instruments from different vendors, the method should be validated on those instruments as well. Method validation occurs between analytical instrument qualification and system suitability testing and is linked to all other quality elements. Methods should be validated using qualified instruments [4-6]. During method validation, parameters and acceptance criteria for system suitability checks and quality control checks should be defined.

The main goal of this work was method development and validation of a multi-element analysis of various samples, such as edible oil, fruit and vegetable samples and alcoholic beverages. For that purpose, microwave digestion was applied for total digestion of the samples and inductively coupled plasma with mass spectrometry was used for measurements of the elements contents.



## 2. Material and methods

### 2.1. Standards and reagents

The standards for ICP-MS were prepared from multielement stock solution (Periodic table Mix 1 for ICP, 10 mg/L, Sigma Aldrich, Munich, Germany) containing 33 elements (Al, As, Ba, Be, Bi, B, Cd, Ca, Cs, Cr, Co, Cu, Ga, In, Fe, Pb, Li, Mg, Mn, Ni, P, K, Rb, Se, Si, Ag, Na, Sr, S, Te, Tl, V, and Zn). Single-element standards were used for the construction of the calibration curves for Ti, Ge, Sb, Sn, and Mo (10 ppm in 10 % HNO<sub>3</sub> trace select, Sigma Aldrich, Munich, Germany). Spiked solutions were prepared from the stock solution as necessary. Ultrapure nitric acid, HNO<sub>3</sub> (69.0 %, w/w, trace select, Sigma Aldrich, Munich, Germany) and hydrogen peroxide H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (69.0 %, w/w, trace select, Sigma Aldrich, Munich, Germany) were used in a mixture for total digestion of samples. Rhodium standard solution (1 mg/L, Sigma Aldrich, Munich, Germany) was used as an internal standard for correction of the drifts for external calibration curves. Ultrapure water was used (0.065 µS/cm), obtained from water purification system TKA Microlab, ASTM Type II water (Thermo Electron LED GmbH, Germany).

### 2.2. Microwave-assisted digestion for sample preparation

In this study, five step set or combination of power, pressure, and time conditions for microwave-assisted digestion (Table 1) was tested using two CRMs representing edible oil (CRM-TMSO, soybean oil, High purity standards, Charleston, South Carolina, USA) and aquatic plant (*Lagarosiphon major*) to determine the optimum set of conditions. This method was described for use with 12 microwave vessels simultaneously.

Microwave-assisted digestion conditions involved the digestion of 0.5 g of the CRM with 5 mL HNO<sub>3</sub> and 2 mL of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the microwave oven. After digestion, the vessels were allowed to cool until the pressure of the vessel was reduced to below 50 psi and temperature was below 40 °C. The caps of each vessel were then carefully removed and the contents were filtered using 2 µm filter paper, diluted to 25 mL in a volumetric flask using deionized water, and stored in polyethylene vial prior to the final determination of the elements' concentration.



**Table 1.** Microwave digestion program for digestion of oil and wine samples

Step	Initial <i>T</i> (°C)	Final <i>T</i> (°C)	Power (W)	Time (min.)
1	25	150	800	15
2	150	150	800	10
3	150	180	1600	5
4	180	200	1600	10
5	200	200	800	5

### 2.3. ICP-MS measurements

A standard Agilent 7500cx ICP-MS system with a glass concentric nebulizer was used for all analyses. The instrument was tuned for standard robust plasma conditions (Table 2) and the ORS was operated in helium mode only. This means that all elements were measured under identical helium mode collision conditions and no mode switching was necessary. Furthermore, the helium mode conditions used are generic and do not have to be set up or modified for specific sample matrices. Method parameters are shown in Table 2. In this work an extended sequence of samples simulating the workload in a typical environmental laboratory was analysed repeatedly for more than 10 hours. The samples included high dissolved organic matrix and spikes, dissolved CRM's, and duplicates.

**Table 2.** Instrument (ICP-MS) tune and acquisition conditions used

Instrument		
Sampler cone	Ni (standard)	
Skimmer cone	Ni (standard)	
Nebulizer	MicroMist (standard)	
Plasma torch	Quartz, 2.5 mm (standard)	
Tune Parameters	Normal mode	He mode
RF power	1500 W	Same
Sample depth	7.6 mm	Same
Carrier gas	1.00 L/min	Same
Makeup gas	0.25 L/min	Same
Spray chamber temperature	2°C	Same
Extract 1	+6 V	Same
Extract 2	-145 V	Same
Omega bias	-24V	Same
Omega lens	-0.6 V	Same
Cell entrance	-30 V	Same
Energy discrimination	3 V	Same
Cell exit	-30 V	-44 V
Octopole bias	-7 V	-18 V
QP bias	-3.5 V	-14.5 V
Reaction gas	0	4.5 mL/min
CeO/Ce	0.55%	He 0.45%
Ce++/Ce	2.08%	1.95%



## 2.4. Validation procedures

Using calibration solutions calibration curves:  $y = ax + b$ , were determined, where  $y$  is the signal intensity and  $x$  is the known concentration of the given analyte in the calibration solution. The *linearity* of the calibration curve was considered acceptable with correlation factor  $R > 0.999$ .

The *limit of detection* (LOD) is the lowest concentration or quantity of analyte which can be measured with reasonable statistical certainty. To determine the limit of detection 3SD method was used. Ultra-pure water was aspirated and signal intensities for blank were recorded. A solution of 10  $\mu\text{g/L}$  multi-element solution was aspirated and the signal intensities for the analytes were recorded. The analysis of the blank solution (2 mL  $\text{H}_2\text{O}_2$  and 5 mL  $\text{HNO}_3$ , diluted to final volume of 25 mL) for all target elements for 10 times with three repetitions at each measurement was conducted.

The *limit of quantification* (LOQ) is the lowest concentration that can be quantitatively determined with an acceptable level of repeatability accuracy. The quantification limit is generally considered to be approximately ten times the minimum detection limit. The maximum measurement limit is conditioned by the dynamics of the spectrometer detectors and limited by the requirement that the total amount of the dissolved solid must not exceed 0.2% in the sample solution (unless clogging of the nebulizer nozzles would lead to instabilities and loss of sensitivity). To test the maximum detection limit, a multi-element sample of 10 mg/L was used.

The *validated range* is the interval of analyte concentration within which the method can be regarded as validated. While the calibration may cover a wide concentration range, the remainder of the validation (and usually much more important part in terms of uncertainty) will cover a more restricted range. In practice, most methods will be validated at only one or two levels of concentration. The validated range may be taken as a reasonable extrapolation from these points on the concentration scale [1].

*Precision* was defined as relative standard deviation (RSD) which was calculated as a percentage using the standard deviation divided by the mean of replicated samples.

*Repeatability* concerns the test results obtained with the same method, on the same sample in the same laboratory, with the same equipment, by the same operator, in short intervals of time.

*Reproducibility* was expressed as the closeness of agreement between test results obtained with the same method on identical test material analysed from two analysts. *T*-test was used as a statistical parameter for the reproducibility testing [1].

*Accuracy* was determined by comparing the measured concentration





with the certified values and was expressed as percentage recovery  $R$  (%). To determine the accuracy, the concentration of elements in the certificate materials described earlier was determined. Also spikes were analysed for the same purpose.

*Uncertainty estimation.* A laboratory has to demonstrate the quality of the results produced and their fitness to the purpose, by giving an estimate of the confidence that can be associated with the result. All the possible sources of uncertainty have to be carefully identified and taken into account. While measuring the concentrations by ICP-MS with external standard, fluctuations in the measurement of ionic currents occurring as a result of the electrical noise in the detector, instabilities in plasma discharge, instabilities of the electrical parameters of the analyser, lead to uncertainties in the determination of the parameters of the calibration line. Possible errors in the preparation of the calibration solutions increase these uncertainties [1].

### 3. Results and discussion

All microwave-assisted digestions were performed using CEM model MARS 5 (CEM Corporation, Matthews, NC, USA). The Microwave Accelerated Reaction System (MARS) is designed for laboratory use of digesting, dissolving, hydrolysing, extracting or drying a wide range of materials. Its primary purpose is the rapid preparation of samples for analysis with atomic and mass spectroscopy. This system was designed to hold 12 polytetrafluoroethylene (PTFE) digestion vessels. The digestion vessels had rupture membranes for safe operation under 200 psi. At full power, the MARS delivers approximately 1600 watts of microwave energy at the frequency of 2450MHz.

The elemental analyses were conducted using an Agilent 7500ce inductively coupled plasma mass spectrometer (ICP/MS) Agilent Technologies, USA). Optimization of the instrument was done as outlined in the Agilent 7500cx user's manual. This type of ICP-MS is fitted with an octopole reaction-collision cell, operated in collision mode that will minimize the isobaric interferences from polyatomic ions such as oxides ( $MO^+$ ) that may occur from either the matrix or the plasma through kinetic energy bias [7]. Additionally, this instrument is extremely sensitive, with a very large dynamic range that can measure analytes from the very low ng/L (ppt) level to the upper mg/L range (1000 mg/L) in one run.

#### 3.1. Method validation

The ICP-MS system was optimized under typical tuning conditions for high and variable sample matrices. Table 3 shows the instrumental conditions used for the analyses, including preferred isotope, the tune mode (normal or helium collision) integration time, calibration range and approximate detection



limit. The linearity of the calibration curve was acceptable for all of the analysed elements ( $R > 0.999$ ).

**Table 3.** Limits of detection (LOD), limits of quantifications (LOQ) and linearity of the calibration curves

Element	Isotope	ORS mode	Integration time (s)	Linear range ( $\mu\text{g/L}$ )	Slope	Intercept	R	LOD ( $\mu\text{g/L}$ )	LOQ ( $\mu\text{g/L}$ )
Li	7	Normal	0.1	0.5-50	0.045	0.023	0.9997	0.042	0.140
Be	9	Normal	0.1	0.5-50	0.010	0.166	0.9960	0.012	0.040
B	11	Normal	0.1	10-1000	0.295	-7.648	0.9989	0.98	3.273
Na	23	Normal	0.1	1000-10000	2.125	391.2	0.9992	8.12	27.12
Mg	24	Normal	0.1	1000-10000	1240	13785	0.9995	5.77	19.27
Al	27	Normal	0.1	10-1000	0.882	19.36	0.9990	1.22	4.075
P	31	Helium	0.5	1000-10000	13455	12963	0.9991	5.96	19.91
K	39	Normal	0.1	1000-10000	35964	40552	0.9995	10.2	34.07
Ca	42	Normal	0.1	1000-10000	1796	3995	0.9991	2.34	7.816
Ti	48	Helium	0.5	1-100	1.36	5.998	0.9996	0.12	0.401
V	51	Normal	0.1	1-50	0.022	0.799	0.9999	0.096	0.321
Cr	53	Helium	0.5	0.5-50	0.024	-0.051	0.9991	0.0063	0.021
Mn	55	Normal	0.1	1-100	1.754	-9.321	0.9993	0.074	0.247
Fe	56	Helium	0.5	1-100	0.55	1.90	1.0000	0.017	0.057
Fe	57	Helium	0.5	1-100	1.25	15.6	1.0000	0.214	0.715
Co	59	Normal	0.1	0.5-50	1.528	-0.724	0.9996	0.0031	0.010
Ni	60	Normal	0.1	0.5-50	0.042	1.33	0.9993	0.0044	0.015
Cu	63	Helium	0.5	1-100	0.66	10.24	0.9991	0.199	0.665
Zn	64	Helium	0.5	1-100	0.322	7.82	0.9995	0.0017	0.006
Ga	69	Normal	0.1	0.5-10	0.037	-0.0059	0.9994	0.013	0.043
Ge	72	Normal	0.1	0.5-10	0.0014	0.0055	0.9990	0.0046	0.015
As	75	Helium	0.5	0.5-50	0.010	0.0022	0.9993	0.0011	0.004
Se	77	Helium	0.5	0.5-50	0.0069	-0.0037	0.9997	0.0019	0.006
Rb	85	Normal	0.1	1-100	1.150	2.483	1.0000	0.10	0.334
Sr	88	Normal	0.1	10-1000	1.680	10.27	0.9995	0.77	2.572
Mo	95	Normal	0.1	0.5-10	0.0079	0.0022	0.9991	0.0033	0.011
Ag	107	Normal	0.1	0.5-50	0.0037	-0.0059	0.9995	0.012	0.040
Cd	111	Normal	0.1	0.5-50	0.021	0.0025	1.0000	0.0044	0.015
Sn	118	Normal	0.1	0.5-10	0.0011	0.00069	0.9994	0.0012	0.004
Sb	121	Helium	0.5	0.5-10	0.038	10.47	0.9998	0.054	0.180
Cs	133	Normal	0.1	0.5-50	0.144	18.59	0.9991	0.13	0.434
Ba	137	Normal	0.1	1-100	0.058	-0.0063	0.9994	0.29	0.969
Hg	202	Helium	0.5	0.5-10	0.617	-0.55	0.9991	0.077	0.257
Tl	205	Normal	0.1	0.5-50	2.019	-5.94	1.0000	0.062	0.207
Pb	206	Normal	0.1	0.5-50	0.023	0.0647	0.9991	0.019	0.063
Pb	207	Normal	0.1	0.5-50	0.019	0.0565	0.9991	0.022	0.073
Pb	208	Normal	0.1	0.5-50	0.048	0.1333	0.9995	0.014	0.047
Bi	209	Helium	0.5	1-100	0.0092	-0.1046	0.9992	0.54	1.804

The precision explains the closeness of agreement between independent test results obtained under prescribed conditions. Precision depends only on the distribution of the random errors and has no relation with the true or specified value. The value of precision (explained through Variation of 10 replica) means that in 95% of the cases, the difference between two values obtained by the method, under the conditions defined, will be lower than or equal to Var-value. For none of the elements the RSD was above 10%. Repeatability was



determined with the standard deviation, ranged between 0.029  $\mu\text{g/L}$  for Be and 0.764  $\mu\text{g/L}$  for Sr and between 0.050  $\text{mg/L}$  for Mg and 0.419  $\text{mg/L}$  for Ca (Table 4).

**Table 4.** Precision and repeatability of the measurements (1ppb, 10 ppb and 1 ppm standard solution), N=10

Unit	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	X	Var	SD	RSD (%)
<b>Li</b> $\mu\text{g/L}$	1.01	1.11	1.15	1.06	1.01	1.02	1.05	1.10	1.164	1.23	1.09	0.005	0.073	6.65
<b>Be</b> $\mu\text{g/L}$	0.98	1.00	0.95	0.97	0.99	1.002	1.01	0.95	0.99	1.05	0.99	0.001	0.029	2.93
<b>B</b> $\mu\text{g/L}$	10.1	10.2	10.1	10.5	10.4	10.5	10.1	10.5	10.2	10.5	10.3	0.038	0.196	1.89
<b>Na</b> $\text{mg/L}$	1.24	1.23	1.07	1.45	1.22	1.09	1.04	1.23	1.14	1.23	1.19	0.014	0.118	9.87
<b>Mg</b> $\text{mg/L}$	1.05	1.12	0.98	0.99	0.99	1.02	1.01	1.10	0.98	0.99	1.03	0.002	0.050	4.84
<b>Al</b> $\text{mg/L}$	1.2	1.05	0.99	0.98	1.06	1.10	1.07	0.99	1.02	1.10	1.06	0.004	0.066	6.21
<b>P</b> $\text{mg/L}$	1.22	0.98	1.11	1.25	1.08	1.15	1.07	1.05	1.11	0.99	1.10	0.007	0.085	7.74
<b>K</b> $\text{mg/L}$	10.1	10.2	10.2	9.84	9.97	9.85	9.85	10.24	10.1	10.5	10.1	0.051	0.226	2.24
<b>Ca</b> $\text{mg/L}$	9.57	10.2	10.4	9.88	9.65	10.2	10.6	10.7	9.85	9.87	10.12	0.17	0.419	4.14
<b>Ti</b> $\mu\text{g/L}$	10.5	10.2	10.4	10.5	10.9	9.89	10.3	10.4	10.2	10.4	10.4	0.08	0.283	2.72
<b>V</b> $\mu\text{g/L}$	10.1	9.79	9.58	10.2	10.4	9.74	9.85	9.52	10.2	10.1	9.97	0.09	0.311	3.12
<b>Cr</b> $\mu\text{g/L}$	10.5	10.7	10.9	10.3	9.75	10.3	9.55	9.68	10.2	9.88	10.19	0.22	0.476	4.67
<b>Mn</b> $\mu\text{g/L}$	9.63	9.55	10.5	10.6	11.3	9.85	11.2	10.7	10.9	9.68	10.4	0.45	0.674	6.47
<sup>56</sup> Fe $\mu\text{g/L}$	10.2	11.2	11.2	10.5	10.9	10.2	10.7	11.4	10.6	9.95	10.7	0.24	0.491	4.58
<sup>57</sup> Fe $\mu\text{g/L}$	9.87	10.1	10.2	10.4	10.7	11.1	10.8	10.4	10.2	10.4	10.4	0.14	0.376	3.59
<b>Co</b> $\mu\text{g/L}$	1.14	0.98	1.14	1.17	1.26	1.08	1.11	1.02	1.06	1.04	1.10	0.007	0.082	7.44
<b>Ni</b> $\mu\text{g/L}$	9.87	10.3	10.4	11.4	10.2	10.7	10.2	10.2	11.2	10.4	10.5	0.23	0.480	4.56
<b>Cu</b> $\mu\text{g/L}$	10.1	10.5	11.2	9.86	9.74	9.56	9.58	10.2	10.4	11.2	10.2	0.37	0.610	5.95
<b>Zn</b> $\mu\text{g/L}$	10.4	11.4	10.5	10.8	9.87	9.85	10.2	10.1	11.2	11.2	10.5	0.33	0.582	5.50
<b>Ga</b> $\mu\text{g/L}$	1.11	1.03	1.25	1.09	1.12	1.26	1.01	1.25	1.14	0.99	1.13	0.01	0.100	8.90
<b>Ge</b> $\mu\text{g/L}$	0.98	0.95	0.97	1.01	1.08	1.05	1.11	1.12	1.15	0.97	1.04	0.005	0.070	6.71
<b>As</b> $\mu\text{g/L}$	1.25	0.97	0.95	1.08	1.07	0.96	0.97	0.97	1.11	1.2	1.06	0.011	0.106	10.0
<b>Se</b> $\mu\text{g/L}$	10.4	11.2	10.5	9.58	9.67	9.84	10.54	10.8	10.7	11.1	10.4	0.34	0.589	5.63
<b>Rb</b> $\mu\text{g/L}$	11.2	10.5	10.2	10.8	10.4	11.2	11.4	11.4	11.2	10.5	10.9	0.19	0.443	4.05
<b>Sr</b> $\mu\text{g/L}$	10.7	11.2	9.87	9.65	10.2	10.1	10.4	11.8	11.7	10.5	10.6	0.58	0.764	7.17
<b>Mo</b> $\mu\text{g/L}$	1.45	1.27	1.15	1.1	1.11	1.31	1.16	1.35	1.22	1.25	1.24	0.01	0.112	9.07
<b>Ag</b> $\mu\text{g/L}$	0.97	1.05	0.95	0.89	0.94	1.11	1.07	1.06	0.97	0.96	1.00	0.005	0.070	7.06
<b>Cd</b> $\mu\text{g/L}$	1.22	1.07	1.05	1.07	1.12	1.19	1.15	1.04	1.09	1.12	1.11	0.004	0.060	5.39
<b>Sn</b> $\mu\text{g/L}$	0.95	0.94	0.98	1.04	1.10	1.11	1.05	0.87	0.85	0.9	0.98	0.009	0.093	9.49
<b>Sb</b> $\mu\text{g/L}$	1.16	1.23	0.97	1.04	0.96	0.95	1.14	1.2	0.97	0.98	1.06	0.012	0.110	10.3
<b>Cs</b> $\mu\text{g/L}$	10.1	10.4	9.58	9.36	10.4	11.2	10.7	10.5	10.9	9.88	10.3	0.34	0.589	5.70
<b>Ba</b> $\mu\text{g/L}$	9.45	10.5	10.3	10.74	10.2	9.58	9.75	9.61	9.58	10.4	10.0	0.23	0.479	4.78
<b>Hg</b> $\mu\text{g/L}$	1.33	1.25	1.47	1.37	1.24	1.6	1.55	1.24	1.26	1.33	1.36	0.018	0.133	9.73
<b>Tl</b> $\mu\text{g/L}$	10.2	10.4	10.3	9.67	9.54	9.36	11.2	10.7	9.84	9.55	10.0	0.36	0.603	5.98
<sup>206</sup> Pb $\mu\text{g/L}$	1.55	1.24	1.32	1.24	1.27	1.44	1.25	1.36	1.1	1.2	1.30	0.016	0.128	9.84
<sup>207</sup> Pb $\mu\text{g/L}$	1.36	1.23	1.25	1.44	1.13	1.1	1.14	1.25	1.13	1.44	1.25	0.016	0.128	10.2
<sup>208</sup> Pb $\mu\text{g/L}$	1.22	1.24	1.25	1.36	1.17	1.28	1.26	1.1	1.23	1.33	1.24	0.005	0.07	5.96
<b>Bi</b> $\mu\text{g/L}$	10.2	10.4	10.3	11.6	10.3	11.2	10.2	10.5	10.3	10.4	10.5	0.23	0.48	4.53

N-number of samples measurements, with 3 repetition for each measurement; X - mean value; Var – Variation; SD – standard deviation; RSD - relative standard deviation.



Reproducibility of the applied method was proved with measurements of the three levels of standard solution with known concentration of elements, independently from two analysts. Not significant differences were assumed between the measurements from both analysts.

**Table 5.** Reproducibility of the measurements (1 ppb, 10 ppb and 1ppm standard solution), significant differences at  $p < 0.05$ ,  $N=10$

Element	Unit	$X_1$	$RSD$ (%)	$X_2$	$RSD$ (%)	$p$	$T$
Li	μg/L	1.07	3.15	1.11	0.58	0.44	-0.85
Be	μg/L	0.98	2.12	1.01	1.22	0.09	-2.19
B	μg/L	10.3	1.05	10.4	1.5	0.47	-0.80
Na	mg/L	1.24	1.14	1.15	2.15	0.31	1.17
Mg	mg/L	1.03	0.44	1.02	3.22	0.88	0.16
Al	mg/L	1.06	5.33	1.06	0.69	0.95	-0.07
P	mg/L	1.13	4.21	1.08	0.78	0.20	1.52
K	mg/L	10.1	1.25	10.1	4.3	0.88	-0.16
Ca	mg/L	10.1	3.45	10.3	3.9	0.06	-2.61
Ti	μg/L	10.6	2.35	10.3	1.7	0.08	2.32
V	μg/L	10.0	1.47	9.89	1.55	0.19	1.59
Cr	μg/L	10.5	1.25	9.92	2.36	0.15	1.75
Mn	μg/L	10.3	2.22	10.5	2.0	0.74	-0.35
<sup>56</sup> Fe	μg/L	10.8	7.14	10.6	1.1	0.30	1.18
<sup>57</sup> Fe	μg/L	10.3	1.36	10.6	3.5	0.31	-1.15
Co	μg/L	1.14	5.26	1.06	5.10	0.26	1.32
Ni	μg/L	10.5	3.36	10.6	2.5	0.67	-0.46
Cu	μg/L	10.3	2.25	10.2	6.1	0.86	0.18
Zn	μg/L	10.6	5.69	10.5	2.2	0.88	0.16
Ga	μg/L	1.12	3.61	1.13	4.25	0.82	-0.24
Ge	μg/L	1.00	2.44	1.08	2.11	0.17	-1.68
As	μg/L	1.07	5.77	1.05	1.09	0.77	0.31
Se	μg/L	10.31	5.14	10.6	1.2	0.53	-0.68
Rb	μg/L	10.7	3.26	11.2	1.6	0.10	-2.17
Sr	μg/L	10.3	2.49	11.0	0.8	0.39	-0.96
Mo	μg/L	1.22	1.05	1.26	1.25	0.58	-0.60
Ag	μg/L	0.99	0.84	1.03	0.89	0.25	-1.34
Cd	μg/L	1.11	0.95	1.12	2.65	0.56	-0.64
Sn	μg/L	1.00	1.25	0.96	1.23	0.58	0.61
Sb	μg/L	1.07	4.36	1.05	4.11	0.76	0.32
Cs	μg/L	9.99	1.25	10.7	0.9	0.14	-1.82
Ba	μg/L	10.3	2.77	9.79	1.23	0.15	1.76
Hg	μg/L	1.33	3.04	1.40	4.33	0.57	-0.62
Tl	μg/L	10.0	2.98	10.1	1.6	0.73	-0.37
<sup>206</sup> Pb	μg/L	1.32	1.25	1.27	2.35	0.19	1.57
<sup>207</sup> Pb	μg/L	1.28	3.64	1.21	6.23	0.56	0.63
<sup>208</sup> Pb	μg/L	1.25	3.77	1.24	3.05	0.90	0.14
Bi	μg/L	10.6	1.08	10.6	0.7	0.97	0.04

$N$ -number of samples measurements, with 3 repetition for each measurement;  $X_1$ -mean value from the first analyst;  $X_2$ -mean value from the second analyst;  $RSD$  – relative standard deviation;  $p$  - probability value (significant differences at  $p < 0.05$ );  $T$ - value (T-test for dependent samples).

To confirm the accuracy of the method, two certified reference samples were analyzed repeatedly (BCR-060: Aquatic plant (*Lagarosiphon major*) and CRM-TMSO (soybean oil). Each sample was measured multiple times over the sequence and the mean concentration, percent relative standard deviation (%  $RSD$ ), and mean recovery were calculated for each analyte (Table 6).



**Table 6.** Determined accuracy using certified reference materials, N=10

Element	BCR-060 <sup>a</sup> (mg/kg)	BCR-060 <sup>b</sup> (mg/kg)	RSD (%)	R (%)	CRM-TMSO <sup>a</sup> (mg/kg)	CRM-TMSO <sup>b</sup> (mg/kg)	RSD (%)	R (%)
<b>B</b>	25	24.3	1.2	97	/	/	/	/
<b>Na*</b>	9	9.81	1.7	109	/	/	/	/
<b>Mg*</b>	10	11.3	0.7	113	100	92.3	1.5	92
<b>Al</b>	4180	4057	2.6	97	/	/	/	/
<b>P*</b>	11.8	10.6	2.2	90	100	88.9	2.8	89
<b>K*</b>	13.7	14.2	0.6	104	/	/	/	/
<b>Ca*</b>	43.3	45.1	1.5	104	100	94.5	1.4	95
<b>V</b>	6	5.32	0.8	88	/	/	/	/
<b>Cr</b>	26	27.3	1.3	105	/	/	/	/
<b>Mn</b>	1760	1675	1.5	95	/	/	/	/
<sup>56/57</sup> <b>Fe</b>	/	/	/	/	100	107.8	2.3	108
<b>Co</b>	4	3.70	1.3	93	/	/	/	/
<b>Ni</b>	40	38.6	1.1	97	100	109.3	1.4	109
<b>Cu</b>	51.2	52.4	2.7	102	100	89.6	0.9	90
<b>Zn</b>	313	317.8	1.5	102	100	92.3	1.1	92
<b>As</b>	8	9.34	1.9	116	/	/	/	/
<b>Se</b>	0.7	0.59	0.7	84	/	/	/	/
<b>Rb</b>	23	22.7	2.6	99	/	/	/	/
<b>Mo</b>	2	2.31	2.1	115	/	/	/	/
<b>Ag</b>	0.2	0.22	1.8	110	100	90.7	2.7	91
<b>Cd</b>	2.2	2.27	0.6	103	/	/	/	/
<b>Sn</b>	6	5.60	1.3	93	/	/	/	/
<b>Sb</b>	0.4	0.34	1.9	85	/	/	/	/
<b>Cs</b>	0.4	0.42	1.2	105	/	/	/	/
<b>Hg</b>	0.34	0.31	2.5	91	/	/	/	/
<b>Tl</b>	0.24	0.25	0.7	104	/	/	/	/
<sup>206/207/208</sup> <b>Pb</b>	64	66.1	1.3	103	100	101.2	4.1	101

N-number of samples measurements, with 3 repetition for each measurement; **a** – certified value; **b** – measured value with the applied method; **R** – mean recovery; **RSD** – relative standard deviation; \* - data are given for mass fraction of elements oxides: CaO, MgO, Na<sub>2</sub>O, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, K<sub>2</sub>O in g/kg.

Along with the above CRMs, Matrix Spike (MS) CRMs and Matrix Spike Duplicates (MSD) CRMs spiked at the calibration midpoint (10 ppb for trace elements, 1 ppm and 10 ppm for mineral elements (Na, Mg, K, P, Ca, Al and Fe), and 1 ppb for Hg) were analyzed periodically, interspersed with the other samples throughout the sequence. No matrix matching of the calibration standards and blanks to these samples was required, as the octopole collision cell effectively eliminates matrix suppression by ensuring very high temperature robust plasma conditions (around 0.2% CeO/Ce ratio in He mode). All elements met the limits of 80% to 120% recovery for matrix spikes with satisfactory accuracy.

Optimized and validated method was applied on analysis of various matrixes: edible oil (sunflower cold-pressed oil), vegetables (tomato), fruits (apple) and alcoholic beverages (brandy). Results are presented in Tables 7, 8, 9 and 10, respectively.



**Table 7.** Spike recoveries and matrix spike (MS)/matrix spike duplicate (MSD) for oil samples (sunflower cold- pressed oil), N=25

Element	Unit	Matrix mean	RSD (%)	Matrix spike (MS) mean	RSD (%)	Spike	R (%)
Li	μg/kg	<LOD	2.19	10.2	1.02	10	102
Be	μg/kg	<LOD	1.23	9.89	3.25	10	98.9
B	μg/kg	0.89	1.15	12.6	1.14	10	117
Na	mg/kg	1.025	0.88	2.01	0.75	1	99.0
Mg	mg/kg	2.85	1.28	3.79	1.25	1	94.2
Al	mg/kg	0.78	1.00	1.82	3.12	1	104
P	mg/kg	4.52	1.36	5.45	2.25	1	93.1
K	mg/kg	1.32	0.75	2.41	2.01	1	108
Ca	mg/kg	0.58	2.45	1.70	1.55	1	112
Ti	mg/kg	0.23	3.18	1.35	1.26	1	112
V	μg/kg	4.9	0.66	15.6	1.12	10	107
Cr	μg/kg	73.2	0.95	82.3	1.1	10	91.5
Mn	μg/kg	62.3	1.12	73.5	1.07	10	112
Fe	mg/kg	0.87	1.55	2.01	0.88	1	114
Co	μg/kg	2.3	1.36	13.5	0.75	10	112
Ni	μg/kg	78	1.75	88.7	0.45	10	107
Cu	μg/kg	140	1.78	149	0.9	10	95.1
Zn	μg/kg	35.4	1.05	44.2	1.02	10	88.5
Ga	μg/kg	15.2	0.88	25.3	1.07	10	101
Ge	μg/kg	9.25	2.16	20.1	1.44	10	108
As	μg/kg	<LOD	4.36	9.21	1.52	10	92.1
Se	μg/kg	<LOD	1.25	8.87	1.58	10	88.7
Rb	μg/kg	8.75	2.15	20.1	2.54	10	113
Sr	μg/kg	124	3.78	133	1.33	10	93.6
Mo	μg/kg	7.42	2.41	18.5	1.44	10	110
Ag	μg/kg	<LOD	0.55	8.75	1.65	10	87.5
Cd	μg/kg	<LOD	1.06	10.4	2.28	10	104
Sn	μg/kg	27.3	1.15	36.6	1.33	10	93.3
Sb	μg/kg	<LOD	1.89	9.15	2.14	10	91.5
Cs	μg/kg	35.7	1.24	45.5	2.25	10	98.3
Ba	μg/kg	88.1	0.55	96.8	1.47	10	87.5
Hg	μg/kg	<LOD	0.7	0.88	2.22	1	87.7
Tl	μg/kg	49.3	1.66	60.1	2.32	10	108
Pb	μg/kg	<LOD	1.78	8.69	2.25	10	86.9
Bi	μg/kg	<LOD	0.99	9.11	1.06	10	91.1

N-number of samples measurements, with 3 repetition for each measurement; R – mean recovery; RSD – relative standard deviation.

**Table 8.** Spike recoveries and matrix spike (MS)/matrix spike duplicate (MSD) for fruit sample (apple fruit), N=30

Element	Unit	Matrix mean	RSD (%)	Matrix spike (MS) mean	RSD (%)	Spike	R (%)
Li	μg/kg	<LOD	0.45	9.15	1.56	10	91.5
Be	μg/kg	<LOD	1.22	11.1	1.36	10	111
B	μg/kg	85.2	1.47	96.4	2.14	10	112
Na	mg/kg	5.78	1.69	15.2	1.08	10	94.5
Mg	mg/kg	35.9	2.77	44.7	1.16	10	88
Al	mg/kg	0.15	2.81	9.18	1.47	10	90.3
P	mg/kg	61.2	0.66	70.5	2.45	10	93.5
K	mg/kg	25.3	0.89	33.4	2.19	10	81
Ca	mg/kg	15.2	0.92	23.4	3.05	10	82
Ti	mg/kg	0.22	1.35	11.5	4.12	10	112
V	μg/kg	2.66	1.99	13.8	2.1	10	111
Cr	μg/kg	1.63	1.41	10.9	1.55	10	92.7
Mn	μg/kg	85	0.95	96.8	1.17	10	118
Fe	mg/kg	0.33	0.74	8.57	1.96	10	82.4
Co	μg/kg	8.9	0.66	19.6	2.05	10	107



Ni	µg/kg	1.35	1.25	10.8	3.47	10	95.2
Cu	µg/kg	105	0.91	114	1.01	10	92
Zn	µg/kg	5.1	0.55	15.5	1.55	10	104
Ga	µg/kg	1.15	3.45	9.87	1.06	10	87.2
Ge	µg/kg	2.45	2.18	11.2	0.89	10	87.5
As	µg/kg	<LOD	5.17	10.23	1.33	10	102
Se	µg/kg	<LOD	2.36	9.55	0.78	10	95.5
Rb	µg/kg	121	0.55	132	0.98	10	112
Sr	µg/kg	243	0.44	251	1.25	10	81
Mo	µg/kg	6.59	1.9	15.6	1.29	10	90.1
Ag	µg/kg	<LOD	3.22	8.62	1.99	10	86.2
Cd	µg/kg	<LOD	4.19	9.11	2.67	10	91.1
Sn	µg/kg	<LOD	2.45	10.3	5.14	10	103
Sb	µg/kg	<LOD	1.36	11.2	2.15	10	112
Cs	µg/kg	10.5	0.88	20.3	3.12	10	98
Ba	µg/kg	244	0.95	255	1.88	10	113
Hg	µg/kg	<LOD	1.56	0.92	1.65	1	92.3
Tl	µg/kg	<LOD	2.25	8.77	0.87	10	87.7
Pb	µg/kg	<LOD	3.17	9.15	0.55	10	91.5
Bi	µg/kg	1.2	1.02	10.6	1.33	10	94

N-number of samples measurements, with 3 repetition for each measurement; R – mean recovery; RSD – relative standard deviation.

**Table 9.** Spike recoveries and matrix spike (MS)/matrix spike duplicate (MSD) for vegetable sample (tomato) N=22

Element	Unit	Matrix	RSD (%)	Matrix spike (MS)	RSD (%)	Spike	R(%)
		mean		mean			
Li	µg/kg	0.8	2.55	10.7	3.21	10	99
Be	µg/kg	<LOD	1.62	9.85	1.55	10	98.5
B	µg/kg	46.3	1.08	55.2	1.56	10	89
Na	mg/kg	79.5	1.44	87.9	1.12	10	84
Mg	mg/kg	450	0.78	461	0.95	10	112
Al	mg/kg	150	0.96	158.9	1.7	10	89
P	mg/kg	648	3.45	656	2.26	10	85
K	mg/kg	552	3.66	562	1.44	10	103
Ca	mg/kg	89.3	2.78	97.4	1.23	10	81
Ti	µg/kg	10.2	2.22	19.6	0.47	10	93.8
V	µg/kg	<LOD	1.05	11.5	0.99	10	115
Cr	µg/kg	0.8	1.19	9.8	4.2	10	90.2
Mn	µg/kg	89.6	0.55	98.66	1.61	10	90.6
Fe	mg/kg	0.582	1.49	9.66	2.14	10	90.7
Co	µg/kg	1.12	3.26	12.3	1.06	10	112
Ni	µg/kg	<LOD	4.25	8.78	4.11	10	87.8
Cu	µg/kg	13.5	2.09	24.5	2.55	10	110
Zn	µg/kg	124	1.34	133.1	3.08	10	91.3
Ga	µg/kg	<LOD	1.1	9.12	3.11	10	91.2
Ge	µg/kg	<LOD	0.85	10.5	1.02	10	105
As	µg/kg	<LOD	2.64	8.66	1.11	10	86.6
Se	µg/kg	0.2	1.25	10.7	1.47	10	105
Rb	µg/kg	122	1.46	134	0.88	10	120
Sr	µg/kg	184	1.92	195.2	0.65	10	112
Mo	µg/kg	19.0	0.86	27.8	0.78	10	88.1
Ag	µg/kg	<LOD	4.55	9.05	1.02	10	90.5
Cd	µg/kg	0.04	2.73	10.2	1.55	10	101
Sn	µg/kg	<LOD	1.26	8.65	1.36	10	86.5
Sb	µg/kg	<LOD	0.85	9.34	1.11	10	93.4
Cs	µg/kg	1.23	0.69	12.3	1.28	10	110
Ba	µg/kg	62.3	1.1	73.5	0.96	10	115
Hg	µg/kg	<LOD	1.45	0.853	1.25	1	85.3
Tl	µg/kg	<LOD	136	11.2	2.36	10	112
Pb	µg/kg	0.056	0.77	9.63	3.55	10	95.7
Bi	µg/kg	0.87	3.44	12.5	1.28	10	116.3

N-number of samples measurements, with 3 repetition for each measurement; R – mean recovery; RSD – relative standard deviation.



**Table 10.** Spike recoveries and matrix spike (MS)/matrix spike duplicate (MSD) for grape brandy, N=10

Element	Unit	Matrix mean	RSD (%)	Matrix spike (MS) mean	RSD (%)	Spike	R (%)
Li	µg/L	0.16	2.33	10.2	1.69	10	100
Be	µg/L	<LOD	3.15	8.67	2.03	10	86.7
B	µg/L	36.3	1.29	45.5	2.66	10	92
Na	mg/L	6.08	0.78	7.24	0.59	1	116
Mg	mg/L	1.15	0.56	2.33	1.23	1	118
Al	mg/L	0.21	2.13	1.15	1.04	1	94
P	mg/L	9.63	1.00	10.48	2.13	1	85
K	mg/L	22.7	1.25	23.57	2.22	1	87
Ca	mg/L	5.66	1.63	6.58	0.78	1	92
Ti	µg/L	55.4	1.04	63.7	0.59	10	83
V	µg/L	0.33	2.44	10.17	0.63	10	98.4
Cr	µg/L	1.25	3.58	10.5	1.54	10	92.5
Mn	µg/L	56.4	3.66	64.8	1.96	10	84
Fe	mg/L	0.34	2.14	9.48	1.58	10	91.4
Co	µg/L	0.28	0.77	8.75	1.30	10	84.7
Ni	µg/L	5.17	1.99	16.3	0.55	10	111
Cu	mg/L	1.28	2.68	10.65	1.47	10	93.7
Zn	µg/L	10.2	3.45	19.34	3.55	10	91.1
Ga	µg/L	0.24	4.11	9.25	4.23	10	90.1
Ge	µg/L	<LOD	2.96	8.75	1.28	10	87.5
As	µg/L	0.078	1.08	9.12	1.46	10	90.4
Se	µg/L	<LOD	2.33	11.08	0.96	10	111
Rb	µg/L	4.87	1.14	15.2	0.88	10	103
Sr	µg/L	25.6	1.57	33.87	1.35	10	82.4
Mo	µg/L	1.44	0.86	10.27	2.45	10	88.3
Ag	µg/L	0.16	0.77	9.66	1.32	10	95
Cd	µg/L	0.057	1.65	9.04	1.14	10	89.8
Sn	µg/L	<LOD	3.58	10.24	3.55	10	102
Sb	µg/L	<LOD	2.65	9.25	2.60	10	92.5
Cs	µg/L	1.72	3.46	11.24	1.29	10	95.2
Ba	µg/L	105	2.55	117	1.11	10	120
Hg	µg/L	<LOD	1.02	1.17	0.58	1	117
Tl	µg/L	0.14	1.11	9.17	1.44	10	90.3
Pb	µg/L	1.12	1.37	12.3	2.55	10	112
Bi	µg/L	1.95	2.65	10.32	1.24	10	83.7

N-number of samples measurements, with 3 repetition for each measurement; R – mean recovery; RSD – relative standard deviation.

#### 4. Concluding remarks

Multi-element determination method for sample preparation followed with ICP-MS for analysis of edible oils, vegetables, fruits and alcoholic beverages was optimized and developed. The method presented satisfactory linearly, LOD, LOQ, accuracy, repeatability, and reproducibility for total 35 elements (Ag, Al, As, B, Ba, Be, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cs, Cu, Fe, Ga, Ge, Hg, K, Li, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, P, Pb, Rb, Sb, Se, Sn, Sr, Ti, V and Zn).

#### 5. References

- [1] Thompson, M., Ellison, S. L., & Wood, R. (2002). Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 74(5), 835-855.
- [2] OIV-MA-AS1-12: R2005. Compendium of international analysis of methods - OIV Guide for the validation – quality control.





- [3] Millour, S., Noël, L., Kadar, A., Chekri, R., Vastel, C., & Guérin, T. (2011). Simultaneous analysis of 21 elements in foodstuffs by ICP-MS after closed-vessel microwave digestion: Method validation. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(1), 111-120.
- [4] Heumann, K. G. (2004). Isotope-dilution ICP-MS for trace element determination and speciation: from a reference method to a routine method?. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 378(2), 318-329.
- [5] МКС EN ISO 17294-1 (2009) Water quality - Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) - Part 1: General guidelines (ISO 17294-1:2004).
- [6] Dolan, S. P., & Capar, S. G. (2002). Multi-element analysis of food by microwave digestion and inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry. *Journal of Food Composition and Analysis*, 15(5), 593-615.
- [7] Barling, J., Weis, D. (2012). An isotopic perspective on mass bias and matrix effects in multi-collector inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 27(4), 653-662.



Оригинален научен труд

УДК 635.649-278.6(497.742)

**ВЛИЈАНИЕ НА ТЕМПЕРАТУРАТА ВРЗ ИНТЕНЗИТЕТОТ НА ПОЈАВА НА ПАМУКОВАТА СОВИЦА (*HELIOTHIS OBSOLETA* FABR. = *HELICOVERPA ARMIGERA* НВ.) КАКО ШТЕТНИК НА ПИПЕРКАТА ВО СТРУМИЧКИОТ РЕГИОН**

Душан Спасов, Драгица Спасова, Мите Илиевски, Билјана Атанасова<sup>1</sup>

**Абстракт:** *Helicoverpa armigera* е изразен полифаг. Штетник е на: домат, пипер, тутун, пченка, памук, лук, кромид, зелка, соја, боранија и голем број други легуминозни и тиквени култури и разни плевелни растенија. Штетите од оваа совица имаат економско значање, особено кога видот е во проградација. Распространета е насекаде во светот, особено во потоплите климатски подрачја. Зголемувањето на популацијата на оваа совица се поврзува со глобалното затоплување на климата во светот.

**Клучни зборови:** полифаген штетник, економско значање, памукова совица.

**THE INFLUENCE OF THE TEMPERATURE AT THE INTENSITY OF THE SPREAD OF THE COTTON BOLLWORM (*HELIOTHIS OBSOLETA* FABR. = *HELICOVERPA ARMIGERA* НВ.) AS A PEST OF THE PEPPERS IN THE STRUMICA REGION**

Dusan Spasov, Dragica Spasova, Mite Ilievski, Biljana Atanasova<sup>2</sup>

**Abstract:** *H. armigera* is typical polyphagous insect which attacks: tomatoes, peppers, tobacco, maize, cotton, garlic, onions, cabbage, soy, beans and many other leguminous and pumpkin crops and various weed plants. The damages from the cotton bollworm have economic importance, especially when the species is in progradation. It is widespread all over the world, especially in warmer climates. The increase in the population of this cotton bollworm is associated with global warming.

**Key words:** polyphagous pest, economic importance, cotton bollworm.

<sup>1</sup>Земјоделски факултет, Универзитет „Гоце Делчев“, Штип

<sup>2</sup> Faculty of agriculture, “Goce Delcev” University, Stip



## 1. Вовед

Штетите кои ги предизвикува *H. armigera* се значајни како од економски, така и од агроеколошки аспект. Од економска гледна точка, штетите влијаат на намалување на приносот и квалитетот на плодовите, особено кога гасеницата ќе навлезе во плодовите. Од агроеколошки аспект посебно е значајна употребата на голем број инсектициди за нејзино уништување, при што доаѓа до загадување на плодовите, почвата, водата и воздухот со резидуи од инсектициди. *H. armigera* ги напаѓа сите органи на растението домаќин, стебло, лист, цвет и плод. Најмногу штети прави кога ќе ги нападне репродуктивните органи од растението. Поради нејзината полифагност често била, но и сега е предмет на проучување на голем број научници.

*H. armigera* се среќава под различни народни имиња во зависност од местото и културата на која најмногу е застапена. Па може да се сретне како: памукова совица, тутунова совица, пченкова совица семенарка, доматова совица и др. Кај нас најчесто се среќава како памукова совица, тутунова совица и семенарка.

Samrag et al. (2004), кој досега има објавено околу 600 труда за овој штетник, забележал дека приближно 25% од објавените трудови се однесуваат на биологијата, екологијата и штетноста, околу 25% за хемиската контрола, околу 30% на природните непријатели и биолошка контрола, а околу 20% на останатите методи (отпорни сорти, агротехнички мерки и прогнозни мерки). Со оваа авторот заклучува дека големо внимание се посветува на проучување на интегралните мерки за контрола на штетникот.

Samrag et al. (2004), констатира дека за динамиката на популацијата на памуковата совица, од климатските фактори, доминантно влијание има температурата. Ги анализираше климатските услови за размножување на памуковата совица во Македонија и на југот од Русија за да ја спореди можноста за размножување на памуковата совица во Војводина.

Во Македонија медитеранската клима е многу потисната од континенталната која е присутна секаде. За развој на памуковата совица, во Македонија, се поволни високите температури во периодот јули – септември, додека зимските температури немаат влијание на развојот на овој вид. Просечната годишна воздушна температура за неколку локалитети изнесува: Прилеп 11,3°C, Битола 11,2°C, Штип 12,9°C, Струмица 13,0°C, Скопје 12,3°C и Гевгелија 14,3°C. Во јужниот дел на Македонија бројот на денови во кои максималната температура надминува 25°C изнесува 130.

Во споредба со Војводина, во Македонија се обезбедени поволни температурни услови за размножување на памуковата совица.



## **2. Материјал и метод на работа**

Истражувањата за реализирање на поставените цели се вршени три години (2012, 2013, 2014 година).

При одгледување на пиперката се применети вообичаените агротехнички мерки, вклучувајќи ја употребата на губриња и пестициди.

Истражувањата за утврдување на влијанието на температурата врз интензитетот на памуковата совица се извршени со соодветни методи во полски и лабораториски услови.

### **2.1. Полски истражувања**

Истражувањата се извршени на три полски производни локалитети на пиперка, одгледувана на отворено, во Струмичкиот регион (Просениково, Пиперево и Муртино).

За утврдување на присуство и бројна состојба на положени јајца е применет визуелниот метод на преглед на долната страна на листовите, поблиску до цветот.

Утврдување на бројот на положени јајца и број на испилени ларви се вршеше со преглед на 50 одбрани растенија од секој произведен локалитет. Контролата на одбраните растенија се вршеше од почеток на расадување на пиперката (15.05) до крајот на вегетацијата (15.10), во интервал од 7 дена.

Податоците за температурата за дадениот период беа земени од метеоролошката станица во Струмица.

### **2.2. Лабораториски истражувања**

Лабораториската обработка на материјалот се вршеше континуирано во текот на целата вегетација на пиперката. Во лабораторијата се носеше дел од испилените ларви за да се изврши детерминација на видот. Детерминацијата на видот е извршена на Катедрата за заштита на растенијата и животната средина – Одделение за ентомологија на Земјоделскиот факултет при УГД – Штип.

## **3. Климатски услови**

Во периодот на тригодишните испитувања беа следени метеоролошките показатели за средномесечни температури на воздухот во Целзиусови степени и месечни суми на врнежите во милиметри.

Средната годишна температура во Струмичката Котлина (табела 1), за период од десет години 2001/2011, изнесува 13,4°C.

Според податоците во табела 1 може да се констатира дека средномесечните температури на воздухот се најниски во првите месеци од секоја година, односно во јануари (од -0,3°C во 2012 година, 3,4°C во



2013 година до 4,7°C во 2014 година), а највисоки во јули (27,6 во 2012 година, 23,6°C во 2013 до 24,1°C во 2014 година). Според податоците од табелата, средногодишните температури се движат 13,7°C во 2012 година, 14,1°C во 2013 година и 13,8°C во 2014 година.

**Табела 1.** Средномесечни температури во Целзиусови степени

**Table 1.** Average month temperatures in Celsius degrees

Год. Year	Месеци / Months												Год. сума на темп./ Year sum of temp.	Сред год темп./ Average year temp.
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII		
2012	-0,3	0,8	9,1	13,5	17,7	24,0	27,6	25,1	20,6	15,3	9,6	1,5	5000,5	13,7
2013	3,4	6,1	8,8	15,3	20,1	22,0	23,6	25,8	19,0	13,5	9,8	1,9	5146,5	14,1
2014	4,7	7,5	10,2	12,8	17,4	21,7	24,1	24,0	18,2	13,4	9,5	1,5	5139,5	13,6
2001/2011	2,1	3,9	8,0	13,0	18,5	22,7	25,5	24,9	19,0	13,5	7,3	3,0	4783,5	13,4

#### 4. Резултати и дискусија

Испитувањата беа вршени на три локалитети во Струмичкиот регион и тоа во реоните на селата Просениково, Пиперево и Муртино. Резултатите од испитувањата се дадени во табелите 2, 3 и 4.

**Табела 2.** Просечен број на ларви од памуковата совица по локалитети и месеци во 2012 година

**Table 2.** Average number of cotton bollworm larvae by localities and months in 2012

Локалитет Locality	Просениково Prosenikovo	Пиперево Piperevo	Муртино Murtino	Вкупно Total
Месец Month				
V	3	2	6	11
VI	7	7	10	24
VII	64	60	71	195
VIII	65	63	78	206
IX	13	15	21	49
X	8	5	11	24



**Табела 3.** Просечен број на ларви од памуковата совица по локалитети и месеци во 2013 година  
**Table 3.** Average number of cotton bollworm larvae by localities and months in 2013

Локалитет Locality Месец Month	Просениково Prosenikovo	Пиперево Piperevo	Муртино Murtino	Вкупно Total
V	7	8	15	30
VI	24	28	33	85
VII	88	93	112	293
VIII	94	98	125	317
IX	26	27	36	89
X	11	13	18	42

**Табела 4.** Просечен број на ларви од памуковата совица по локалитети и месеци во 2014 година  
**Table 4.** Average number of cotton bollworm larvae by localities and months in 2014

Локалитет Locality Месец Month	Просениково Prosenikovo	Пиперево Piperevo	Муртино Murtino	Вкупно Total
V	2	1	3	6
VI	18	21	30	69
VII	44	38	49	131
VIII	53	49	65	167
IX	11	13	16	40
X	5	6	8	19

Анализата на податоците дадени по месеци и години, според табелите (табели 2, 3, 4) покажа дека најмала бројност од ларвите на памукова совица, во сите години на испитување, има во мај. Во истиот месец (табела 1) просечната месечна температура се движи 17,7°C во 2012 година, 20,1°C во 2013 година и 17,4°C во 2014 година.

Најголема бројност од ларвите на памуковата совица се забележани во август и во трите години на испитување. Во август просечните месечни температури се движат: 25,1°C во 2012 година, 25,8°C во 2013 година и 24,0°C во 2014 година.



Споредено по години, најголема бројност од ларви на памуковата совица има во 2013 година, 856 единки, во 2012 година има вкупно 509 единки, во 2014 година е забележан најмал број од ларви, 432 единки. Средногодишната температура во овие години се: 13,7°C во 2012 година, 14,1°C во 2013 година и 13,6°C во 2014 година.

## 5. Заклучок

Од извршените испитувањата за утврдување на интезитетот на појава на памуковата совица зависно од температурите може да го заклучиме следното:

- најголема бројност на испилени ларви од памуковата совица, споредено по месеци, има во јули и август, кога имаме и највисоки средномесечни температури;
- најголема бројност на испилени ларви по години има во 2013 година кога и средногодишната температура е најголема;
- најмала бројност има во 2014 година кога средногодишната температура е најмала.

## 6. Литература

- [1] Čamprag D., Sekulić R., Kereši T., Vača F. (2004): Kukuruzna soвица (*Helicoverpa armigera* Hubner) i integralne mere suzbijanja. Poljoprivredni fakultet. Novi Sad
- [2] Постоловски М., Лазаревска Станислава (2014): Земјоделска ентомологија. Факултет за земјоделски науки и храна. Скопје.
- [3] Василев Љ. (1971): Прилог кон познавање циклусот на развиток на тутунската совица семенарка (*Heliothis obsoleta*) во С.Р. Македонија. Магистерски труд. Земјоделски факултет. Скопје
- [4] Василев Љ. (1975): Биологија и екологија на тутунската совица семенарка (*Heliothis armigera*) во Македонија. Докторска дисертација. Земјоделски факултет. Скопје



Оригинален научен труд

УДК 663.2/.5:546,224-31  
663.2/.5:577.114.3

## МЕТОДИ ЗА ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА SO<sub>2</sub> И РЕДУЦИРАЧКИ ШЕЌЕРИ ВО ВИНА И АЛКОХОЛНИ ПИЈАЛАЦИ

Виолета Иванова-Петропулос<sup>1\*</sup>, Драгана Петрушева<sup>1</sup>,  
Саша Митрев<sup>1</sup>

**Апстракт:** Во ова истражување беа оптимизирани и валидирани волуметриските методи за определување на SO<sub>2</sub> (слободен и вкупен) и редуцирачки шеќери во вина и алкохолни пијалаци. Линеарноста, точноста и прецизноста на методите беше потврдена со примена на стандардни раствори од SO<sub>2</sub> и редуцирачки шеќери (фруктоза и гликоза) подготвени во определен концентрациски опсег, како и со ниски, средни и високи концентрации. Дополнително, точноста на методите беше проверена со методата на стандардни додатоци. Повторливоста и репродуцибилноста на методите беа потврдени со повторени анализа на реални примероци од вина и алкохолни пијалаци. Резултатите од анализите потврдија дека двете методи се точни и прецизни и се соодветни за анализа на вина и алкохолни пијалаци.

**Клучни зборови:** SO<sub>2</sub>, редуцирачки шеќери, вино, алкохолни пијалаци, валидација.

## METHODS FOR DETERMINATION OF SO<sub>2</sub> AND REDUCING SUGARS IN WINES AND ALCOHOLIC BEVERAGES

Violeta Ivanova-Petropulos<sup>2\*</sup>, Dragana Petrusheva<sup>2</sup>, Sasa Mitrev<sup>2</sup>

**Abstract:** In this study, volumetric methods for determination of SO<sub>2</sub> (free and total) and reducing sugars in wines and alcoholic beverages were optimized and validated. The linearity, accuracy and precision of the methods were confirmed using standard solutions of SO<sub>2</sub> and reducing sugars (fructose and glucose) prepared in appropriate concentration range, as well as with low, medium and high concentrations. Additionally, the accuracy of the methods was checked by standard additions. Repeatability and reproducibility of the methods was confirmed with repeated analyses of real samples, wines and

<sup>1</sup> Универзитет „Гоце Делчев“, Земјоделски факултет – Штип, Република Македонија

<sup>2</sup> University “Goce Delčev”, Faculty of Agriculture – Štip, Republic of Macedonia





alcoholic beverages. Obtained results for both methods presented satisfactory accuracy and precision, suggesting that these methods are appropriate for analysis of wines and alcoholic beverages.

**Keywords:**  $SO_2$ , reducing sugars, wine, titration

## 1. Introduction

Quality control of wines and alcoholic beverages is very important to be performed during the production as well as on the final product. One of the parameters responsible for the quality of wines is the content of  $SO_2$ . The use of  $SO_2$  in winemaking is due to its ability as an effective antioxidant, preventing oxidation, antimicrobial agent, potential for bleaching the pigments and elimination of unpleasant odours.  $SO_2$  can selectively act against the wild yeasts, which come from the grape skin or equipment in the winery, and stop their activity. Sulfur dioxide can be added in a form of a salt, potassium metabisulphate ( $K_2S_2O_5$ ), which can be ionized in acid media, releasing gaseous  $SO_2$ . Only free  $SO_2$  possesses antiseptic and antioxidant properties. Higher amounts of  $SO_2$  negatively influence the wine quality (flavor and taste) (Ivanova-Petropulos & Mitrev, 2014). The content of  $SO_2$  (free and total) is usually determined by iodine titration, according to the Ripper's method (Vahl & Converse, 1980), using standard solution of iodine in presence of starch as an indicator and sulfuric acid. Before titration, solution of NaOH is used in order to release the bound  $SO_2$ .

The main carbohydrates in grapes and wine are glucose and fructose, usually called "reducing sugars". During the fermentation, reducing sugars are broken down by the action of the yeast, forming an alcohol (ethanol) and carbon dioxide. For determination of reducing sugars in must and wine, chemical methods usually are based on reduction-oxidation (redox) reactions between sugars and Fehling's solution, according to the Shorl's method. Fehling's solution contains copper (II) ions that can be reduced by some sugars to copper (I) ions (Ivanova-Petropulos & Mitrev, 2014).

The aim of this work is validation of volumetric methods for determination of  $SO_2$  (free and total) and reducing sugars in wines and alcoholic beverages, and then, application of the methods on real samples.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Reagents

Standard solution of  $SO_2$  and standards of glucose and fructose were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO). All other reagents used were with analytical grade of purity.



## 2.2. *Wines and alcoholic beverages*

In total, ten different red and white wines from various varieties (vintage 2015) and three alcoholic beverages (yellow brandy, white brandy and mastika) (produced in 2015) were analyzed.

## 2.3. *Determination of SO<sub>2</sub>*

*Free SO<sub>2</sub>*. A volume of 50 mL wine or brandy was transferred to flask of 250 mL, followed by addition of 10 mL 25 % (v/v) solution of sulfuric acid (1+3) and 2-3 mL 1 % solution of stretch as an indicator. Sulfuric acid is added since the oxidation in acid conditions is more intensive. The prepared sample was titrated with a standard solution of iodine with concentration of 0.01 mol/L until the endpoint of titration (change of color to dark-blue for the wine and yellow for the brandy). The following equation was used for calculation of the content of free SO<sub>2</sub> (Ivanova-Petropulos & Mitrev, 2014):

$$\begin{aligned} \text{Free SO}_2/\text{mg/L} &= V(I_2) \cdot c(I_2) \cdot M(\text{SO}_2) \cdot 1000/V(\text{wine}) \\ \text{Free SO}_2/\text{mg/L} &= V(I_2) \cdot 12.8 \end{aligned}$$

*Total SO<sub>2</sub>*. A volume of 25 mL solution of 1 M NaOH was transferred to the flask of 250 mL, followed by addition of 50 mL sample (wine or brandy). The sample was mixed, flask was closed with a rubber stopper and left for 10 min in a dark place. Then, 10 mL of 25 % (v/v) solution of sulfuric acid (1+3) and 2-3 mL 1 % solution of stretch were added. The sample was titrated with a standard solution of iodine (0.01 mol/L) until the endpoint of titration (change of color to dark-blue). The following equation was used for calculation of the content of total SO<sub>2</sub> (Ivanova-Petropulos & Mitrev, 2014):

$$\begin{aligned} \text{Total SO}_2/\text{mg/L} &= V(I_2) \cdot c(I_2) \cdot M(\text{SO}_2) \cdot 1000/V(\text{wine}) \\ \text{Total SO}_2/\text{mg/L} &= V(I_2) \cdot 12.8 \end{aligned}$$

The content of SO<sub>2</sub> (free or total) can be directly read out from Table 1, using the consumed volume of I<sub>2</sub> for titration of the sample.

## 2.4. *Determination of reducing sugars*

For determination of reducing sugars, 1 mL sample (wine or brandy) was transferred to 100 mL flask, followed by addition of distilled water to the mark. Then, 10 mL of the diluted sample was transferred to a flask (250 mL) that contained 10 mL Fehling I and 10 mL Fehling II solutions. The flask with the sample was heated on a moderate temperature until boiling temperature (or until appearance of 1-2 bubbles), followed with a change of color to red-brown



(depending on the sugar content in the sample). After the heating, flask was cooled down (under tap water), and then, 10 mL of 20 % (*m/v*) solution of KI and 10 mL of 25 % (*v/v*) sulfuric acid were added to the flask. The flask was closed with a rubber stopper and left in a dark place to stand for 2-3 min. Then, a volume of 2-3 mL of 1 % (*m/v*) solution of starch was added and the sample was titrated with 0.1 mol/L solution of  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  until change of the color from yellow-brown to milky-white. Previously, a blank sample should be prepared and titrated in a same way as the sample, using distilled water (20 mL). The total consumed volume of  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  was calculated as a difference between the volumes of  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  consumed for titration of the blank and sample:

$$V(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) = V(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3)_{\text{blank}} - V(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3)_{\text{sample}}$$

and used for determination of the sugars content, using the Table 2 (Ivanova-Petropulos & Mitrev, 2014).

**Table 1.** Table for  $\text{SO}_2$  (mg/L) in wine and alcoholic beverage

$V(I_2)/$ mL	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	0.00	1.28	2.26	3.84	5.12	6.40	7.68	8.96	10.24	11.52
1	12.80	14.08	15.36	16.64	17.92	19.20	20.48	21.76	23.04	24.32
2	25.60	26.88	28.16	29.44	30.72	32.00	33.28	34.56	35.84	37.12
3	38.40	39.68	40.96	42.24	43.52	44.80	46.08	47.36	48.64	49.92
4	51.20	52.48	53.76	55.04	56.32	57.60	58.88	60.16	61.44	62.72
5	64.00	65.28	66.56	67.84	69.12	70.40	71.68	72.96	74.24	75.52
6	76.80	78.08	79.36	80.64	81.92	83.20	84.48	85.76	87.04	88.32
7	89.60	90.88	92.16	93.44	94.72	96.00	97.28	98.56	99.84	101.12
8	102.40	103.68	104.96	106.24	107.52	108.80	110.08	111.36	112.64	113.92
9	115.20	116.48	117.76	119.04	120.32	121.60	122.88	124.16	125.44	126.72
10	128.00	129.28	130.56	131.84	133.12	134.40	135.68	136.96	138.24	139.52
11	140.80	142.08	143.36	144.64	145.92	147.20	148.48	149.76	151.04	152.32
12	153.60	154.88	156.16	157.44	158.72	160.00	161.28	162.56	163.84	165.12
13	166.40	167.68	168.96	170.24	171.52	172.80	174.08	175.36	176.64	177.92
14	179.20	180.48	181.76	183.04	184.32	185.60	186.88	188.16	189.44	190.72
15	192.00	193.28	194.56	195.84	197.21	198.40	199.68	200.96	202.24	203.52
16	204.80	206.08	207.36	208.64	209.92	211.20	212.48	213.76	215.04	216.32
17	217.60	218.88	220.16	221.74	222.72	224.00	225.28	226.56	227.84	229.12
18	230.40	231.68	232.96	234.24	235.52	236.80	237.08	238.36	239.64	240.92
19	243.20	244.48	245.76	247.04	248.32	249.60	250.88	252.16	253.44	254.72
20	256.00	257.28	258.56	259.84	261.12	262.40	263.68	264.96	266.24	267.52
21	268.80	270.08	271.36	272.64	273.92	275.20	276.48	277.76	279.04	280.32



**Table 2.** Table for reducing sugars (g/L) in wine and alcoholic beverage

V(Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )/ mL	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	0.0	0.3	0.6	1.0	1.3	1.6	1.9	2.2	2.6	2.9
1	3.2	3.5	3.8	4.2	4.5	4.8	5.1	5.4	5.7	6.1
2	6.4	6.7	7.1	7.4	7.7	8.1	8.4	8.7	9.0	9.4
3	9.7	10.0	10.4	10.7	11.0	11.4	11.7	12.0	12.3	12.7
4	13.0	13.3	13.7	14.0	14.4	14.7	15.0	15.4	15.7	16.1
5	16.4	16.7	17.1	17.4	17.8	18.1	18.4	18.8	19.1	19.5
6	19.8	20.1	20.5	20.8	21.2	21.5	21.8	22.2	22.5	22.9
7	23.2	23.5	23.9	24.2	24.6	24.9	25.2	25.6	25.9	26.3
8	26.5	26.9	27.3	27.6	28.0	28.3	28.6	29.0	29.3	29.7
9	29.9	30.3	30.7	31.0	31.3	31.7	32.0	32.7	32.7	33.0
10	33.4	33.7	34.1	34.4	34.8	35.1	35.4	35.8	36.1	36.5
11	36.8	37.2	37.5	37.9	38.2	38.6	38.9	39.3	39.6	40.0
12	40.3	40.7	41.0	41.4	41.7	42.1	42.2	42.8	43.1	43.5
13	43.8	44.2	44.5	44.9	45.2	45.6	45.9	46.3	46.6	47.0
14	47.3	47.7	48.0	48.4	48.7	49.1	49.4	49.8	50.1	50.5
15	50.8	51.2	51.5	51.9	52.2	52.6	52.9	53.3	53.6	54.0
16	54.3	54.7	55.0	55.4	55.8	56.2	56.5	56.8	57.3	57.6
17	58.0	58.4	58.8	59.1	59.5	59.9	60.3	60.7	61.0	61.4
18	61.8	62.2	62.5	62.9	63.3	63.7	64.0	64.4	64.8	65.1
19	65.5	65.9	66.3	66.7	67.1	67.5	67.8	68.2	68.6	69.1
20	69.4	69.8	70.2	70.6	71.0	71.4	71.7	72.1	72.5	72.9
21	73.3	73.7	74.1	74.5	74.9	75.3	75.6	76.0	76.4	76.8
22	77.2	77.6	78.0	78.4	78.8	79.2	79.6	80.0	80.4	80.8
23	81.2	81.6	82.0	82.4	82.8	83.2	83.6	84.0	84.4	84.8
24	85.2	85.6	86.0	86.4	86.8	87.2	87.6	88.0	88.4	88.8
25	89.2	89.6	90.0	90.4	90.8	91.2	91.6	92.0	92.4	92.8

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Methods validation

Linearity, accuracy, precision, repeatability and reproducibility were checked for SO<sub>2</sub> and reducing sugars in wine and brandy using standard solutions of SO<sub>2</sub> and carbohydrates (glucose and fructose), respectively.

*Linearity.* The linearity data for determination of free SO<sub>2</sub>, total SO<sub>2</sub> and reducing sugars are presented in Table 3. Linearity was satisfactory in all cases with correlation coefficients ( $R^2$ ) of 0.999.

**Table 3.** Intercept, slope and correlation coefficients ( $R^2$ )

Compound	Intercept	Slope	$R^2$	Range
Free SO <sub>2</sub>	0.4305	0.9933	0.9999	0-500 (mg/L)
Total SO <sub>2</sub>	0.3510	0.9957	0.9999	0-500 (mg/L)
Reducing sugars	0.0611	0.9985	0.9998	0-100 (g/L)
Reducing sugars: glucose+fructose				



*Accuracy and precision.* The intra-day and inter-day accuracy and precision were determined with titration of standard solutions of SO<sub>2</sub> and reducing sugars with low (5 mg/L), medium (25 mg/L) and high concentration (50 mg/L), as presented in Table 4. For determination of intra-day accuracy and precision, freshly prepared solutions were used, analyzed immediately, in 10 repetitions during one day. Inter-day accuracy and precision were determined with titration of the standard solutions during 10 consecutive days.

The accuracy was expressed with a relative error of the determined concentration compared with the true (nominal) value. Satisfactory results are considered when relative error is lower than 20 % for low concentrations and lower than 10 % for high concentrations.

Precision was expressed as a relative standard deviation (*RSD*). Satisfactory results are considered when *RSD* is lower than 20 % for low concentrations and lower than 10 % for high concentrations.

The relative errors for inter-day and intra-day accuracy for SO<sub>2</sub> ranged between -0.8 to 6 % and -10.4 to -2.4, while for the reducing sugars were -0.8 to -4 and -2.8 to 1.2, respectively (Table 4). These results confirmed that the suggested are accurate and convenient for quantitative analysis of SO<sub>2</sub> (free and total) and reducing sugars.

**Table 4.** Intra- and Inter- day accuracy and precision data for standard solutions of SO<sub>2</sub> and reducing sugars (n=10)

Sample	SO <sub>2</sub>						Reducing sugars					
	5 mg/L		25 mg/L		50 mg/L		5 mg/L		25 mg/L		50 mg/L	
	Found (%)	<i>e<sub>R</sub></i>	Found (%)	<i>e<sub>R</sub></i>	Found (%)	<i>e<sub>R</sub></i>	Found (%)	<i>e<sub>R</sub></i>	Found (%)	<i>e<sub>R</sub></i>	Found (%)	<i>e<sub>R</sub></i>
<i>Inter- day accuracy and precision</i>												
<x>	4.70	6.0	25.2	-0.8	50.3	-0.6	5.2	-4	25.2	-0.8	51.9	-2.2
SD	0.75		0.74		0.73		0.17		0.35		0.74	
<i>RSD</i> (%)	15.8		2.93		1.46		3.33		1.39		1.44	
<i>Intra- day accuracy and precision</i>												
<x>	5.52	-10.4	26.0	-4.0	51.2	-2.4	5.1	-2	25.7	-2.8	49.4	1.2
SD	0.73		0.74		1.28		0.30		0.72		0.56	
<i>RSD</i> (%)	13.1		2.84		2.5		5.88		2.81		1.11	

Labels: <x> - average value of ten repetitions, SD – standard deviation, *RSD* – relative standard deviation

Additionally, the accuracy of the methods was checked using standard addition method. Samples, including red wine, white wine and brandy,



previously analyzed, were spiked with appropriate volumes of the standard solutions of SO<sub>2</sub> and reducing sugars (glucose and fructose) with concentration of 5, 10 and 50 mg/L for each standard. Obtained results for the recovery were satisfactory recovery ranging from 94.8–102% (Table 5), confirming that methods are accurate and convenient for quantitative analysis.

**Table 5.** Results from the standard additions method for checking the accuracy of the volumetric methods for determination of SO<sub>2</sub> (free and total) and reducing sugars in wine and brandy (n = 3)

	$\gamma$ (Free SO <sub>2</sub> )			$\gamma$ (Total SO <sub>2</sub> )			$\gamma$ (Reducing sugars)		
	Calculated /mg/L	Found /mg/L	Recovery, %	Calculated /mg/L	Found /mg/L	Recovery, %	Calculated /mg/L	Found /mg/L	Recovery, %
<b>White wine</b>									
Standard addition									
I	40.85	39.68	97.1	97.16	96.0	98.8	6.60	6.40	96.9
II	45.85	46.08	100.5	102.1	99.84	97.7	11.6	11.0	94.8
III	85.85	84.48	98.5	142.2	140.1	99.0	51.6	50.8	98.4
<b>Red wine</b>									
I	19.08	20.48	107	63.88	62.72	98.2	7.20	7.40	102.7
II	24.08	24.31	101	68.88	70.4	102	12.2	12.0	98.3
III	64.08	62.72	97.8	108.8	106.2	97.6	52.2	52.6	100.7
<b>Brandy</b>									
I	6.28	6.4	101.9	8.84	8.96	101.3	8.50	8.40	98.8
II	11.28	11.52	102.1	13.84	12.8	92.5	13.5	13.7	101.5
III	51.28	49.92	97.3	53.85	53.76	99.8	53.5	52.9	98.9

*Repeatability and reproducibility.* Repeatability was checked with 10 repetitions in one day, while reproducibility was checked with 3 repetitions in 3 consecutive days, both performed on real samples (white wine, red wine and brandy) (Table 6).

Values for the standard deviations were very low for all methods, ranging from 0.15 to 0.70 for repeatability and 0.13 to 0.75 for reproducibility, confirming that methods are accurate and can be applied for determination of SO<sub>2</sub> (free and total) and reducing sugars in white wines, red wines and alcoholic beverages.



**Table 6.** Results for repeatability and reproducibility of SO<sub>2</sub> (free and total) and reducing sugars in white wines, red wines and alcoholic beverages

Samples	Content of free SO <sub>2</sub> /mg/L	Content of total SO <sub>2</sub> /mg/L	Content of reducing sugars/g/L
<i>Repeatability (10 replicates in one day)</i>			
<i>White wine</i>			
<x>	33.8	74.9	1.15
SD	0.66	0.70	0.15
RSD (%)	1.95	0.94	13.7
<i>Red wine</i>			
<x>	15.8	41.8	2.81
SD	0.66	0.62	0.15
RSD (%)	4.17	1.47	5.16
<i>Brandy</i>			
<x>	2.16	3.68	1.3
SD	0.31	0.49	0.15
RSD (%)	14.2	13.6	11.1
<i>Reproducibility (3 replicates x 5 days)</i>			
<i>White wine</i>			
<x>	33.5	75.1	1.24
SD	0.57	0.75	0.13
RSD (%)	1.7	0.99	10.8
<i>Red wine</i>			
<x>	15.6	41.9	2.84
SD	0.57	0.57	0.13
RSD (%)	3.67	1.36	4.72
<i>Brandy</i>			
<x>	2.06	3.52	1.3
SD	0.44	0.70	0.13
RSD (%)	21.1	20.0	10.3

<x> - average, SD – standard deviation, RSD – relative standard deviation

### 3.2. Application of methods for analysis of wines and brandies

Validated volumetric methods for determination of free and total SO<sub>2</sub> and reducing sugars were applied on real samples, including white wines (Smederevka, Chardonnay, Riesling, Muscat Ottonel and Sauvignon blanc), red wines (Vranec, Merlot, Cabernet Sauvignon, Pinot Noir and Stanušina) and alcoholic beverages (yellow brandy, white brandy and mastika). All wines were protected from oxidation and microbial contamination, containing sufficient levels of free and total SO<sub>2</sub>: (free SO<sub>2</sub>: 20.48 to 47.37 mg/L for white wines and 10.24 to 26.88 for red wines; total SO<sub>2</sub>: 88.32 to 112.6 for white wines and 44.8 to 65.28 for red wines). All wines were considered as dry wines, presenting low



values of reducing sugars, ranging from 1 to 2.9 g/L). Brandies also contained low levels of sugars (0.3 to 3.8 g/L). Results were in accordance to previous published data for Macedonian wines (Ivanova-Petropulos et al. 2015).

**Table 7.** Content of SO<sub>2</sub> (free and total) and reducing sugars in wines and alcoholic beverages

Wines	Free SO <sub>2</sub> (mg/L)	Total SO <sub>2</sub> (mg/L)	Reducing sugars (g/L)
<i>White wines</i>			
Smederevka	42.24	112.6	2.9
Chardonnay	30.72	98.56	1.6
Riesling	35.85	88.32	1.3
Muscat Ottonel	20.48	102.4	1.9
Sauvignon blanc	47.37	90.88	2.6
<i>Red wines</i>			
Vranec	15.36	44.80	2.9
Merlot	21.76	60.16	2.9
Cabernet Sauvignon	10.24	65.28	1.3
Pinot Noir	11.52	49.92	1.0
Stanušina	26.88	60.16	1.3
<i>Alcoholic beverages</i>			
White brandy	1.28	3.84	0.3
Yellow brandy	1.28	3.84	2.2
Mastika	2.26	5.12	3.8

#### 4. Conclusion

Volumetric methods for determination of SO<sub>2</sub> (free and total) and reducing sugars in wines and alcoholic beverage were checked. Validation parameters confirmed its accuracy and precision. These methods are fast and very easily available in every laboratory. These methods are widely applicable in wineries for control of the content of SO<sub>2</sub> and sugars during the wine production. The content of SO<sub>2</sub> was higher in the white wines compared to the red wines since white wines are easily oxidizable and therefore higher dose of SO<sub>2</sub> is needed for protection of oxidation. All wines were dry, containing low value of reducing sugars (< 5 g/L).

#### 5. References

- [1] Ivanova-Petropulos V., Mitrev S. (2014). Determination of SO<sub>2</sub> and total sugars in Macedonian wines. *Yearbook - Faculty of Agriculture*, 12, 7-18.
- [2] Ivanova-Petropulos V., Ricci A., Nedelkovski D., Dimovska V., Parpinnelo G.P., Versari A. (2015). Targeted analysis of bioactive phenolic compounds and antioxidant activity of Macedonian red wines. *Food Chemistry*, 171, 414-420.
- [3] Vahl J.E., Converse J. E. (1980). Ripper procedure for determining sulfur dioxide in Wine: Collaborative study, *Journal – Association of Official Analytical Chemists*, 63, 194-9.







Прегледен труд

УДК 633.1(497.7)

## ПРОИЗВОДСТВО И ЗАСТАПЕНОСТ НА ЖИТНИТЕ РАСТЕНИЈА ВО РЕПУБЛИКА МАКЕДОНИЈА

Мите Илиевски<sup>1</sup>, Драгица Спасова<sup>1</sup>, Љупчо Михајлов<sup>1</sup>,  
Душан Спасов<sup>1</sup>, Наталија Маркова Руждиќ<sup>1</sup>, Верица Илиева<sup>1</sup>,  
Еленица Софијанова<sup>2</sup>

**Краток извадок:** Производството на жита во Република Македонија (2014 година) се остварува со производство на зрно од пченица (287.454 t), јачмен (153.055 t) и пченка (136.930 t). Рж, ориз и овес се произведуваат во помали количини.

Житните растенија не ја задоволуваат домашната побарувачка, иако тие имаат стратешко значење и се најзастапени култури. Пченицата е доминантна житна култура која зафаќа повеќе од половина од вкупната засадена површина со житни култури, потоа следи јачменот со приближно 24% и пченката со околу 17% од вкупното обработливо земјиште.

Јачменот и пченката најчесто се користат како сточна храна, но исто така голем дел од пченицата се користи како сточна храна, особено во семејните фарми. Просечното годишно производство на житни култури е околу 546.760 тони со просечен принос на сите житни култури на околу 3,38 t/ha.

**Клучни зборови:** *производство, жита, принос, површина, растенија.*

## PRODUCTION AND BALANCE AMONG OF CEREAL PLANTS IN REPUBLIC OF MACEDONIA

Mite Plevski<sup>3</sup>, Dragica Spasova<sup>3</sup>, Ljupco Mihajlov<sup>3</sup>, Dusan Spasov<sup>3</sup>,  
Natalija Markova Ruzdic<sup>3</sup>, Verica Pleva<sup>3</sup>, Elenica Sofijanov<sup>4</sup>

**Abstract:** Grain production in the Republic of Macedonia is accomplished by producing a grain of wheat (287 454 t), barley (153 055 t) and maize (136 930 t). Rye, rice and oats are produced in a smaller quantities.

<sup>1</sup> Земјоделски факултет, Универзитет „Гоце Делчев“, Штип

<sup>2</sup> Економски факултет, Универзитет „Гоце Делчев“, Штип

<sup>3</sup> Faculty of Agriculture, „Goce Delchev“ University, Stip, Macedonia

<sup>4</sup> Faculty of Economy, „Goce Delchev“ University, Stip, Macedonia



The cereal plants do not satisfy the domestic demands, even though they have strategic significance and are the most present crops. Wheat is the dominant cereal that takes up more than half of the total planted area with cereal crops, and it is followed by barley with approximately 24% and maize by around 17% of the total arable land.

Barley and maize are mostly used as feed, but also a large part of wheat is used as feed, especially in the family farms. There is an average annual production of cereal crops of about 546 760 tons with an average yield of all cereal crops of about 3,38 t/ha.

**Key words:** *production, cereals, yield, area, plants.*

## 1. Вовед

Житата се многу значајна група на нивски културни растенија [1]. Од вкупната земјоделска површина во Република Македонија (1.263.000 ha), 40,46% е обработливо земјиште (511.579 ha) [3]. Скоро 81% од обработливото земјиште е со ораници и бавчи, од кои под житни култури се 38,98% или 160.988 ha [3]. Пченицата е на прво место по површина од сите житни растенија.

Житните растенија имаат многустрана примена, и тоа за исхрана на луѓето, домашните животни и преработувачката индустрија [5]. Производството на зрно од житните растенија не ја задоволува домашната побарувачка, иако тие имаат стратешко значење и се најзастапени растенија во растителното производство кај нас.

Овие состојби се резултат на неколку причини, меѓу кои:

- користење на несертифициран нископриносен семенски материјал;
- несоодветна примена на агротехнички мерки (како што е доцнење со навременото прихранување во соодветна етапа од органогенетскиот развој кај житните растенија);
- неповолни климатските услови – суша (поради недостигот, но и несоодветна употреба на системите за наводнување);
- употреба на стара механизација;
- слаба употреба на средства за заштита на растенијата и друго.

За остварување на високо и стабилно производство во голема мера влијаат и почвено климатските услови на реонот, но и степенот на употребената агротехниката.

Агротехничките мерки со чијашто примена можат да се остварат поголеми приноси се, меѓу останатите, и правилен избор на преткултурата, одгледување во плодоред и одбегнување на одгледување во монокултура и преткултури кои доцна се прибираат и оневозможуваат придржување кон оптималните рокови на сеидба, правилен избор на сорти, квалитетна



обработка на почвата, користење на оптимални количини на семе, усогласување на дополнителната исхрана на растенијата со природната плодност на почвата, одгледување на отпорни генотипови на штетници, болести и плевели и друго [2].

Во производството на житните растенија во Република Македонија овие моменти честопати не се почитуваат, што директно води кон намалување на просечните приноси по единица површина.

Во Република Македонија постојат мали разлики во постигнатите просечни приноси од земјоделските претпријатија и семејните фарми.

## **2. Природни услови за производство на житните растенија**

Во Република Македонија постои можност за одгледување на сите житни растенија.

Зимските форми на жита поднесуваат многу пониски температури во споредба со пролетните [5]. Кај зимските форми оптимумот за поминување на првиот вегетационен период е од 0 до 15°C. Во подоцниот период на развој, а посебно во фаза на формирање на генеративните органи и цветањето, тие имаат потреба од повисоки температури со оптимум од 16 до 22°C [6].

Најотпорни житни растенија на ниски температури се 'ржта и пченицата. Тие без снежен покривач поднесуваат од -20 до -25°C, а може и повеќе [5]. Најотпорни на ниски температури се зимските форми на жита во фенофаза на братање.

Просовидните жита се многу осетливи на ниски температури. Просото, сиракот, оризот и елдата многу тешко поднесува температури под 0°C, а додека пченката во фенофазата на никнење поднесува негативни температури од -2 до -3°C. Житните растенија имаат голема потреба од вода и нејзиниот недостиг тешко го поднесуваат [5]. Еден од главните проблеми во производството на житните растенија во Република Македонија е токму овој фактор. Од вистинските жита најчувствителни се овесот и 'ржта, а потоа пченицата и јачменот и тоа во фенофазите налевање на зрното и млечна зрелост.

Житата во најголема мера се одгледуваат на сите почвени типови.

Според реакцијата на почвениот раствор тие се делат на две групи: житни растенија кои нормално растат и вегетираат на неутрална или слабо кисела реакција (рН 6-7): пченица, јачмен и пченка и житни растенија кои поднесуваат поширок интервал на рН вредност: 'рж, овес, просо и елда [6].



### 3. Производство на пченица во Република Македонија

Застапеноста на високоприносни сорти и сеидбата со квалитетен семенски материјал е еден од главните фактори за постигнување на високи приноси од пченица [4].

Во табела 1 се дадени податоци за застапеноста, приносот и оствареното производство на пченица во производните 2012, 2013 и 2014 година и просеците за тригодишниот период.

Од податоците се гледа дека површините под пченица се константни, со мали осцилации од година во година, но податоците за просечниот принос по единица површина покажуваат тенденција на зголемување. Просечното производство на пченично зрно за тригодишниот период е 253.959 тони. Оваа количина задоволува околу 55 до 60% од потребите на Република Македонија. Останатата количина сè уште се обезбедува од увоз.

**Табела 1.** Производство на пченица во Република Македонија според официјални податоци од Државниот завод за статистика на Република Македонија

**Table 1.** Wheat production in Republic of Macedonia according to official data from the State statistical office of the Republic of Macedonia

Период	Површина (ha)	Принос (t/ha)	Производство (t)
2012	79 745	2,69	214 963
2013	80 924	3,19	258 960
2014	76 861	3,75	287 954
Просек 2012/14	79 176	3,21	253 959

### 4. Производство на јачмен во Република Македонија

Во табела 2 се дадени податоци за застапеноста, приносот и оствареното производство на јачмен во производните 2012, 2013 и 2014 година и просеците за тригодишниот период.

**Табела 2.** Производство на јачмен во Република Македонија според официјални податоци од Државниот завод за статистика на Република Македонија

**Table 2.** Barley production in Republic of Macedonia according to official data from the State statistical office of the Republic of Macedonia

Период	Површина (ha)	Принос (t/ha)	Производство (t)
2012	41 057	2,20	90 366
2013	38 138	2,99	125 565
2014	41 202	3,71	153 055
Просек 2012/14	40 132	2,96	122 995



Од податоците се гледа дека површините под јачмен се константни, со мали осцилации од година во година, но податоците за просечниот принос по единица површина покажуваат тенденција на зголемување. Просечното производство на јачмен за тригодишниот период е 122.995 тони.

### 5. Производство на пченка во Република Македонија

Во табела 3 се дадени податоци за застапеноста, приносот и оствареното производство на пченка во производните 2012, 2013 и 2014 година и просеците за тригодишниот период.

Од податоците се гледа дека површините под пченка се константни, со мали осцилации од година во година, но податоците за просечниот принос по единица површина покажуваат тенденција на зголемување. Просечното производство на зрно од пченка за тригодишниот период е 127.967 тони. Се произведува на површина од околу 28.413 хектари со просечен принос од 4,22 t/ha.

**Табела 3.** Производство на пченка во Република Македонија според официјални податоци од Државниот завод за статистика на Република Македонија

**Table 3.** Maize production in Republic of Macedonia according to official data from the State statistical office of the Republic of Macedonia

Период	Површина (ha)	Принос (t/ha)	Производство (t)
2012	29 180	3,97	115 928
2013	25 567	4,22	131 043
2014	30 493	4,49	136 930
Просек 2012/14	28 413	4,22	127 967

### 6. Производство на ориз во Република Македонија

Оризот е житна култура која во вкупната површина под житни култури учествува со околу 3%. Производството на ориз во Република Македонија е со долга традиција на одгледување.

Во табела 4 се дадени податоци за застапеноста, приносот и оствареното производство на ориз во производните 2012, 2013 и 2014 година и просеците за тригодишниот период.

Според податоците на Државниот завод за статистика на Република Македонија во периодот од 2012 до 2014 година оризот бил засеан на површина од 5.096 ha со просечен принос од 5.702 kg/ha.



**Табела 4.** Производство на ориз во Република Македонија според официјални податоци од Државниот завод за статистика на Република Македонија

**Table 4.** Rice production in Republic of Macedonia according to official data from the State statistical office of the Republic of Macedonia

Период	Површина (ha)	Принос (t/ha)	Производство (t)
2012	4 656	5,23	24 361
2013	4 865	5,92	27 921
2014	5 174	5,89	30 500
Просек 2012/14	5 096	5,70	27 594

Во Македонија оризот најмногу се произведува во Кочанскиот регион. Пределите околу Општина Кочани имаат идеални услови за производство на квалитетен ориз. Поволната клима, плодната почва, изобилството на вода и топлина ги прават атарите на Општина Кочани и Општина Чешиново и Облешево погодни за одгледување и производство на најквалитетните сорти на ориз. Овде се произведуваат околу 95% од вкупното производство на ориз во Република Македонија.

## 7. Производство на ’рж во Република Македонија

Во табела 5 се дадени податоци за застапеноста, приносот и оствареното производство на ’рж во производните 2012, 2013 и 2014 година и просеците за тригодишниот период.

**Табела 5.** Производство на ’рж во Република Македонија според официјални податоци од Државниот завод за статистика на Република Македонија

**Table 5.** Rye production in Republic of Macedonia according to official data from the State statistical office of the Republic of Macedonia

Период	Површина (ha)	Принос (t/ha)	Производство (t)
2012	3 767	1,93	7 288
2013	3 760	2,36	8 898
2014	4 380	2,74	11 402
Просек 2012/14	3 969	2,34	9 196

Од податоците се гледа дека површините со ’рж се константни, со мали осцилации од година во година, но податоците за просечниот принос по единица површина покажуваат тенденција на зголемување. Вкупното производство во последната година е зголемено за цели 4.114 тони или за 56% во споредба со 2012 година.



## 8. Производство на овес во Република Македонија

Во нашата земја овесот го нема значењето како другите житни култури. Површините под овес се намалени во однос на периодот од пред неколку децении. Овесот има добро развиен коренов систем и успева на различни почви. Подобро од другите жита успева на кисели почви, а поднесува и варовнички почви. Овесот кај нас се одгледува како пролетна култура и се сеат популации и сорти од пролетните форми.

Во табела 6 се дадени податоци за застапеноста, приносот и оствареното производство на овес во производните 2012, 2013 и 2014 година и просеците за тригодишниот период.

**Табела 6.** Производство на овес во Република Македонија според официјални податоци од Државниот завод за статистика на Република Македонија

**Table 6.** Oats production in Republic of Macedonia according to official data from the State statistical office of the Republic of Macedonia

Период	Површина (ha)	Принос (t/ha)	Производство (t)
2012	2 632	1,49	3 898
2013	2 789	1,87	5 215
2014	2 878	2,10	6 033
Просек 2012/14	2 766	1,82	5 049

Од податоците за вкупното производство може да се види дека во последната година е зголемено за цели 2.135 тони или за 54,7% во споредба со 2012 година.

## 9. Просечен принос на житните растенија во Република Македонија

Во табела 7 се дадени податоци за просечниот принос по единица површина на сите застапени житни растенија во Република Македонија за производните 2012, 2013 и 2014 година и тригодишниот просек.

**Табела 7.** Просечниот принос по хектар од житни растенија (kg/ha)

**Table 7.** Average yield per hectare of cereal plants (kg/ha)

Година	2012	2013	2014	Просек 2012/2014
Пченица	2 696	3 198	3 755	3 216
Јачмен	2 201	2 994	3 719	2 971
Пченка	3 973	4 223	4 495	4 230
Ориз	5 232	5 992	5 895	5 706
Рж	1 930	2 360	2 740	2 340
Овес	1 490	1 870	2 102	1 820





Од податоците во табела 7 може да се забележи дека највисок просечен принос по хектар за периодот 2012/2014 година има оризот (5.706 kg/ha), а најмал овесот (1.820 kg/ha).

Треба да се спомне и податокот дека кај пченицата во 2014 година имаме зголемување на просечниот принос по единица површина во споредба со претходните две години. Таков е случајот и кај јачменот, пченката, ’ржта и овесот (освен кај оризот).

Овој податок е охрабрувачки и дава можности за верување дека освен климатските услови, производителите ги надминуваат недореченостите и грешките во примената на соодветни агротехнички мерки и мерки на нега во текот на производството на житните растенија. Тоа во голема мера ќе придонесе за намалување на зависноста од увоз на зрно од житни растенија.

## 10. Вкупно производство на зрно од житните растенија во Република Македонија

Во табела 8 се дадени податоци за вкупното производство во тони на житни растенија во Република Македонија за производните 2012, 2013 и 2014 година и тригодишниот просек.

Табела 8. Вкупно производство (t) од житни растенија

Table 8. Total productions (t) of cereal plants

Година	2012	2013	2014	Просек 2012/2014
Пченица	214 963	258 960	287 954	253 959
Јачмен	90 366	125 565	153 055	122 995
Пченка	115 928	131 043	136 930	127 967
Ориз	24 361	27 921	30 500	27 594
’Рж	7 288	8 898	11 402	9 196
Овес	3 898	5 215	6 033	5 049
<b>ВКУПНО</b>	<b>456 804</b>	<b>557 602</b>	<b>625 874</b>	<b>546 760</b>

Од податоците во табела 8 може да се констатира дека Република Македонија најголемо производство за периодот 2012/2014 година од житните растенија остварила од пченица, па следуваат јачменот, пченката, оризот, ’ржта и овесот.

Во 2014 година имаме и најголемо вкупно производство на зрно од житни растенија и тоа 625.874 илјади тони, што е за 169.070 тони или 37,01% зголемено производство во споредба со 2012 година.



## 11. Заклучоци

Врз основа на напред изнесеното може да се извлечат следните заклучоци:

- Производството на жита во Република Македонија (2014 година) се остварува со производство на зрно од пченица (287.454 тони), јачмен (153.055 тони) и пченка (136.930 тони). ’Ржта, оризот и овес се произведуваат во помали количини.
- Република Македонија најголемо производство за периодот 2012/2014 година од житни растенија остварила од пченица, па јачмен, пченка, ориз, ’рж и овес.
- Житните растенија не ја задоволуваат домашната побарувачка, иако тие имаат стратешко значење и се најзастапени култури.
- Во 2014 година имаме и најголемо вкупно производство на зрно од житни растенија и тоа 625.874 илјади тони, што е за 169.070 тони или 37,01% зголемено производство во споредба со 2012 година.
- Површините под житни растенија се константни, со мали осцилации од година во година.
- Во производството на пченицата во 2014 година има зголемување на просечниот принос по единица површина во споредба со претходните години. Таков е случајот и кај јачменот, пченката, ’ржта и овесот (освен кај оризот).
- Податокот за зголемување на просечниот принос по единица површина кај повеќето житни растенија е охрабрувачки и дава можности за верување дека освен климатските услови, производителите ги надминуваат недореченостите и грешките во примената на соодветни агротехнички мерки и мерки на нега во текот на производството на житните растенија. Тоа во голема мера ќе придонесе за намалување на зависноста од увоз на зрно од житни растенија.

## Литература

- [1] Василевски, Г. (2004): Зрнести и клубенести култури (универзитетски учебник). Издавач Expresive graphics-Скопје.
- [2] Glemočlija, Đ. (2004): Posebno ratarstvo, Žita i zrneve mahunarke. Izdavačka kuća „Draganić”, Beograd.
- [3] Државен завод за статистика на Република Македонија (2012/04): Полјоделство, овоштарство и лозарство, 2012, 2013, 2014. Статистички прегледи: Земјоделство. Скопје.
- [4] Ѓеорѓиевски, М., Спасов, Д., Илиевски, М., Спасова, Д., Атанасова, Б. (2004/2005): Проблематика во производството на семе од пченица во Р. Македонија. Годишен зборник на ЈНУ Институт за јужни



земјоделски култури-Струмица, Година 4/5, стр.105-112, 2004/05,  
Струмица.

- [5] Илиевски, М. (2014): Житни растенија, Универзитет „Гоце Делчев“ – Штип.
- [6] Јевтич, С. (1992) : Посебно ратарство, Београд.