Povezanost sadržaja piretrina i razvojnog stadija cvata dalmatinskog buhača

Parlov, Iva

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:678519

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet
University of Zagreb
Faculty of Agriculture

POVEZANOST SADRŽAJA PIRETRINA I RAZVOJNOG STADIJA CVATA DALMATINSKOG BUHAČA

DIPLOMSKI RAD

Iva Parlov

Zagreb, rujan, 2020.

Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet
University of Zagreb
Faculty of Agriculture

Diplomski studij:

Ekološka poljoprivreda i agroturizam

POVEZANOST SADRŽAJA PIRETRINA I RAZVOJNOG STADIJA CVATA DALMATINSKOG BUHAČA

DIPLOMSKI RAD

Iva Parlov

Mentor:

doc. dr. sc. Martina Grdiša

Neposredni voditelj:

Filip Varga, mag. biol. exp.

Zagreb, rujan, 2020.

Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture

IZJAVA STUDENTA

O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Iva Parlov**, JMBAG 0178105337, rođena 1. 6. 1996. u Zagrebu, izjavljujem da sam samostalno izradila diplomski rad pod naslovom:

POVEZANOST SADRŽAJA PIRETRINA I RAZVOJNOG STADIJA CVATA DALMATINSKOG BUHAČA

Svojim potpisom jamčim:

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

U Zagrebu, dana _____ _____

Potpis studentice

Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studentice **Iva Parlov**, JMBAG 0178105337, naslova

POVEZANOST SADRŽAJA PIRETRINA I RAZVOJNOG STADIJA CVATA DALMATINSKOG BUHAČA

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____ , dana _____ .

Povjerenstvo: potpisi:

1. doc. dr. sc. Martina Grdiša _____
2. doc. dr. sc. Jana Šic Žlabur _____
3. izv. prof. dr. sc. Klaudija Carović-Stanko _____

Zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Martini Grdiša na uloženom trudu, vremenu i strpljenju pri izradi ovog Diplomskog rada.

Zahvaljujem i svojem neposrednom voditelju, mag. biol. exp. Filipu Vargi na uloženom vremenu i na pomoći pri izradi ovog Diplomskog rada.

Zahvaljujem svojim kolegicama Katarini i Magdaleni što su mi uljepšale ovih 5 godina studiranja.

Na kraju, zahvaljujem svojoj obitelji što su mi bili potpora tijekom studiranja.

SADRŽAJ

1. Uvod 1
2. Hipoteza i cilj istraživanja 2
3. Pregled literature 3
3.1. Sistematika i rasprostranjenost 3
3.2. Morfološka svojstva 5
3.3. Kemijska svojstva piretrina 7
3.4. Tehnologija uzgoja 9
3.4.1. Uvjeti uzgoja 9
3.4.2. Plodored i priprema tla za sadnju/sjetvu 9
3.4.3. Sjetva i sadnja 9
3.4.4. Njega usjeva 10
3.4.5. Berba usjeva 10
4. Materijali i metode 13
4.1. Biljni materijal 13
4.2. Ekstrakcija piretrina disperzijom matrice u čvrstoj fazi (MSPD) 15
4.3. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) 18
4.4. Statistička obrada podataka 19
5. Rezultati i rasprava 20
6. Zaključak 30
7. Popis literature 31

Sažetak

Diplomskog rada studentice **Iva Parlov**, naslova

POVEZANOST SADRŽAJA PIRETRINA I RAZVOJNOG STADIJA CVATA DALMATINSKOG BUHAČA

Dalmatinski buhač (*Tanacetum cinerariifolium* Trevir./ Sch. /Bip) je endemska vrsta istočne obale Jadranskog mora. Biljna je vrsta od velike ekonomske važnosti zbog sadržaja prirodnog insekticida piretrina, kojeg čini šest aktivnih sastavnica, i to: piretrin I i II, cinerin I i II te jasmolin I i II. Zbog niske toksičnosti za ljude i toplokrvne životinje primjena piretrina je dozvoljena u ekološkom uzgoju hrane. Cilj ovog rada bio je utvrditi potencijalne razlike u sadržaju piretrina ovisno o razvojnom stadiju cvata dalmatinskog buhača međusobnom usporedbom razvojnih faza dviju prirodnih populacija (Senj i Biokovo). Za ekstrakciju piretrina iz suhih cvjetnih glavica dalmatinskog buhača korištena je metoda ekstrakcije disperzijom matrice u čvrstoj fazi, dok je identifikacija i kvantifikacija svih šest sastavnica piretrina provedena tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti. Najniži sadržaj piretrina kod obje populacije utvrđen je u 1. razvojnom stadiju (neotvoreni pupovi, nazire se vrh jezičastih cvjetova); kod populacije Biokovo iznosio je 0,53 % po masi suhog cvata, dok je kod populacije Senj iznosio nešto više, odnosno 0,58%. U 3. razvojnom stadiju (jezičasti cvjetovi razvijeni, naziru se cjevasti cvjetovi) utvrđen je najviši ukupni sadržaj piretrina; kod populacije Biokovo iznosio je 0,99% po masi suhog cvata, dok je kod populacije Senj iznosio 1,17% po masi suhog cvata. Populacija Senj u svim razvojnim fazama bilježi viši omjer pir I/ pir II, a samim time i veću insekticidnu aktivnost u odnosu na populaciju Biokovo. Omjer pir I/ pir II kod populacije Senj kontinuirano je rastao prema 7. razvojnom stadiju u kojem je i zabilježena njegova najveća vrijednost. Vrijednost omjera pir I/ pir II kod populacije Biokovo oscilirala je kroz svih sedam razvojnih faza, ali najveću vrijednost bilježi u 1. razvojnom stadiju.

Ključne riječi: dalmatinski buhač, piretrin, razvojni stadij, prirodne populacije

Summary

Of the master's thesis – student **Iva Parlov,** entitled

CORRELATION BETWEEN PYRETHRIN CONTENT WITH THE DEVELOPMENT STAGE OF THE DALMATIAN PYRETHRUM FLOWERS

Dalmatian pyrethrum (*Tanacetum cinerariifolium* Trevir./ Sch. / Bip) is an endemic species of the eastern coast of the Adriatic Sea. The plant species is of economic importance due to the content of the natural insecticide pyrethrin, which is composed of six active ingredients pyrethrin I i II, cinerin I i II, and jasmolin I and II. Pyrethrins are used in organic food production due to their low toxicity to humans and warm-blooded animals. This study aimed to determine potential differences in pyrethrin content depending on the Dalmatian pyrethrum flower development stage of the between the two populations (Senj and Biokovo). Matrix Solid Phase Dispersion was used for the extraction of pyrethrins from dried pyrethrum flowers samples, while High Performance Liquid Chromatography was used for the identification and quantification of pyrethrin. The lowest pyrethrin content in both populations was recorded in the first development stage (unopened buds, top of the ray flowers visible). In this stage population from Biokovo contained 0.53 % of pyrethrins in the dry flower head, while in the population of Senj slightly lower values were determined, 0.58 %, respectively. The highest total pyrethrin content was determined in the third development stage (ray flowers developed, disc flowers visible); 0.99 % of the dry flower weight in the population from Biokovo and 1.17 % in the Senj population. The population of Senj in all developmental stages recorded a higher pir I / pir II ratio, and thus higher insecticidal activity compared to the population of Biokovo. The pir I / pir II ratio in the population of Senj continuously increased to the seventh developmental stage, in which its highest value was recorded. The value of the pir I / pir ratio II in the population of Biokovo oscillated through all seven developmental stages, but the highest value was recorded in the first stage.

Keywords: Dalmatian pyrethrum, pyretrin, developmental stage, natural populations

1. Uvod

Dalmatinski buhač (*Tanacetum cinerariifolium* Trevir./ Sch. /Bip.) je višegodišnja zeljasta biljna vrsta koja pripada porodici Asteraceae. Glavičasti cvatovi buhača su građeni od žutih, cjevastih plodnih cvjetova koji se nalaze u središnjem dijelu cvata i neplodnih bijelih jezičastih cvjetova koji ih okružuju (Ozimec i sur. 2015.).

Endemska je vrsta istočne obale Jadranskog mora te je u Hrvatskoj strogo zaštićena biljna vrsta (Grdiša i sur. 2009.). U Hrvatskoj samoniklo raste duž obalnog pojasa i na otocima, a najbrojnije populacije su u Dalmaciji. Raste i u južnom dijelu Bosne i Hercegovine, te na obalnim područjima Albanije i Crne Gore (Heywood 1976.). Najbrojnije populacije dalmatinskog buhača rastu na ekstremno degradiranim staništima. Iako je Hrvatska nekada bila glavni proizvođač, danas su to Tanzanija, Ruanda, Kenija, Kina te Papua Nova Gvineja (FAO 2018.) te Australija s Tasmanijom (BRA 2020.).

Važnost ove biljke krije se u sadržaju sekundarnog metabolita – piretrina. Piretrin je prirodan insekticid koji se prilikom korištenja ne akumulira u podzemnim vodama i okolišu te je nisko toksičan za sisavce i toplokrvne životinje (Jovetić i de Gooijer 1995., Hitmi i sur. 1998.). Zbog navedenih svojstava, koristi se u ekološkom uzgoju (Wei i sur. 2006.). Djeluje kao kontaktni otrov; ulazi u živčani sustav kukaca izazivajući *knock – down* učinak te naposlijetku smrt kukca (Gunasekara 2004.).

Insekticidna aktivnost piretrina je rezultat kombinacije šest aktivnih kemijskih sastavnica (Babić i sur. 2012.), po kemijskom sastavu estera: piretrin I, cinerin I, jasmolin I, piretrin II, jasmolin II, cinerin II, pri čemu su piretrin I i II najjaktivniji. Omjer piretrina I i piretrina II određuje kvalitetu ekstrakta (Maciver 1995.).

Koncentracija šest aktivnih sastavnica piretrina ovisi o genotipu biljke, zemljopisnom podrijetlu, razvojnom stadiju cvata u vrijeme berbe, te metodi sušenja i uvjetima skladištenja (Moslemi 2017.). Optimalno vrijeme berbe određeno je razvojnim stadijem cvata, a utvrđivanje optimalnog stadija od izuzetne je važnosti kako bi se postigao što veći sadržaj piretrina (Gnadinger i Corl 1930.).

U znanstvenoj literaturi dostupna su istraživanja o optimalnom vremenu berbe, odnosno istraživanja usmjerena na utvrđivanje povezanosti razvojnih stadija cvata dalmatinskog buhača sa sadržajem piretrina. Međutim, navedena su istraživanja provedena 60-tih i 70-tih godina 20. stoljeća (Head 1966.; Parlevliet 1970.; Head 1973; Faber 1980.;). Napretkom tehnologije i uvođenjem novih analitičkih metoda, omogućene su kvalitetnije i detaljnije kemijske analize koje će u ovom diplomskom radu biti i primijenjene u utvrđivanju sadržaja svih šest sastavnica piretrina i ukupnih piretrina u različitim razvojnim fazama dviju autohtonih populacija dalmatinskog buhača.

2. Hipoteza i cilj istraživanja

Cilj istraživanja je utvrditi potencijalne razlike u sadržaju piretrina ovisno o razvojnom stadiju cvata dalmatinskog buhača međusobnom usporedbom dviju prirodnih populacija dalmatinskog buhača (Biokovo i Senj).

Pretpostavka je da će prolaskom kroz različite razvojne faze prvotno doći do povećanja sadržaja piretrina, nakon čega će uslijediti pad njegove koncentracije. Također, očekuje se veći ukupni sadržaj piretrina kod populacije Senj, s obzirom na povoljnije okolišne uvjete za rast i razvoj dalmatinskog buhača i sintezu piretrina.

3. Pregled literature

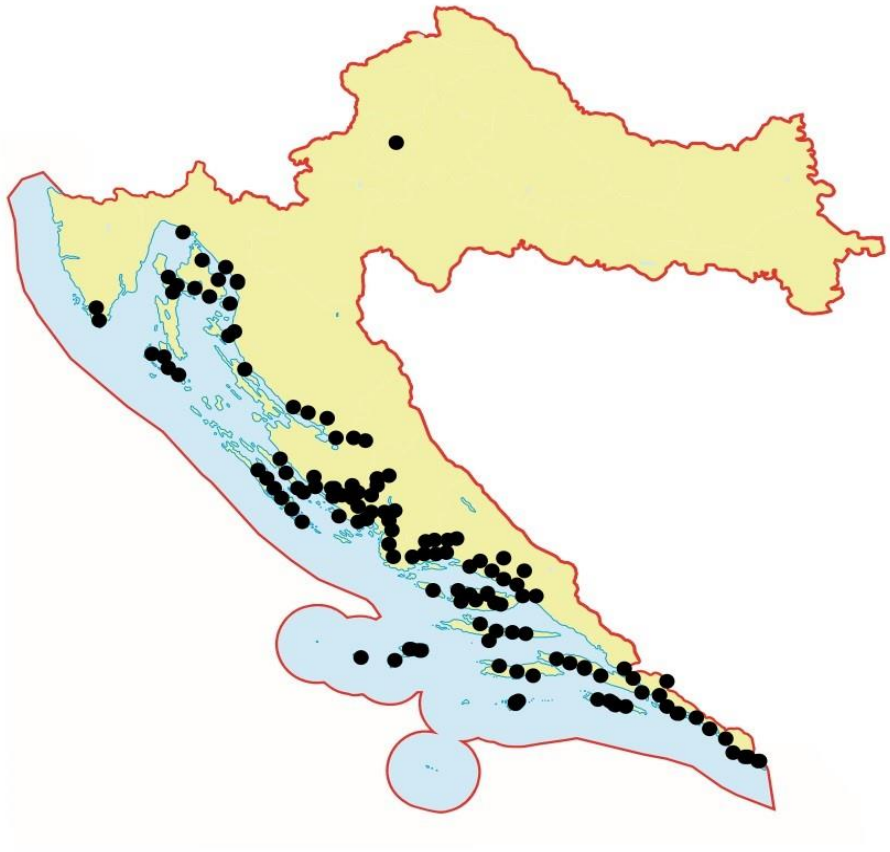
3.1. Sistematika i rasprostranjenost

Dalmatinski buhač (*Tanacetum cinerariifolium* Trevir./ Sch. /Bip.) je višegodišnja zeljasta biljna vrsta koja pripada redu Asterales, porodici Asteraceae te rodu *Tanacetum*. U rodu vratića (*Tanacetum*) u RH nalazimo sedam svojti, a to su:

- *Tanacetum cinerariifolium* (Trevir.) Sch. Bip. – dalmatinski buhač,
- *Tanacetum corymbosum* (L.) Sch. Bip – gronjasti vratić,
- *Tanacetum corymbosum* (L.) Sch. Bip. ssp. *clusii* (Fisch.ex Rchb.) Heywood,
- *Tanacetum corymbosum* (L.) Sch. Bip. ssp. *corymbosum,*
- *Tanacetum macrophyllum* (Waldst. et Kit.) Sch. Bip.,
- *Tanacetum partehium* (L.) Sch. Bip. – majčinski vratić i
- *Tanacetum vulgare* L. – obični vratić (Nikolić 2015.).

U Europi, od 17 poznatih vrsta iz roda *Tanacetum*, ekonomski je najvažniji dalmatinski buhač zbog sadržaja prirodnog insekticida piretrina (Kolak i sur. 1999.). Dalmatinski buhač je strogo zaštićena biljna vrsta (Ozimec i sur. 2015.). Narodni nazivi za dalmatinski buhač su buhač, divlji pelin, buvač, dalmatinska hrisantema te matrikolda. Opis dalmatinskog buhača prvi put je objavljen u djelu „*L'Orto botanico di Padova*“ još 1660. godine, a važnost dalmatinskog buhača kao prirodnog insekticida objavio je poznati botaničar Roberto de Visiani (1880. – 1878.). Njegovu primjenu u svrhu suzbijanja štetnika proširio je dubrovački ljekarnik Antun Drobac (1810. – 1882.), da bi ju Lavoslav Ružička (1887. – 1976.) 1920. godine i znanstveno potvrdio (Nikolić i sur. 2015.).

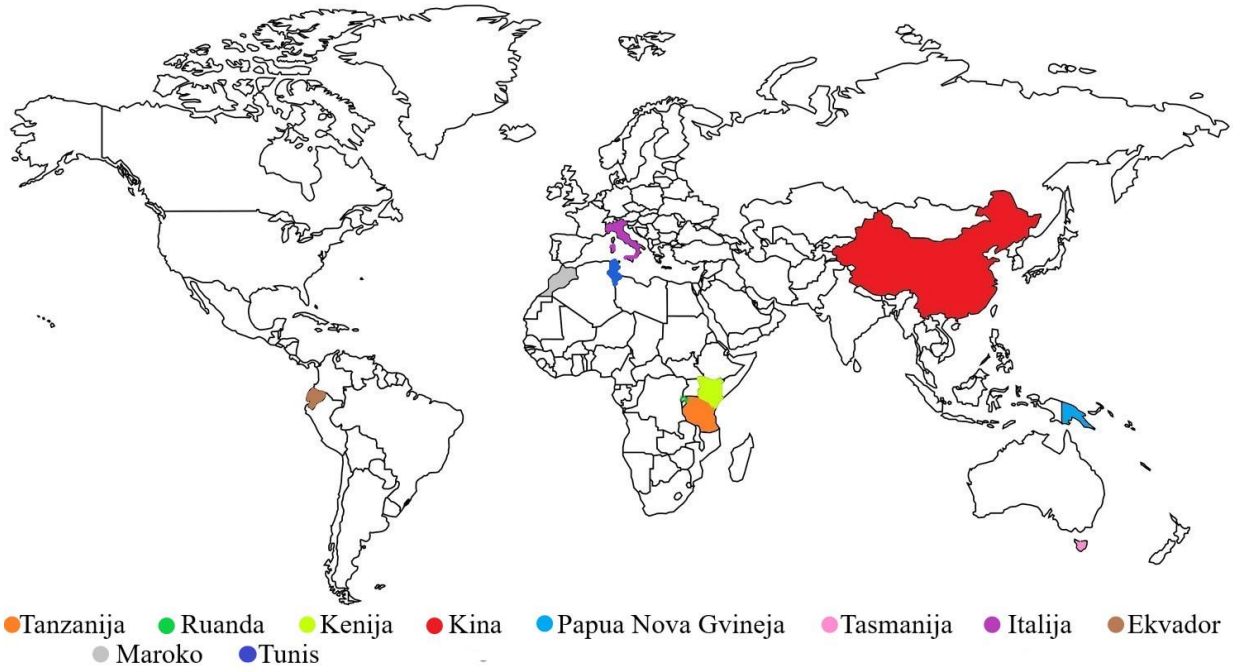
Buhač je endemska vrsta istočne obale Jadranskog mora, samoniklo raste duž čitave hrvatske obale od Istre na sjeveru pa sve do Prevlake na jugu, na jugu Bosne i Hercegovine, te uz obalu Crne Gore, pa do sjeverne Albanije (Nikolić 2015., Grdiša i sur. 2009.). Rasprostranjenost u Hrvatskoj (Slika 3.1.1.) uključuje najjužniji dio istarskog poluotoka (Premantura) i Kvarnerske otoke (Cres, Krk, Lošinj), a najbrojnije populacije su u Dalmaciji uz obalu i na otocima (Ugljan, Dugi otok, Hvar, Brač, Lastovo, Mljet, Vis, Biševo), gdje raste od obale mora do 200 m nadmorske visine, iako je zabilježen lokalitet na nadmorskoj visini višoj od 500 m, kao što je Zmijsko brdo na sjeverozapadnom dijelu polutotoka Pelješca (Nikolić i sur. 2015.). Također ga nalazimo na planinskim predjelima Biokova i Velebita do 1000 metara nadmorske visine (Nikolić 2015).



Slika 3.1.1. Rasprostranjenost dalmatinskog buhača u RH
Izvor: Flora Croatica Database https://hirc.botanic.hr/fcd/ - pristup 08.03.2020.

Najbrojnije populacije dalmatinskog buhača rastu na ekstremno degradiranim staništima, u područjima submediteranskih i epimediteranskih suhih travnjaka te na kamenjarskim pašnjacima, a u manje brojnim populacijama i u prorijeđenim mješovitim i stenomediteranskim čistim vazdazelenim šumama i makijama crnike i u vegetaciji tirensko-jadranskih vapnenačkih stijena (Nikolić i sur. 2015.).

Godinama je najveći svjetski proizvođač buhača bila Hrvatska (Dalmacija). Svoj vrhunac proizvodnja dostiže početkom 20. stoljeća uz prinose od 400 – 800 kg/ha suhog cvata. Rekordna je bila 1926. godina kada je 1350 t suhog cvata izvezeno u SAD i u zemlje zapadne Europe (Ožanić 1955., Kolak 1999., Ozimec i sur. 2015.), ali zbog nestalnosti tržišta i zbog prodaje neprerađenog cvijeta dalmatinskog buhača, koja nije zadovoljavala potrebe kupaca (Benić Penava 2012.) te početka korištenja sintetskih pesticida kao što je DDT, proizvodnja prestaje. U razdoblju između dva svjetska rata Japan postaje najveći svjetski proizvođač, a nakon Drugog svjetskog rata, Kenija zauzima to mjesto (Moslemi 2017.). Prema podacima Organizacije za prehranu i poljoprivredu (*Food and Agriculture Organization*) (FAO 2018.), u 2018. godini proizvedeno je 11 311 t suhih cvatova dalmatinskog buhača, na površini od 22 659 ha, a prosječni svjetski prinos suhog cvata iznosio je 499,2 kg/ha. Tome je potrebno pridodati dostupne podatke o proizvodnji u Australiji, koja je u 2017. godini iznosila oko 7000 t (BRA 2020.). Na slici 3.1.2. prikazani su najvećih svjetski proizvođači dalmatinskog buhača.



Slika 3.1.2. Najveći svjetski proizvođači dalmatinskog buhača
Izvor: Organizacija za hranu i poljoprivredu (FAO) http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC - pristup: 13. 03. 2020.

3.2. Morfološka svojstva

Buhač je višegodišnja zeljasta biljka koja raste u obliku polugrma (slika 3.2.1.). Ovisno o genotipu i uvjetima uzgoja, buhač doseže visinu 30 – 100 cm (Kolak i sur. 1999.). Odlikuje ga jak i vrlo dobro razvijen korijenov sustav (Stepanović i sur. 2009.). Svake godine iz korijena izbija mnoštvo jednogodišnjih zeljastih izbojaka koji na vrhu završavaju glavičastim cvatom. Duge stabljike dalmatinskog buhača su brazdaste i prekrivene sivkastim kratkim dlačicama. Jedna biljka može formirati 300 – 400 sekundarnih stabljika s cvjetnim glavicama (Kolak i sur. 1999.). Na slici 3.2.2. prikazani su bazni dvostruko perasti i nepravilno duboko razdijeljeni listovi, čija se duljina mijenja prema genotipu biljke i vrsti podloge (Kušan 1938.). Gornji listovi su sjedeći, i manjih dimenzija od prizemnih listova (Nikolić i sur. 2015.).



Slika 3.2.1. Grm dalmatinskog buhača
Autor: M. Grdiša, 2020.



Slika 3.2.2. Bazalni listovi buhača
Izvor: Nikolić i sur. 2015

Cvatovi dalmatinskog buhača karakteristični su za porodicu glavočika i promjera su od 3 do 5 cm. Biljka stara dvije godine može razviti od 200 do 400 cvatova, a starije čak i preko 800 cvatova (Stepanović i sur. 2009.). Cvat sadrži dvije vrste sjedećih cvjetova (Brewer 1968.). Kao što je i prikazano na slici 3.2.3., u središnjem dijelu cvata smješteni su žuti cjevasti cvjetovi, a s vanjske strane ih okružuju jezičasti bijeli cvjetovi.

Bijeli jezičasti cvjetovi sadrže samo muške organe, dok cjevasti cvjetovi sadrže i muške i ženske organe (Bhat 1995.). Ovi fertilni cvjetovi sastavljeni su od pet lapova čaške i pet latica vjenčića te pet kratkih prikrivenih prašnika i plodnica (Skender 1999.). Na cvjetnoj glavici prvo se otvaraju jezičasti cvjetovi koji su razvijeniji od unutarnjih cjevastih cvjetova. Ovojni listovi cvata su tvrdi i raspoređeni u tri reda, s vanjske strane su dlakavi, a s unutarnje glatki i bjeličasti (Nikolić i sur. 2015.). Cvatovi nalikuju na cvatove ivančice, odakle i potječe jedan od narodnih naziva dalmatinska ivančica (Ozimec i sur. 2015).



Slika 3.2.3. Cvatovi dalmatinskog buhača
Autor: M. Grdiša, 2019.

Plod je jednosjemena, pri osnovi suženija roška dužine od 2,5 do 3,5 mm. Sjeme je izduženo, tamnožute boje sa izraženim rebrima. Masa sjemenki kreće se od 0,9 do 1,1 g. Cvatnja počinje krajem svibnja, a završava početkom lipnja (Stepanović i sur. 2009.).

3.3. Kemijska svojstva piretrina

Cvatovi dalmatinskog buhača koriste se za ekstrakciju piretrina. To je jedan od poznatijih prirodnih insekticida čija je karakteristika niska toksičnost za ljude i toplokrvne životinje (Elliot i sur. 1969., Purseglove 1982.). Minimalna smrtonosna oralna doza piretrina je 750 mg/kg za djecu, te 1000 mg/kg za odrasle (Vasisht i Vishavjit 2000.). Najveće količine piretrina smještene su u cvjetnim glavicama, odnosno u uljanim žlijezdama roški: 93,7 %; znatno manje u cjevastim cvjetovima: 2 %; te u jezičastim cvjetovima i cvjetištu: 2,6 % (Head 1966.).

Ovaj sekundarni metabolit dalmatinskog buhača je lako biorazgradiv. Pod utjecajem sunčeve svjetlosti, vode i zraka, on postaje nestabilan i zbog toga se ne akumulira u hranidbenim lancima i u podzemnim vodama (Cochran 1995., Jovetić i de Gooijer 1995., Todd i sur. 2003.). Kao rezultat navedenog, vodeći je prirodni insekticid u ekološkom uzgoju hrane. Koristi se pri uzgoju različitih poljoprivrednih usjeva za suzbijanje lisnih ušiju, crvenog voćnog pauka, stjenica i ostalih kukaca (Glynne-Jones 2001.). Prema Ozimec i sur. (2015.) buhač se koristio kao repelent protiv komaraca, njime su se liječile rane domaćih životinja, od alkohola i eteričnih ulja izrađivala se tinktura kojom se mazalo tijelo. Također, Kušan (1938.) navodi kako su se strunjače punile suhom biljkom buhača još i prije poznavanja botaničkih svojstava biljke.

Unatoč dugoj povijesti korištenja ovog prirodnog insekticida, nije zabilježen slučaj rezistentnosti kod kukaca zbog složene strukture ekstrakta. S druge strane, postoje sintetizirani insekticidi na koje su brojni kukci razvili rezistentnost (Todd i sur. 2003.), a koriste se jer su stabilniji u okolišu, imaju veću učinkovitost, a samim time, manji su troškovi prilikom proizvodnje. S vremenom, povećali su se zahtjevi za sigurnim i ekološki prihvatljivim insekticidima te se zbog toga ponovo povećala upotreba piretrina (Matsuda i sur. 2005.).

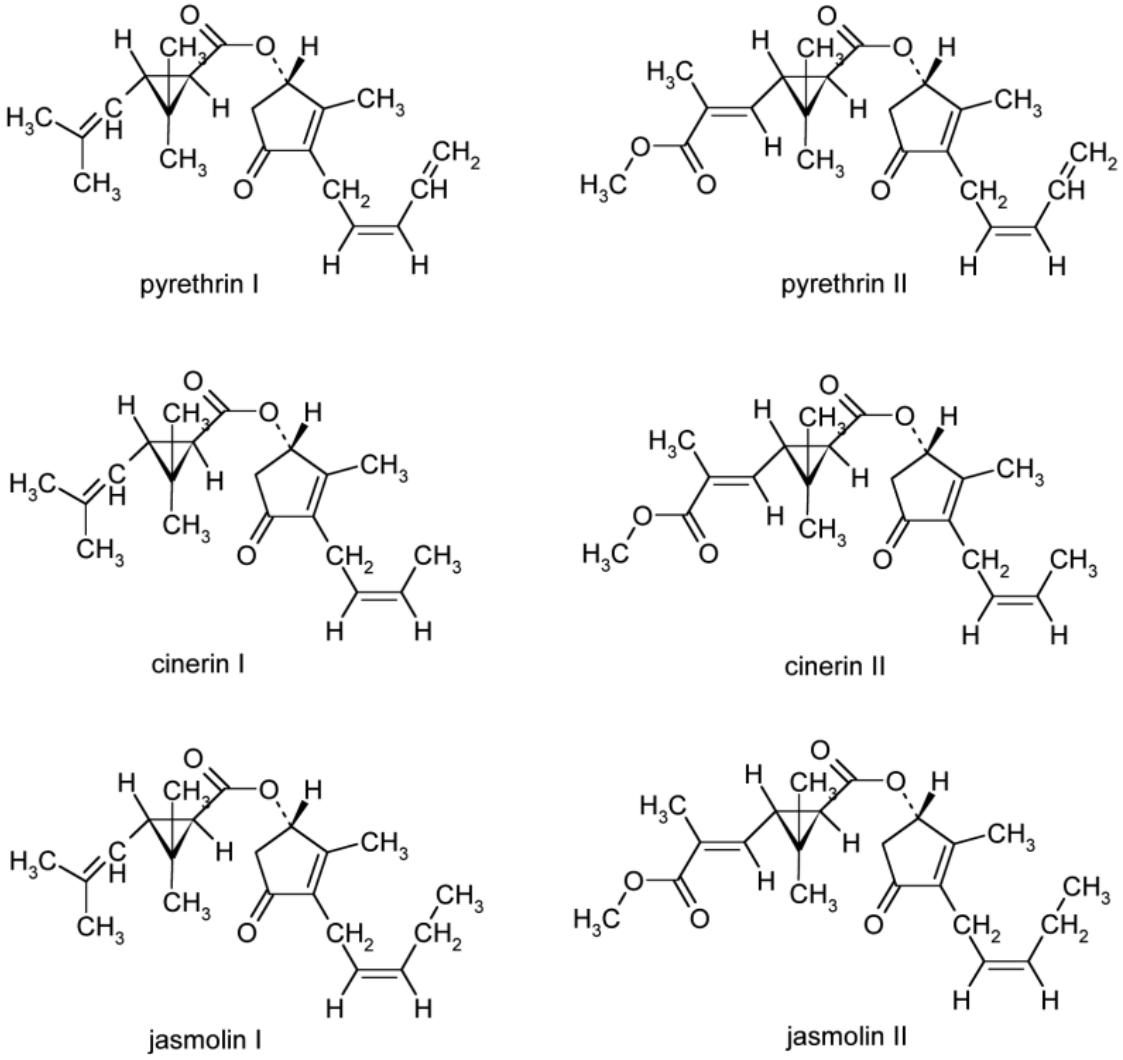
Piretrini imaju repelentno djelovanje (niske koncentracije piretrina), te kontaktno djelovanje; uzrokuju paralizu kukaca nakon nekoliko sekundi ili minuta (Gunasekara 2004.). Ulaze kroz dišni sustav, ticala, noge i člankovite drške kukca. Djeluju na živčani sustav, izazivajući kontrakcije mišića i nekoordinirane pokrete krila i nogu, te naposlijetku paralizu kukca (Catalano 2010.).

Pojam piretrin odnosi se na šest aktivnih kemijskih sastavnica (Slika 3.3.1.), koji pripadaju skupini terpenoida (Lichtenthaler i sur. 1997.). To su: piretrin I ($C_{21}H_{28}O_3$), cinerin I ($C_{20}H_{28}O_3$), jasmolin I ($C_{21}H_{30}O_3$), piretrin II ($C_{22}H_{28}O_5$), jasmolin II ($C_{22}H_{30}O_5$), cinerin II ($C_{21}H_{28}O_5$). Po kemijskom sastavu su esteri alkohola retrolona i dviju organskih kiselina. Spojevi iz skupine Piretrini I (piretrin I, cinerin I, jasmolin I) su esteri krizantemske kiseline, a spojevi iz skupine Piretrini II (piretrin II, cinerin II i jasmolin II) su esteri piretrinske kiseline (Casida i Quistad 1995.). Omjer piretrina, cinerina i jasmolina u ekstraktu iznosi otprilike 10:3:1, s omjerom piretrina I i piretrina II u rasponu od 0,5 do 3,5 (Babić i sur. 2012.).

Od ukupnih piretrina, zastupljenost Piretrina I iznosi 30 – 70 %, od čega se 40 – 65 % odnosi na piretrin I (Kolak i sur. 1999.). Omjer piretrina I i piretrina II određuje kvalitetu ekstrakta, a on se smanjuje sa zrelošću cvjetova (Pattenden 1970.; Maciver 1995.).

Postoji razlika u toksičnosti piretrina I i piretrina II za kukce. Piretrin II ima brži imobilizirajući (tzv. *knock – down*) učinak i kukci se kroz nekoliko sati oporavljaju, a piretrin I izaziva smrt kukca (Winney 1979.).

Prinos i kvaliteta piretrina određena je prinosom suhog cvijeta po jedinici površine, sadržajem piretrina u suhoj tvari cvijeta te omjerom piretrina I i piretrina II (Parlevliet 1979.). Prema istraživanju koje su proveli Grdiša i sur. (2013.) na 25 prirodnih populacija buhača Jadranske obale i otoka, sadržaj piretrina kretao se od 0,36 % do 1,30 % suhe mase cvijeta. Prema Bakariću (2005.) divlje populacije buhača sadrže od 0,60 % do 0,79 % piretrina. Sadržaj piretrina komercijalnih vrsta u Tasmaniji je približno od 1,80 % do 2,50 % suhe mase cvijeta (Morris i sur. 2005.). Sirov ekstrakt sadrži od 30 do 35 % piretrina, u malim količinama sadrži i terpenoide kao što su: karotenoidi (0.82 %), klorofil (0.1 %) te taraksterol (5 %) (Catalano i sur. 2014.).



Slika 3.3.1. Kemijske strukture piretrina I, piretrina II, cinerina I, cinerina II, jasmolina I i jasmolina I

Koncentracija šest aktivnih sastavnica piretrina ovisi o: genotipu biljke, zemljopisnom podrijetlu, razvojnom stadiju cvata u vremenu berbe, metodi sušenja i uvjetima skladištenja (Moslemi 2017.).

3.4. Tehnologija uzgoja

3.4.1. Uvjeti uzgoja

Dalmatinski buhač preferira sunčanu i toplu klimu jer toplina i svjetlo stimuliraju sintezu piretrina, ali i ukupan broj cvatova po biljci. Bitna je zaklonjenost od vjetra, poplava i okolišnih stresova. U svom prirodnom staništu uspijeva na stjenovitim područjima. Podnosi sušna razdoblja, ali i jako niske temperature, od čak -39 ºC do - 42 ºC, ali kroz kratak vremenski period (Stepanović i sur. 2009.). Najpogodnija su mu kamenita i lagano pjeskovita tla srednje plodnosti s visokim sadržajem kalcija i dobre propusnosti za vodu, a s obzirom na snažan i razvijen korijenov sustav može se uzgajati i na najsiromašnijim tlima. Tla visoke plodnosti nisu pogodna jer uzrokuju dobar prinos zelene mase, a manji prinos piretrina. Kroll (1963.) i Wandahwa (1996.) navode kako je najveći postotak klijavosti na dubokim i dobro dreniranim tlima, ali uspijeva i na skeletnim tlima blage slanoće i blagih alkalnih pH vrijednosti. Buhač se na istoj površini može uzgajati od 8 do 12 godina, ali najveći prinos cvijeta je od 3 do 4 godine od početka uzgoja (Kolak i sur. 1999., Stepanović i sur. 2009.).

3.4.2. Plodored i priprema tla za sadnju/sjetvu

Plodored nije nužan jer buhač kao višegodišnja kultura na istom tlu raste i preko 10 godina (Stepanović i sur. 2009.), ali može postojati kao opcija. U slučaju odabira plodoreda, najbolje predkulture su one koje dobro uništavaju korove. Najpovoljnije su strne žitarice, okopavine, ugar te djetelinsko-travne smjese (Kolak i sur. 1999.). Obradu tla treba započeti plitkim oranjem krajem ljeta i početkom jeseni ili u proljeće, tanjuračom ili sjetvospremačem, ovisno o roku sadnje. Obrada tla mora biti što kvalitetnija kako bi se izravnale sve neravnine tla i kako bi presadnicama stvorili što kvalitetnije uvjete za klijanje. Nakon nicanja korova nužno je obaviti duboko oranje na dubini od 30 cm (Stepanović i sur. 2009.). Buhač dobro podnosi gnojidbu stajskim gnojem koji se unosi pod brazdu kod osnovne gnojidbe tla u količini 10-30 t/ha. Površinski sloj mora biti što dublje složen kako bi korovi koji su na površini bili što bolje uništeni (Kolak i sur. 1999.).

3.4.3. Sjetva i sadnja

Buhač se razmnožava na dva načina: vegetativno; dijeljenjem starijih busena, te generativno; sjemenom. U postupku dijeljenja busena odabiru se najkvalitetnije biljke. Obično se za ovaj postupak biraju starije biljke, u starosti od 10 do 12 godina, koje su završile eksploataciju na polju. Od jedne biljke može se dobiti od 5 do 10 presadnica, a sam postupak je najbolje provoditi u jesen ili u proljeće.

Ovakav oblik razmnožavanja koristi se rjeđe jer je postupak skup, s obzirom da se vađenje i dijeljenje busena obavljaju ručno (Stepanović i sur. 2009.).

Direktna sjetva sjemena obavlja se specijalnom sijačicom u rano proljeće na razmaku od 50 cm između redova te 25 do 50 cm unutar reda. Biljke niču od 15 do 20 dana nakon sjetve. Na 1 ha koristi se od 1 do 1,2 kg sjemena. Sklop se regulira nakon nicanja, a ovisi o genotipu biljke, tipu tla i plodnosti tla, o gnojidbi itd. (Kolak i sur. 1999.).

Ukoliko se nasad podiže presadnicama one se proizvode u toplim i hladnim klijalištima. Povoljnija je proizvodnja u hladnijim klijalištima (Stepanović i sur. 2009.). Sjetva sjemena za presadnice se odvija u veljači ili u ožujku, a presadnice se sade na polje u travnju ili početkom svibnja, ručno ili sadilicama. Za 1 m^2 klijališta potrebno je osigurati 5 g sjemena, što je od 200 do 300 presadnica (Kolak i sur. 1999.). Ako proizvodimo presadnice u hladnim klijalištima, presađivanje se obavlja u jesen. Jesenska sadnja je povoljnija jer biljke već u prvoj godini mogu dati veću količinu cvjetova. Sadnja se obavlja u listopadu ili u studenom, s prvim jesenskim kišama. Presadnice se sade u redove na razmaku od 50 do 70 cm, a razmak unutar reda je od 30 do 40 cm. Za 1 ha je potrebno 66 600 presadnica (Stepanović i sur. 2009.).

3.4.4. Njega usjeva

U prvoj godini uzgoja, izrazito je važno okopavanje, prihranjivanje i popunjavanje praznih mjesta. Okopavanje je od velike važnosti jer površinski sloj mora biti rastresit i bez korova. Ako se obavlja jesenska sjetva, okopavanje je potrebno izvršiti u proljeće. Drugo okopavanje slijedi 3 do 5 tjedana nakon prvog. Prihranjivanje buhača izvršava se jednom ili dva puta. Prvo prihranjivanje provodi se neposredno pred drugo okopavanje, a upotrebljava se od 100 do 150 kg/ha dušičnog gnojiva KAN. U jesen se obavlja periodična prihrana u kojoj se koriste kombinirana NPK gnojiva. Popunjavanje praznih mjesta se odvija početkom jeseni jer neke se biljke ne prime ili tijekom ljeta uginu. Postupak se ne odvija samo nakon presađivanja, već i u 2. i u 3. godini uzgoja (Stepanović i sur. 2009.).

3.4.5. Berba usjeva

Parlevliet (1969.) prema Bhat i Menray (1986.) navodi kako je količina prikupljenih biljaka po hektaru temelj za prinos svježe i suhe mase cvata. Smatra se da prinos svježe mase cvata ovisi o veličini cvata, svježoj masi 100 cvatova, broju cvatova po stabljici, te broju stabljika produciranih tijekom godine rasta. Cvatnja počinje krajem svibnja. Cvatovi se mogu brati već u prvoj godini, ali berba je najbolja u narednim godinama kada se razvije više cvatova po biljci.

Vrijeme berbe određeno je razvojnim stadijem cvata, a utvrđivanje optimalnog stadija od izuzetne je važnosti kako bi se postigao što veći sadržaj piretrina (Head 1973.; Potts i Menary 1987.; Ikahu i Ngugi 1989).

Cvjetovi buhača otvaraju se u fazama. Prvobitno se razmotaju latice jezičastih cvjetova te se nakon toga cjevasti cvjetovi počnu otvarati od ruba prema sredini, s otvaranjem po jedne spirale cvjetova dnevno. Kada cjevasti cvjetovi dođu do faze rascvjetalosti, oni gube boju te kreće pogodna faza za sakupljanje sjemena ako su cvjetovi bili prethodno oplođeni Sitango

(2011.). Kolak i sur. (1999.) navode da berba cvatova počinje u fazi kada se cjevasti cvjetovi počnu otvarati, a završava u fazi kada se jezičasti cvjetovi osuše, odnosno uvenu.

Prema Bakariću (2005.) najveći sadržaj piretrina je u fazi kada se otvore 2 do 3 kruga cjevastih cvjetova, a jezičasti cvjetovi su položeni horizontalno. To je faza kada je 3/4 cvjetova otvoreno, a traje samo 2 do 3 dana, stoga je važno berbu obaviti u tom periodu. U Dalmaciji, cvatne glavice tradicionalno su se brale na Sv. Antu (13. lipnja), odnosno 3. ili 4. dan od početka cvatnje.

U istraživanju Head (1966.) analizirano je sedam razvojnih stadija cvatne glavice dalmatinskog buhača. Rezultati su pokazali da se nakupljanje piretrina odvija u dvije faze; u prvoj fazi dolazi do rasta sadržaja piretrina (1. do 4. stadij), dok u drugoj stacionarnoj fazi (5. do 7 stadij) postignut sadržaj piretrina se ne mijenja. U kasnijem istraživanju istog autora (Headu, 1973.) spominje se osam različitih razvojnih stadija cvata i oni su opisani u tablici 3.4.5.1. Navodi da je sadržaj piretrina po suhoj masi cvata najviši u 4. stadiju ili između 4. i 5. stadija. Na temelju toga, Wandahwa i sur. (1996.) smatraju da je prvu berbu najbolje obaviti u 5. razvojnom stadiju kada su svi cjevasti cvjetovi otvoreni, odnosno 21. dan nakon što su svi pupoljci potpuno razvijeni.

Tablica 3.4.5.1. Razvojni stadiji cvata dalmatinskog buhača i vrijeme potrebno za razvoj prema Headu (1973.)

Razvojni stadij	***Opis razvojnog stadija***	***Broj dana***
1.	Dobro razvijeni zatvoreni pupoljci	0 dana
2.	Jezičasti cvjetovi razvijeni, stoje vertikalno	12 dana
3.	Jezičasti cvjetovi u horizontalnom položaju, prvi red cjevastih cvjetova otvoren	16 dana
4.	Približno 3 reda cjevastih cvjetova otvorena	19 dana
5.	Svi cjevasti cvjetovi otvoreni, puna zrelost	21 dan
6.	Faza rane rascvjetalosti, cjevasti cvjetovi mijenjaju boju, jezičasti nepromijenjeni	31 dan
7.	Faza kasne rascvjetalosti, gotovo potpuna promjena boje u cjevastim cvjetovima, jezičasti cvjetovi uveli	43 dana
8.	Cjevasti cvjetovi otpali, faza pogodna za sakupljanje sjemena	60 dana

Potts and Menary (1987.) su napravili preinaku razvojnih stadija koje je opisao Head (1973.). Također razlikuju osam razvojnih stadija koji su opisani u tablici 3.4.5.2.

Tablica 3.4.5.2. Razvojni stadiji cvata dalmatinskog buhača prema Potts and Menary (1987.)

Razvojni stadij	***Opis razvojnog stadija***
1.	Dobro razvijeni zatvoreni pupovi
2.	Pojava jezičastih cvjetova iz pupova
3.	1/3 jezičastih cvjetova otvorena
4.	1/3 do 2/3 reda cjevastih cvjetova otvoreno
5.	od 2/3 do potpuno otvorenih cjevastih cvjetova
6.	Svi cvjetovi otvoreni i pola cjevastih cvjetova smeđe boje
7.	Jezičasti cvjetovi suhi, cjevasti cvjetovi na cvatu, smeđe boje
8.	Cjevasti cvjetovi otpali, stabljika suha do 1 cm ispod cvata, sjeme zrelo

Ovisno o geografskom položaju i klimatskim uvjetima, postoje razlike u razdoblju i trajanju cvatnje. U Tasmaniji cvatnja buhača započinje u prosincu/siječnju. Za početak cvatnje potrebna je vernalizacija na 6 ºC u razdoblju od 2 tjedna ili 12 ºC u razdoblju od 3 tjedna, u uvjetima kratkog dana i pri dnevnoj temperaturi od 20 do 30 ºC. (Sitango 2011.). U Tasmaniji berba cvatova se provodi između razvojnog stadija 4. (1/3 do 2/3 cjevasti cvjetova otvoreno) do razvojnog stadija 6. (svi cjevasti cvjetovi otvoreni, a polovina jezičastih cvjetova je smeđe boje) (Potts i Menary, 1987.). U Keniji buhač kontinuirano proizvodi cvjetove u trajanju od 8 do 9 mjeseci. U tom razdoblju prisutne su sve faze razvoja cvijeta (Wandahwa i sur. 1996.).

Stepanović i sur. (2009.) navode kako se berba cvatova u nekim zemljama i dalje obavlja ručno. Biljka se kosi, a snopovima se na češlju ili čupaču odvaja cvat. Sušenje se obavlja u sušnicama u hladu na prozračnom mjestu, na temperaturi do 50 ºC. U modernom uzgoju buhača, berba se odvija žitnim kombajnima. Kombajn skida cvijet do peteljke, a prikupljena masa se odmah suši na temperaturi od 50 do 60 ºC. Nakon toga, obavlja se vršidba cvjetnih glavica i čišćenje od stabljike, lista i dijela cvijeta.

Osušeni cvjetovi se potom pakiraju u papirnate vrećice ili se prešaju i opšivaju jutom. Proizvod se čuva na hladnom i tamnom mjestu (Stepanović i sur. 2009.).

4. Materijali i metode

4.1. Biljni materijal

Za potrebe ovog istraživanja korišteni su sakupljeni cvatovi dviju populacija dalmatinskog buhača uzgojenih na pokusnom polju Instituta za jadranske kulture i melioraciju krša u Splitu. Sjeme dviju ispitivanih populacija dio je Kolekcije ljekovitog i aromatičnog bilja Zavoda za sjemenarstvo Agronomskog fakulteta. U tablici 4.1.1. nalaze se podaci o navedenim primkama koji su dostupni u Hrvatskoj bazi podataka o biljnim genetskim izvorima (*Croatian plant genetic resources database*).

Tablica 4.1.1. Podaci o primkama dalmatinskog buhača uključenim u istraživanje

Populacija	**P1**	**P2**
Lokacija	Senj – Sv. Juraj	Biokovo – Kotiški Stanovi
Broj primke	MAP02799	MAP02809
Zemljopisna širina	44º 55' 20“N	48º18'17“N
Zemljopisna dužina	14º 55' 00“E	17º4'13“E
Nadmorska visina	6 m	1295 m

Izvor: Croatian plant genetic resources database (cprgd) https://cpgrd.hapih.hr/ - pristup: 28.03.2020.

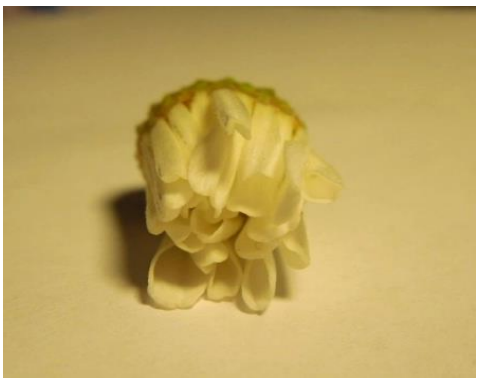
Cvatovi dviju prirodnih populacija dalmatinskog buhača uzorkovani su u 7 različitih razvojnih stadija. Razvojni stadiji opisani su u Tablici 4.1.2. te prikazani Slikama 4.1.1. – 4.1.7.

Tablica 4.1.2. Uzorkovani razvojni stadiji dalmatinskog buhača

Razvojni stadij	**Oznaka razvojnog stadija**	**Opis razvojnog stadija**
1. razvojni stadij	RS 1	Neotvoreni pupovi (nazire se vrh jezičastih cvjetova)
2. razvojni stadij	RS 2	Jezičasti cvjetovi razvijeni, stoje vertikalno
3. razvojni stadij	RS 3	Jezičasti cvjetovi razvijeni, počinju se nazirati cjevasti cvjetovi
4. razvojni stadij	RS 4	Jezičasti cvjetovi u horizontalnom položaju, 0 – 20 % cjevastih cvjetova otvoreno
5. razvojni stadij	RS 5	20 – 70 % cjevastih cvjetova otvoreno
6. razvojni stadij	RS 6	70 – 80 % cjevastih cvjetova otvoreno
7. razvojni stadij	RS 7	100 % cjevastih cvjetova otvoreno, promjena boje



Slika 4.1.1. RS 1



Slika 4.1.2. RS 2



Slika 4.1.3. RS 3



Slika 4.1.4. RS 4



Slika 4.1.5. RS 5



Slika 4.1.6. RS 6

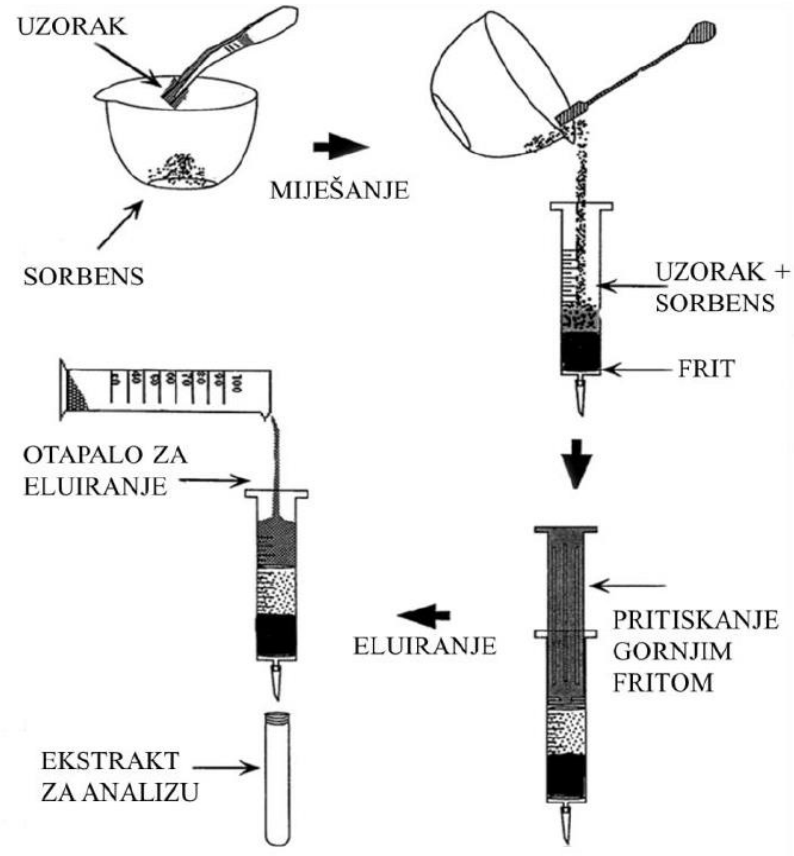


Slika 4.1.7. RS 7

Autor: M. Grdiša 2020.

4.2. Ekstrakcija piretrina disperzijom matrice u čvrstoj fazi (MSPD)

Disperzija matrice u čvrstoj fazi (eng. *Matrix Solid Phase Dispersion,* MSPD) je analitički postupak za pripremu, ekstrakciju i frakcioniranje čvrstih, polučvrstih i visoko viskoznih bioloških uzoraka (Barker 2007.). Temelji se na nekoliko jednostavnih principa kemije i fizike, uključujući sile koje se primjenjuju na uzorak mehaničkim miješanjem i interakcije matrice uzorka s čvrstom podlogom vezane faze (SPE). Tehnika je primjenjiva na različitim tipovima uzoraka biološkog podrijetla (životinjska tkiva, biljni materijal, masti itd.) (Moidoveanu i David 2002.). Temeljni korak u MSPD ekstrakciji je miješanje male količine ispitivanog uzroka s većom količinom čvrstog ili praškastog sorbensa koji djeluje kao abrazivno sredstvo (omjer 1:2 ili 1:4) (Barker 2007., Chen i sur. 2008.). Najčešće korišteni sorbensi su: organski sorbensi (grafitna vlakna), anorganski sorbensi (florisil i aluminijev dioksid), te vezani silikagel (C_{18} ili C_8) (Dassanayake i sur. 2009.). Miješanjem uzorka i sorbensa dolazi do raspršivanja uzorka te povećanja površine na kojoj se odvija ekstrakcija. Takva jednolična smjesa stavlja se u MSPD kolone koje se ispiru s odgovarajućim otapalom. Na dno kolone postavlja se jedan frit, a drugi frit postavlja se na uzorak pažljivim tlačenjem pomoću klipa šprice (Kristenson i sur. 2006.). Sve nečistoće se zadržavaju na sorbensu čime dolazi do istovremene ekstrakcije i pročišćavanja uzorka. Na slici 4.2.1. prikazani su osnovni koraci u MSPD ekstrakciji.



Slika 4.2.1. Osnovni koraci u MSPD ekstrakciji
Izvor: Barker (2007.)

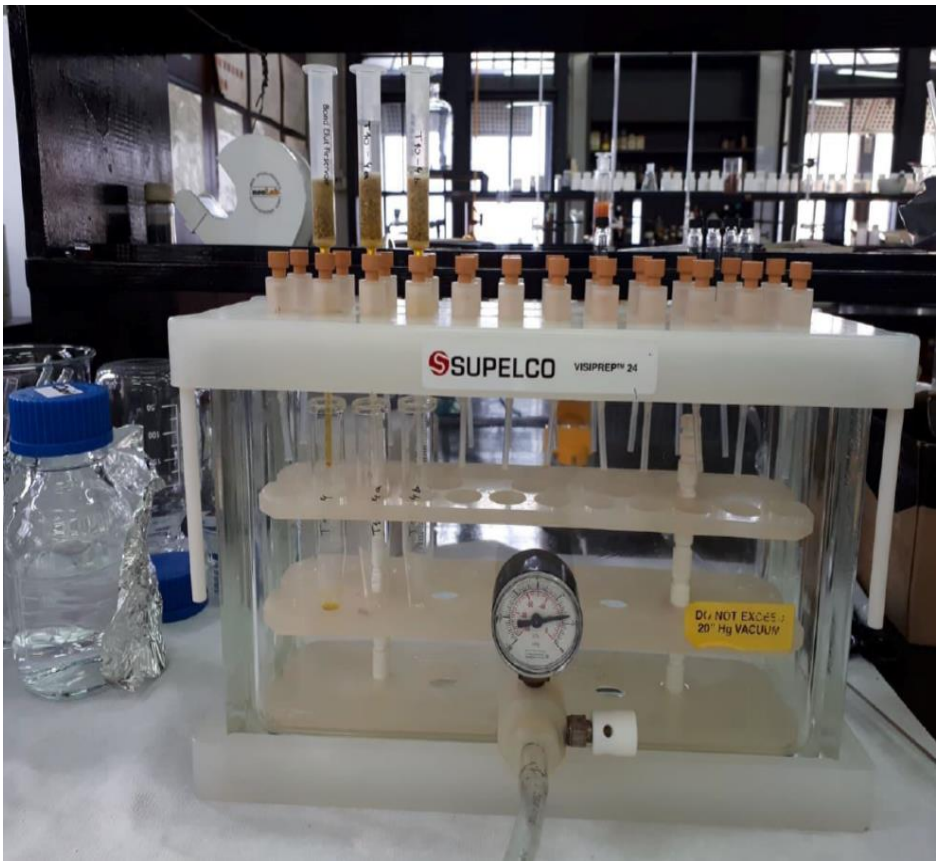
Osušene cvatne glavice su mehanički usitnjene u aparatu za usitnjavanje Microton MB 550 (KINEMATICA AG, Luzern, Švicarska) (slika 3.5.2.). Koristeći analitičku vagu (Mettler Toledo AB104) (slika 3.5.3.) izvagano je 0,25 g cvatnih glavica, 0,5 g florisila, te 0,4 g natrijevog sulfata. Florisil koji je korišten kao sorbens, aktiviran je na 160 °C, te je nakon toga ispran *n*-heksanom i metanolom prije korištenja. Bezvodni natrijev sulfat (Na_2SO_4) korišten je kao sredstvo za dehidraciju. Reakcijska smjesa cvatnih glavica, florisila, te natrijevog sulfata pomiješana je u tarioniku koristeći tučak kako bi došlo do disperzije uzorka. Nakon toga, smjesa je kvantitativno prenesena u polipropilensku praznu kolonu na čije je dno prethodno stavljen frit, dok je drugi frit stavljen iznad smjese kako bi se spriječilo prebrzo isparavanje otapala. Ekstrakcija piretrina provedena je koristeći aparaturu za ekstrakciju VisiprepTM 24, Supelco (slika 3.5.4.) s protokom prilagođenim na 1 mL min-1. U pripremljene kolone dodan je 1 mL smjese acetona i etil-acetata (1:1) koji služi za eluiranje piretrina. Otapalo je ostavljeno u koloni 5 minuta kako bi se smjesa sorbensa i uzorka natopila. Nakon navedenih 5 minuta, kroz kolonu je propušten i preostali volumen otapala. Ekstrakt (5 mL) je prikupljan u kivetu, uparavan do suhog na 40 °C i otopljen u smjesi acetonitril-voda, a potom je prenesen u viale.



Slika 4.2.2. Aparat za usitnjavanje Microtron MB 550



Slika 4.2.3. Analitička vaga



Slika 4.2.4. Aparatura za ekstrakciju VisiprepTM 24, Supelco

4.3. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)

Ekstrakti dobiveni nakon postupka disperzije matrice u čvrstoj fazi, čuvani su na hladnom i tamnom mjestu do analize. Identifikacija i kvantifikacija sastavnica piretrina provedena je pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti s detektorom s nizom dioda (HPLC - DAD, engl. *High Performance Liquid Chromatography – Diode Array Detector*) na Varian ProStar 500 HPLC sustavu (Slika 4.3.1.), koji se sastoji od automatskog uzorkivača ProStar 410, tercijarne pumpe Prostar 230, te detektora ProStar 330. Za razdvajanje sastavnica piretrina korištena je kolona Luna C18. Analiza je provedena korištenjem 0,1 % mravlje kiseline u MilliQ vodi kao pokretne faze A te korištenjem 0,1 % mravlje kiseline u acetonitrilu kao pokretne faze B. Eluiranje je započelo sa 40 % pokretne faze A u rasponu od 15 minuta. Sljedećih 10 minuta sastav pokretne faze A se mijenjao do 20 % i zadržao izokratski 20 minuta. Tijekom sljedećih 5 minuta sastav se vratio u prvotno stanje. Protok je iznosio 1,4 ml/min[1.] Razdvajanje sastavnica piretrina je praćeno pomoću absorbancije na valnoj duljini 225 nm. Kalibracijske krivulje za svaku piretrinsku sastavnicu napravljene su na temelju 8 radnih otopina standarda. Svaki uzorak je injektiran tri puta, te je napravljen graf omjera površine pika analita i unutarnjeg standarda za svaku sastavnicu. Kromatogrami su snimljeni pomoću računalnog programa Varian ProStar 360 Star Cromatography Workstation. Za svaki uzorak očitano je vrijeme zadržavanja i površina ispod kromatografske krivulje.



Slika 4.3.1. Varian ProStar 500 HPLC sustav s detektorom s nizom dioda

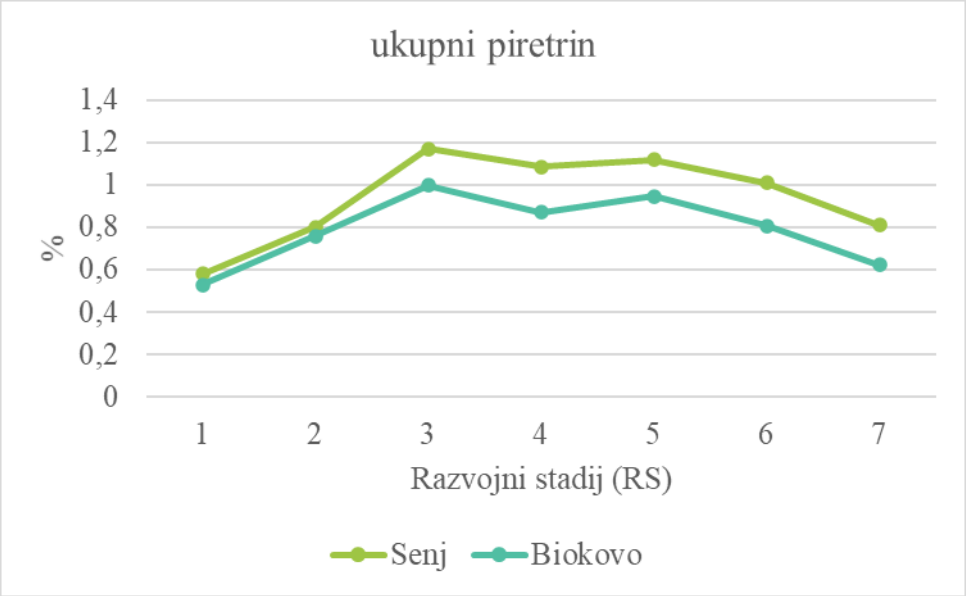
4.4. Statistička obrada podataka

Provedena je jednosmjerna analiza varijance svih šest sastavnica piretrina, ukupnog sadržaja piretrina kao i omjera piretrina I i II kroz svih sedam razvojnih stadija. Prosječne vrijednosti sastavnica piretrina, ukupnog sadržaja piretrina te omjera piretrina I i piretrina II uspoređene su pomoću Tukeyjevog *post hoc* testa. Sve analize provedene su pomoću statističkog alata SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC).

5. Rezultati i rasprava

U uzorcima cvata uzorkovanih u različitim razvojnim stadijima utvrđen je sadržaj svih šest sastavnica piretrina, sadržaj ukupnih piretrina, kao i omjer piretrina I i piretrina II. Ukupni sadržaj piretrina (% po masi suhog cvata) u analiziranim razvojnim stadijima cvata prikazan je na Grafikonu 5.1.

Kao što je prethodno navedeno, na sadržaj piretrina uvelike utječu vrijeme berbe, genotip, zemljopisno podrijetlo i klima, uvjeti skladištenja (Zieg i sur. 1983.), te metode sušenja buhača (Morris i sur. 2006.). Vrijeme berbe je jedan od značajnijih čimbenika jer je određeno razvojnim stadijem cvatova (Gnadinger i Corl 1930.).

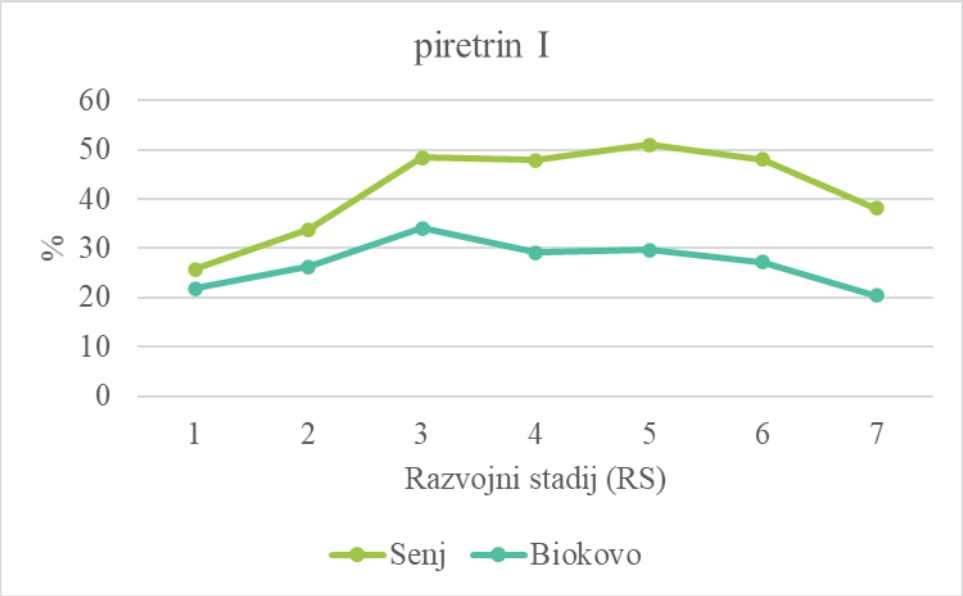


Grafikon 5.1. Ukupni sadržaj piretrina (% po masi suhog cvata) u analiziranim razvojnim stadijima cvata dalmatinskog buhača kod populacija Senj i Biokovo

Ukupni sadržaj piretrina (% po masi suhog cvata) mijenjao se ovisno o razvojnom stadiju cvata (RS). Najniži sadržaj piretrina kod obje populacije utvrđen je u RS 1; kod populacije Biokovo iznosio je 0,53 % po masi suhog cvata, dok je kod populacije Senj utvrđen nešto viši sadržaj od 0,58 %. Kod obje populacije sadržaj se postepeno povećavao od RS 1 do RS 2 (za 38 % kod populacije Senj; za 44 % kod populacije Biokovo), kao i od RS 2 do RS 3 (za 46 % kod populacije Senj; za 31 % kod populacije Biokovo). U RS 3, koji podrazumijeva fazu u kojoj su jezičasti cvjetovi razvijeni i počinju se nazirati cjevasti cvjetovi, utvrđen je i najviši ukupni sadržaj piretrina.

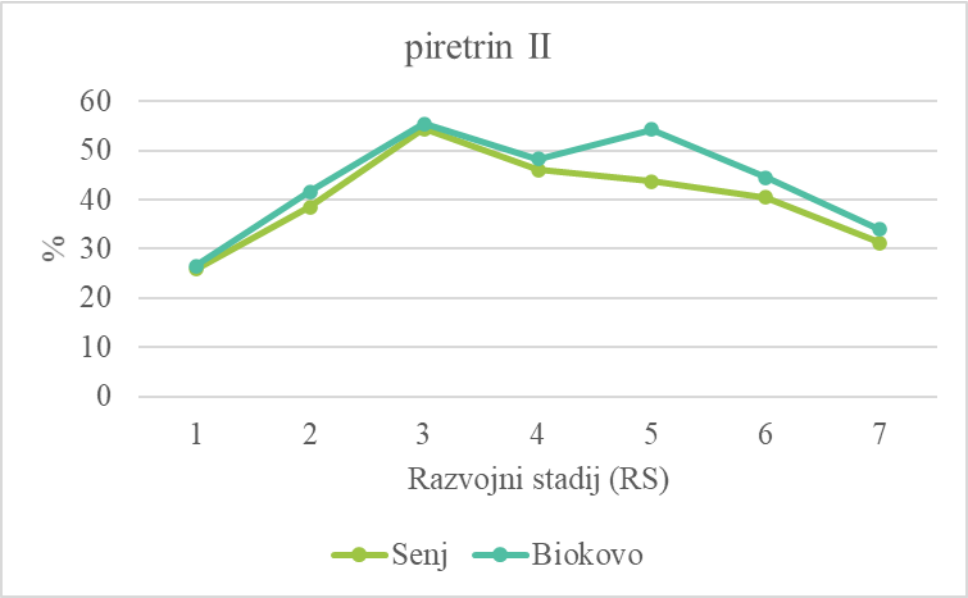
Kod populacije Biokovo u RS 3 sadržaj ukupnih piretrina iznosio je 0,99 % po masi suhog cvata, dok je kod populacije Senj iznosio 1,17 % po masi suhog cvata. U RS 4 utvrđeno je smanjenje sadržaja ukupnih piretrina kod obje populacije, i u ovom stadiju iznosio je 0,87 % po masi suhog cvata kod populacije Biokovo i 1,08 % po masi suhog cvata kod populacije Senj, da bi u RS5 nanovo bio utvrđen viši ukupni sadržaj piretrina, odnosno 0,95 % po masi suhog

cvata kod populacije Biokovo i 1,12 % po masi suhog cvata kod populacije Senj. Od RS 5 do RS 7 utvrđeno je postupno smanjenje sadržaja ukupnih piretrina. Prema Headu (1966.) koncentracija piretrina raste od stadija zatvorenih pupoljaka pa sve do stadija 4. kada su tri reda cjevastih cvjetova otvorena. Prema Potts-u i Menary-u (1987.) u Tasmaniji optimalno vrijeme berbe je između RS 4 i RS 6, odnosno od stadija kada je 1/3 do 2/3 cjevastih cvjetova otvoreno, pa do stadija kada su svi cjevasti cvjetovi otvoreni i poprimaju smeđu boju.



Grafikon 5.2. Udio piretrina I (% ukupnih piretrina) u analiziranim razvojnim stadijima kod populacije Senj i Biokovo

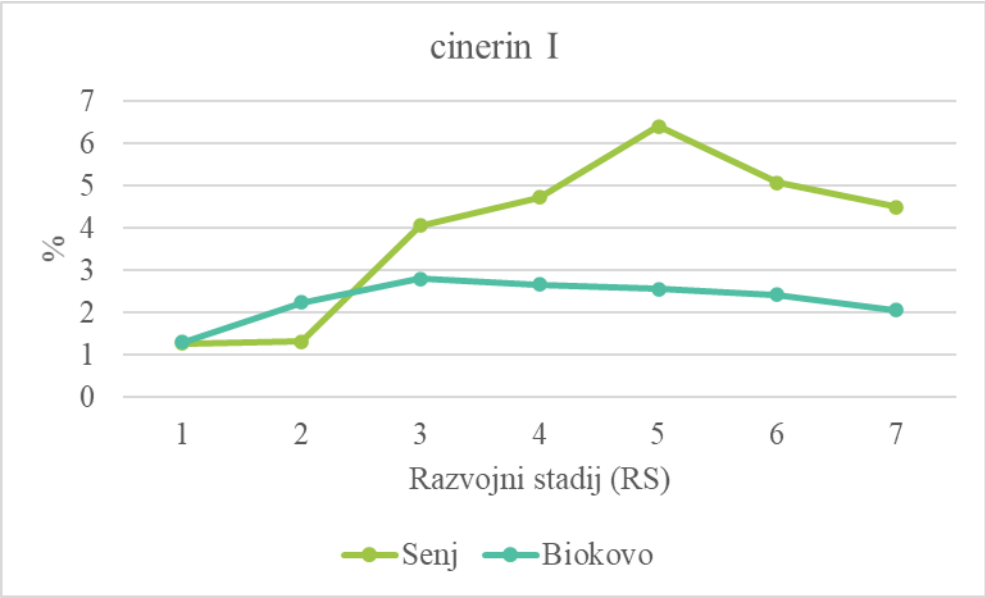
Udio piretrina I u ukupnom sadržaju piretrina postepeno se povećavao od RS 1 do RS 3 kod obje analizirane populacije (Grafikon 5.2.). Kod populacije Senj od RS 1 do RS 2 utvrđen je porast piretrina I za 32 %, a od RS 2 do RS 3 za 43 %. Kod populacije Biokovo između RS 1 i RS 2 utvrđen je porast za 21 %, dok je između RS 2 i RS 3 utvrđen porast za 29 %. Udio piretrina I u RS 3 iznosio je 48.35 % ukupnih piretrina kod populacije Senj, dok je kod populacije Biokovo iznosio 34,06 % ukupnih piretrina. Prema kasnijim stadijima razvoja kod populacije Biokovo udio piretrina I se postepeno smanjivao, dok je kod populacije Senj u RS 5 utvrđen porast udjela piretrina I na 50,99 % te potom smanjenje prema kasnijim razvojnim stadijima.



Grafikon 5.3. Udio piretrina II (% ukupnih piretrina) u analiziranim razvojnim stadijima kod populacije Senj i Biokovo

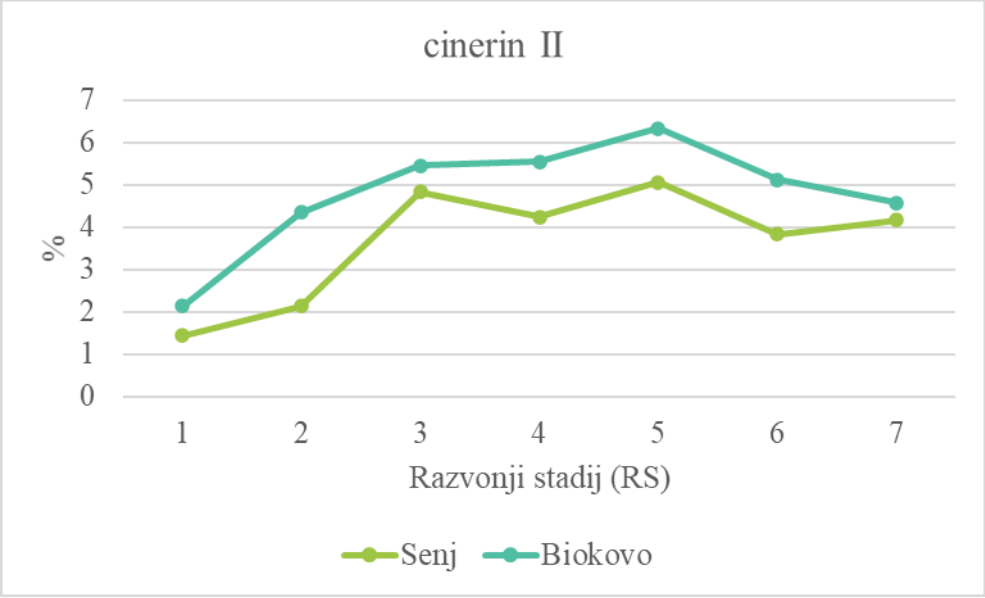
Na Grafikonu 5.3. primjećen je isti trend udjela piretrina II kao i kod piretrina I, odnosno kod obje populacije zamijećen je rast udjela od RS 1 do RS 3. Kod populacije Senj od RS 1 do RS 2 utvrđen je porast sadržaja piretrina II za 48 %, dok je od RS 2 do RS 3 sadržaj porastao za 41 %. Kod populacije Biokovo zabilježen je porast sadržaja piretrina II za 57 % od RS 1 do RS 2, a od RS2 do RS3 za 33 %. Kod obje populacije najviši sadržaj piretrina II utvrđen je u RS 3, i kod populacije Biokovo iznosio je 55,37 % ukupnih piretrina, a kod populacije Senj 54,33 % ukupnih piretrina. Kod populacije Senj, udio piretrina II postepeno se smanjivao prema kasnijim razvojnim stadijima, dok je kod populacije Biokovo utvrđen novi porast sadržaja piretrina II između RS 4 i RS 5, međutim utvrđen je manji sadržaj od onog u RS 3. Od RS 5 do RS 7 utvrđeno je postepeno smanjenje sadržaja piretrina II kod obje populacije.

Piretrin I i II su najzastupljenije sastavnice u piretrinskom ekstraktu. Postoji značajna razlika u njihovom djelovanju na štetne kukce. Piretrin I ima smrtonosan učinak, veću insekticidnu aktivnost i djeluje nakon nekoliko minuta, dok je piretrin II povezan s bržim *knock down* učinkom (Sawicki i Thain 1962), ali štetnici ga brzo razgrade. Međutim, kombinacija piretrina I i piretrina II ima izvanredan učinak na veliki broj štetnih kukaca (Casida i Quistad 1995.).



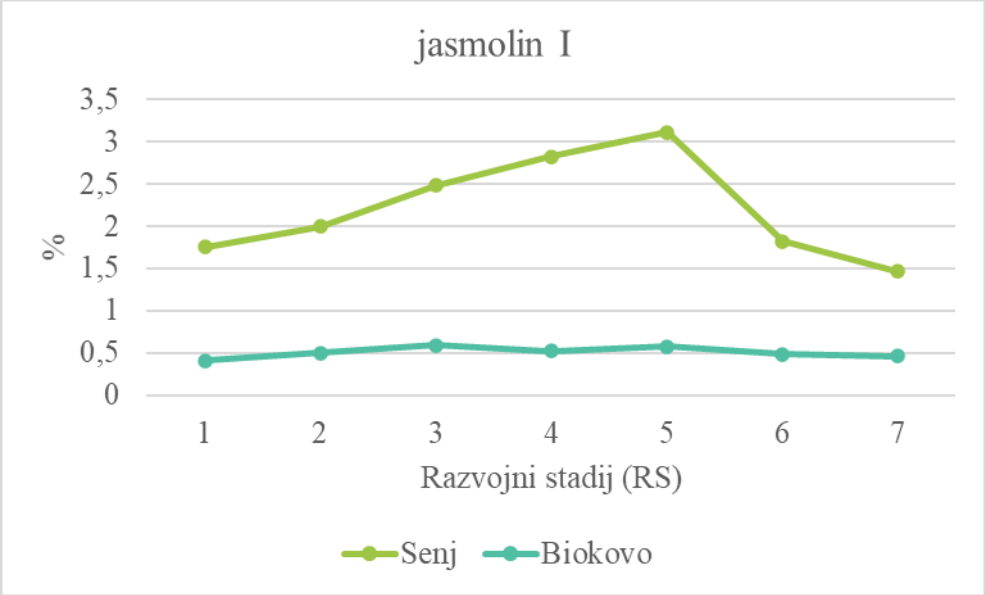
Grafikon 5.4. Udio cinerina I (% ukupnih piretrina) u analiziranim razvojnim stadijima kod populacije Senj i Biokovo

Iz Grafikona 5.4. vidljivo je da se kod populacije Senj, sadržaj cinerina I postepeno povećavao od RS 1 do RS 5. Najveći porast sadržaja cinerina I zabilježen je od RS 2 do RS 3 (za 209 %) i u RS 3 iznosi 4,05%. U RS 5 zabilježen je najviši sadržaj cinerina I (6,41%). Kod populacije Biokovo sadržaj cinerina I se također postepeno povećavao od 1,30 % ukupnih piretrina u RS 1 do 2,08 % ukupnih piretrina u RS 3. Od RS 3 sadržaj cinerina I se postupno smanjivao prema kasnijim razvojnim stadijima.



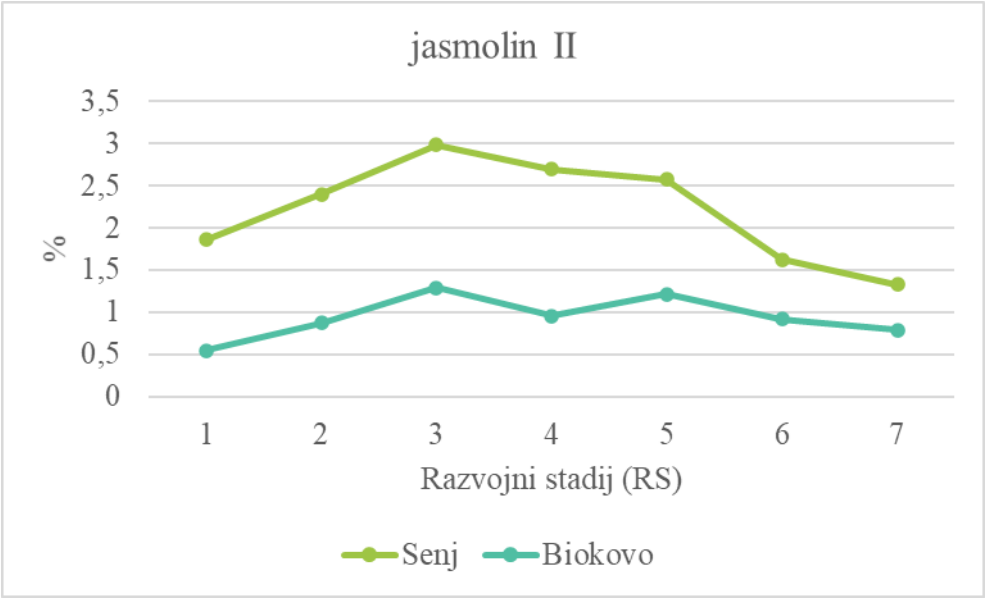
Grafikon 5.5. Udio cinerina II (% ukupnih piretrina) u analiziranim razvojnim stadijima kod populacija Senj i Biokovo

Udio cinerina II se kod populacije Senj postepeno povećavao do RS 3, nakon čega je uslijedio pad u RS 4, te opet porast u RS 5 kada je utvrđen i najviši sadržaj od 5,07 % ukupnih piretrina (Grafikon 5.5.). Sličan trend zabilježen je i kod populacije Biokovo, odnosno, sadržaj cinerina II postepeno se povećavao prema kasnijim razvojnim stadijima, a najveći udio utvrđen je u RS 5, kao i kod populacije Senj, i iznosio je 6,34 %.



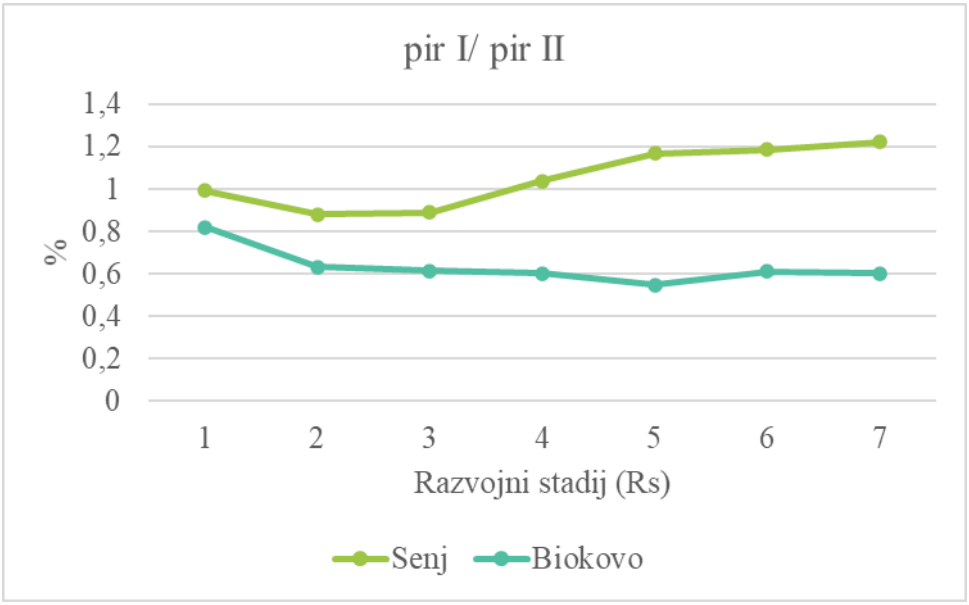
Grafikon 5.6. Udio jasmolina I (% ukupnih piretrina) u analiziranim razvojnim stadijima kod populacija Senj i Biokovo

Na grafikonu 5.6. vidljivo je da se kod populacije Senj sadržaj jasmolina I postepeno povećavao od RS 1 do RS 5, u kojem je utvrđen i najveći sadržaj od 3,11 % ukupnih piretrina. Kod populacije Biokovo sadržaj jasmolina I se povećavao do RS 3 u kojem je iznosio 0,59 % ukupnih piretrina. Od RS 3 do RS 4 utvrđen je neznatno smanjenje udjela (za 12 %), da bi u RS 5 porastao za 11% u odnosu za prethodni stadij i iznosio 0,57 %. Kod obje populacije sadržaj jasmolina II se postepeno povećavao od RS 1 do RS 3. U RS 3 je utvrđen i najviši sadržaj jasmolina II kod obje populacije, odnosno 2,98 % kod populacije Senj i 1,29 % kod populacije Biokovo (Grafikon 5.7.).



Grafikon 5.7. Udio jasmolina II (% ukupnih piretrina) u analiziranim razvojnim stadijima kod populacija Senj i Biokovo

U svim razvojnim stadijama kod obje populacije praćen je i omjer pir I/pir II s obzirom da taj parametar određuje kvalitetu piretrinskog ekstrakta te se povećanjem omjera povećava i insekticidna aktivnost ekstrakta (Winney 1979.).

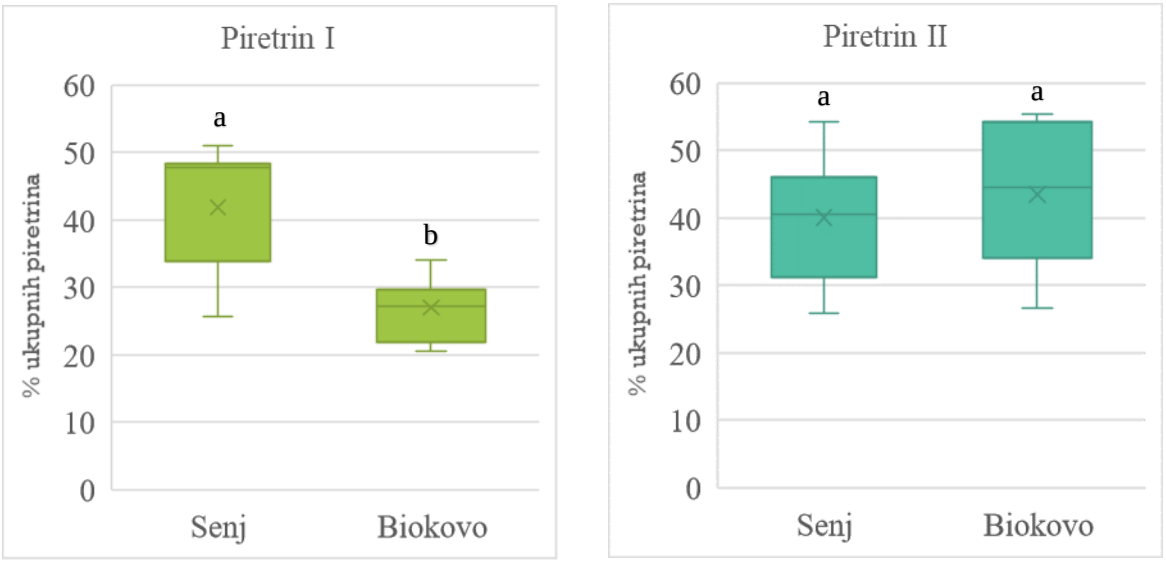


Grafikon 5.8. Omjer piretrina I i piretrina II u analiziranim razvojnim stadijima cvata dalmatinskog buhača kod populacija Senj i Biokovo

Kod populacije Senj u svim razvojnim stadijima utvrđen je viši omjer pir I/ pir II u odnosu na populaciju Biokovo (Grafikon 5.8.). Na temelju navedenog, pretpostavka je da populacija Senj ima veću insekticidnu aktivnost (Winney 1979.).

Grafikon 5. 8. prikazuje kretanje omjera piretrina I i II kroz analizirane razvojne stadije. Omjer pir I/ pir II u RS 1 iznosio je 0,99 kod populacije Senj, a 0,82 kod populacije Biokovo. U RS 2 utvrđeno je smanjenje omjera za 11 % kod populacije Senj i za 23 % kod populacije Biokovo, što je rezultat rasta sadržaja piretrina II u ovom stadiju. Kod populacije Biokovo neznatno povećanje omjera utvrđeno je u RS 6 (za 12 % u odnosu na RS 5), međutim, utvrđen je manji omjer nego u RS 1. Kod populacije Senj omjer pir I/ pir II je kontinuirao rastao od RS 3 do RS 7 u kojem je utvrđen omjer od 1,22 zbog relativno visokog sadržaja piretrina I i niskog sadržaja piretrina II, što je vidljivo iz Grafikona 5.3. i 5.4.

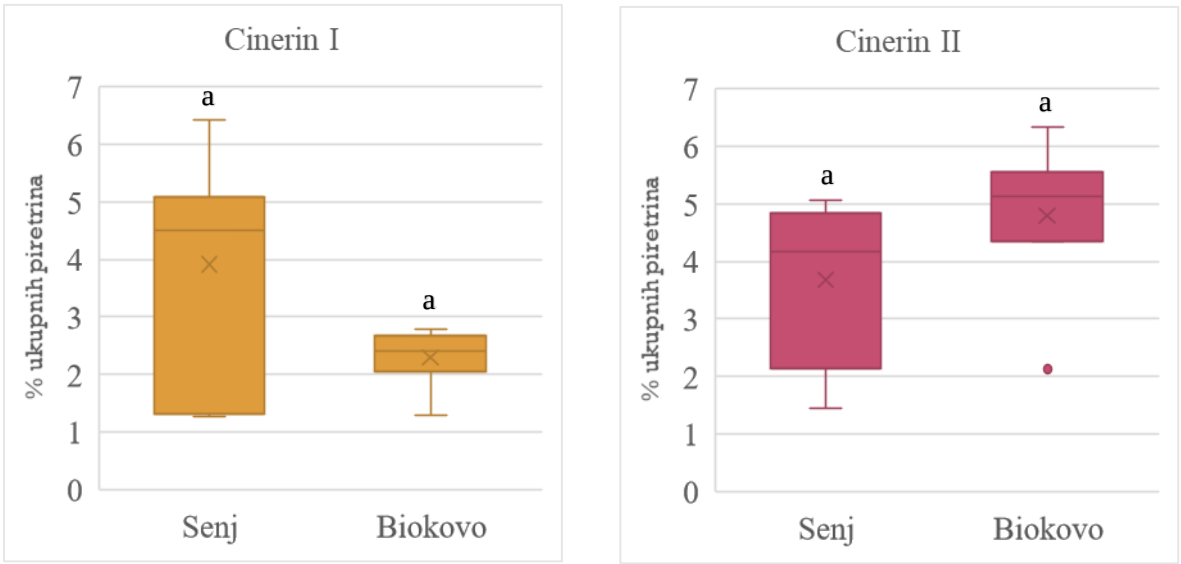
Analizom varijance utvrđene su značajne razlike u sadržaju piretrina I, jasmolina I i II, te omjera pirI/ pir II između populacija Senj i Biokovo što je potvrđeno Tukeyjevim *post hoc* testom.



*Populacije označene istim slovom ne razlikuju se značajno na razini $P<0.05$

Grafikon 5.9. Udio piretrina I i II (% ukupnih piretrina) u istraživanim populacijama

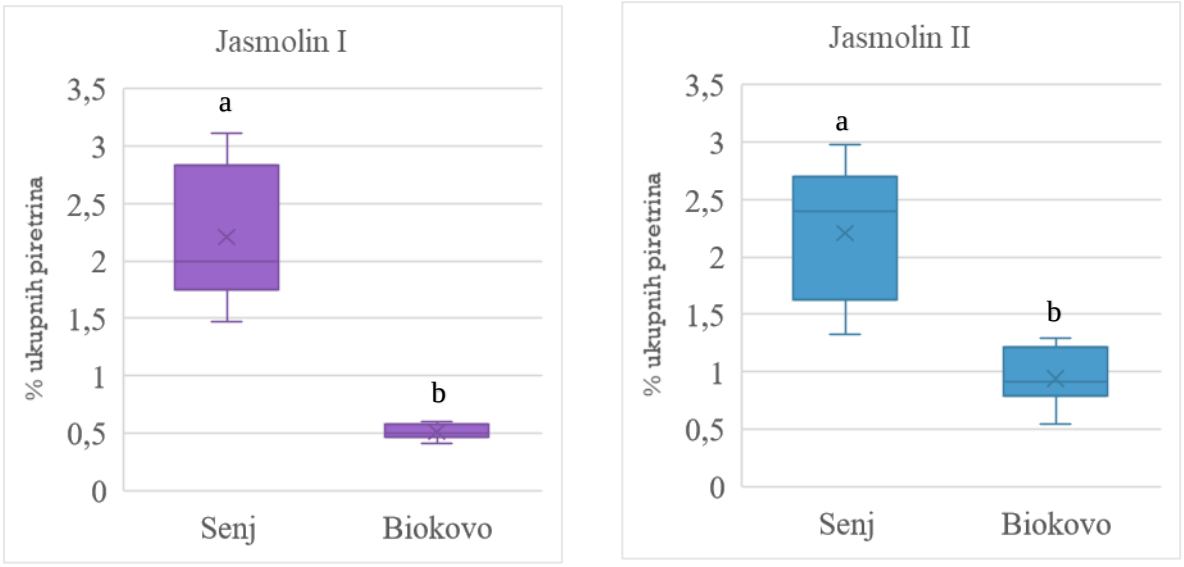
Prosječna vrijednost piretrina I za analizirane razvojne faze kod populacije Senj iznosila je 44,64 % ukupnih piretrina, a kod populacije Biokovo je ona bila nešto manja i iznosila je 34,50 % ukupnih piretrina. Kod populacije Senj vrijednosti sadržaja piretrina I kretale su se od 41,32 % do 47,62 % ukupnih piretrina, dok se kod populacije Biokovo sadržaj piretrina I kretao od 31,37% do 41,34 % ukupnih piretrina (Grafikon 5.9.). Prosječna vrijednosti piretrina II kod populacije Senj iznosila je 42,77 % ukupnih piretrina. Prosječna vrijednost piretrina II kod populacije Biokovo iznosila je 54,76 % ukupnih piretrina.



*Populacije označene istim slovom ne razlikuju se značajno na razini $P<0.05$

Grafikon 5.10. Udio cinerina I i II (% ukupnih piretrina) u istraživanim populacijama

Prosječna vrijednost cinerina I kod populacije Senj iznosila je 4,00 % ukupnih piretrina, a kod populacije Biokovo 2,90 % ukupnih piretrina (Grafikon 5.10.) Prosječna vrijednosti cinerina II kod populacije Senj iznosila je 3,81 % ukupnih piretrina, dok je kod populacije Biokovo iznosila 6,00 % ukupnih piretrina, što je 2,19 % više nego kod populacije Senj.

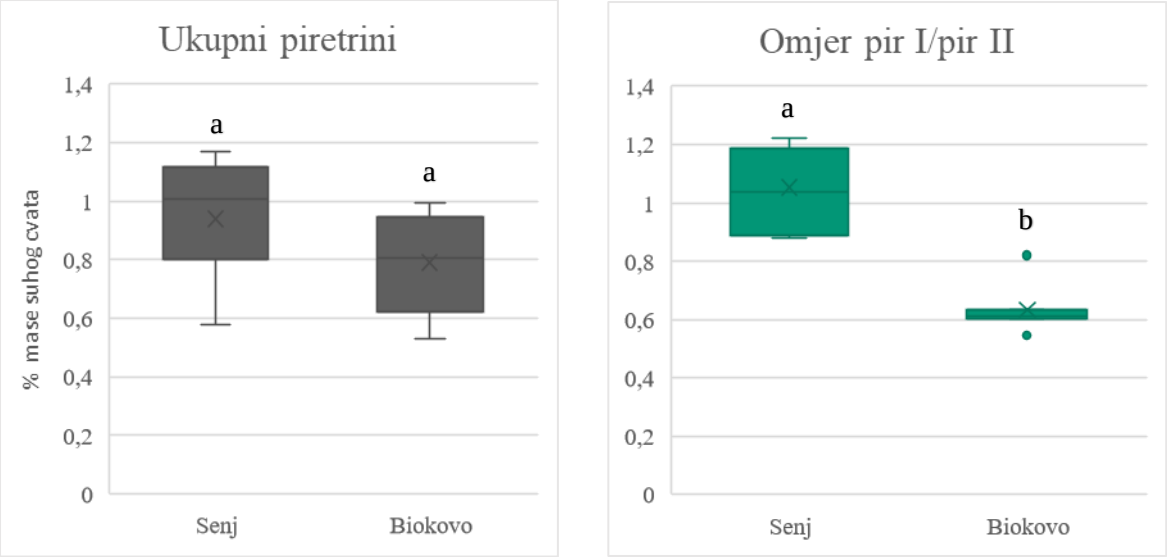


*Populacije označene istim slovom ne razlikuju se značajno na razini $P<0.05$

Grafikon 5.11. Udio jasmolina I i II (% ukupnih piretrina) u istraživanim populacijama

Sadržaj jasmolina I kod populacije Senj iznosio je 2,38 % ukupnih piretrina, a kod populacije Biokovo 0,66 % ukupnih piretrina. Značajno veći sadržaj jasmolina I utvrđen je kod populacije Senj, kod koje se u analiziranim razvojnim stadijima sadržaj jasmolina kretao od 1,81 % do 3,02 % ukupnih piretrina (Grafikon 5.11.).

Prosječna vrijednost jasmolina II kod populacije Senj iznosila je 2,40 % ukupnih piretrina, a kod populacije Biokovo 1,18 % ukupnih piretrina. Kao i kod jasmolina I, značajno više vrijednosti u sadržaju jasmolina II utvrđene su kod populacije Senj, a kretale su se od 1,61 % do 3,20 % ukupnih piretrina.



* Populacije označene istim slovom ne razlikuju se značajno na razini $P<0.05$

Grafikon 5.12. Sadržaj ukupnog piretrina (% mase suhog cvata) i omjer piretrina I i II u istraživanim populacijama

Iz Grafikona 5.12. vidljivo je da je prosječna vrijednost ukupnog sadržaja piretrina kod populacije Senj iznosila 0,94 % po masi suhog cvata, a kod populacije Biokovo nešto manje; 0,79 %. Kod populacije Senj prosječna vrijednost omjera pir I /pir II iznosila je 1,05, dok je kod populacije Biokovo ona bila znatno manja i iznosila je 0,63.

Dobiveni rezultati upućuju na povećanu insekticidnu vrijednost piretrinskog ekstrakta populacije Senj u odnosu na populaciju Biokovo.

6. Zaključak

Na temelju dobivenih rezultata doneseni su slijedeći zaključci:

1. Najniži sadržaj piretrina kod obje populacije utvrđen je u RS 1; kod populacije Biokovo iznosio je 0,53 % po masi suhog cvata, dok je kod populacije Senj iznosio 0,58 %.

2. U RS 3 utvrđen je najviši ukupni sadržaj piretrina; kod populacije Biokovo iznosio je 0,99 % po masi suhog cvata, dok je kod populacije Senj iznosio 1,17 % po masi suhog cvata. S obzirom na najviši ukupni sadržaj piretrina, optimalno vrijeme za berbu cvjetnih glavica je RS 3. Od RS 5 do RS 7 utvrđeno je postupno smanjenje sadržaja ukupnih piretrina kod obje populacije.

3. Kod populacije Senj u svim razvojnim stadijima utvrđen je viši omjer pir I/pir II u odnosu na populaciju Biokovo, što znači da populacija Senj ima kvalitetniji piretrinski sastav. U RS 2 dolazi do smanjenja omjera pir I/ pir II (smanjenje insekticidne aktivnosti), što je rezultat rasta sadržaj piretrina II u ovom stadiju. Kod populacije Senj omjer pir I/ pir II kontinuirano je rastao do RS 7, što je rezultat relativno visokog sadržaja piretrina I i niskog sadržaja piretrina II.

4. Utvrđene su značajne razlike između populacija Senj i Biokovo. Populacija Senj bilježi više prosječne vrijednosti sadržaja piretrina I, jasmolina I i jasmolina II, te omjer piretrina I i piretrina II.

5. Kod populacije Senj utvrđen je viši sadržaj ukupnih piretrina po masi suhog cvata (0,94 %) u odnosu na populaciju Biokovo kod koje je utvrđeno 0,79 % ukupnih piretrina.

7. Popis literature

1. Babić S., Grdiša M., Periša M., Ašperger D., Šatović Z., Kaštelan-Macan M. (2012). Ultrasound-assisted extraction of pyrethrins from pyrethrum flowers. Agrohimica. 56 (4-5) 193 – 206
2. Bakarić P. (2005). Buhač-prirodni insekticid. Gospodarski list. 17: 41 – 45
3. Barker S.A. (2007). Matrix solid phase dispersion (MSPD) – a review. J. Biochem. Biophys. Methods. 70: 151 – 162
4. Benić Penava M. (2012). Proizvodnja buhača u Dubrovačkom kotaru između dva svjetska rata. Ekonomska i ekohistorija. 9 (8): 108 – 115
5. Bhat B. K. (1995). Breeding Methodologies Applicable to Pyrethrum. In: Pyrethrum Flowers: Production, Chemistry, Toxicology and Uses (JE Casida, GB Quistad, eds) Oxford University Press, New York. 67 – 94
6. Bhat B. K., Menary R.C. (1986). Genotypic and Phenotypic correlation in Pyrethrum, (*Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis), and their implication in selection. Pyrethrum post. 16 (2): 61 – 65
7. Brewer J. G. (1974). Incompatibility relationship in pyrethrum (*Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis.). Euphytica. 23: 45-47
8. Catalano C. (2010). Indagini preliminari sulle potenzialita produttive del piretro (*Chryanthemum cinerariaefolium* L.) in ambiente mediterraneo. Universita degli Studi di Palermo, Palermo.
9. Catalano C., Abbate L., Fatta del Bosco S., Motisi A., Carrubba A. (2014). Micropropagation and In Vitro Culture of Pyrethrum [*Chrysanthemum cinerariifolium* (Trev.) Vis.]. Natural Products: Research Reviews. 2: 189 – 212
10. Casida J. E., Quistad G. B. (1995). Pyrethrum flowers: Production, Chemistry, Toxicology, and Uses. Oxford University Press, New York
11. Chen Y., Guo Z., Wang X., Qiu C. (2008). Sample preparation. J. Chromatogr. 1184: 191 – 219
12. Dassanayake R. M., Wei H., Chen R., Li A. (2009). Optimization of the Matrix solid Phase Dispersion Extraction Procedure for the Analysis of Polybrominated Diphenyl Ethersin Human Placenta. Anal Chem. 81 (23): 9795 – 9801
13. Cochran, D. G. 1995. Insect resistance to pyrethrins and pyrethroids, pp. 234 - 238. U J. E. Casida and G. B. Quistad (ur.), Pyrethrum flowers: production, chemistry, toxicology and uses. Oxford University Press, Oxford, United Kingdom.
14. Elliot M. (1969). Structural requirements for pyrethrum-like activity. Chemistry and Industry. 776 – 781
15. Faber H. (1980). Optimum harvest trial. CIG Pyrethrum, Hobart.
16. Glynne-Jones A. (2001). Pyrethrum. Outlook Biopestic. 195 – 198
17. Gnadinger C. B., Corl C. S. (1930). Studies on pyrethrum flowers II: The relation between maturity and pyrethrin content. J Am Chem Soc. 52 (2): 680 – 684
18. Grdiša M., Babić S., Periša M., Carović-Stanko K., Kolak I., Liber Z., Jug-Dujaković M., Satović Z. (2013). Chemical Diversity of the Natural Populations of Dalmatian Pyrethrum (*Tanacetum cinerariifolium* (Trevir.) Sch. Bip.) in Croatia. Chemistry & Biodiversty. 10 (3): 460 – 472

19. Grdiša M., Carović-Stanko K., Kolak I., Šatović Z. (2009). Morphological and Biochemical Diversity of Dalmatian Pyrethrum (*Tanacetum cinerariifolium* (Trevir.) Sch.Bip.). Agriculturae Conspectus Scientificus. 74 (2): 73 – 80
20. Gunasekara A.S. (2004). Environmental Fate of Pyrethrins. Environmental Monitoring Branch, Department of Pesticide Regulation, Sacramento, CA.
21. Head S. W. (1966). A study of the insecticidal constituents in *Chrysanthemum cinerariaefolium*. (1) Their development in the flower head. (2) Their distribution in the plant. Pyrethrum Post. 8 (4): 32 – 37
22. Head S. W. (1973). Composition of pyrethrum extract and analysis of pyrethrins. Pyrethrum; The Natural Insecticide (JE Cadisa, ur.). Academic Press, New York. 25 – 49
23. Heywood V.H. (1976). *Tanacetum*. In: Flora Europaea, Plantaginaceae to Compositae (and Rubiaceae). Cambridge University Press, Cambridge. 4: 169 – 171
24. Hitmi A., Sallanon H., Barthomeuf C. (2001). Effects of plant growth regulators on the growth and pyrethrin production by cell cultures of *Chrysanthemum cinerariaefolium*. Australian Journal of Botany. 49: 81 – 88
25. Ikahu J. M., Ngugi C. W. (1989) Investigations into yield losses of some pyrethrum clones through picking of flowers improper stage of development. Pyrethrum Post 17:56 – 59
26. Jovetić S., De Gooijer C. (1995). The production of pyrethrins by in vitro systems. Crit. Rev. Biotechnol. 15: 125 – 138
27. Kolak I., Šatović Z., Rukavina H., Filipaj B. (1999.). Dalmatinski buhač (*Tanacetum cinerariifolium* /Trevir./ Sch. Bip.). Sjemenarstvo. 16 (99) 5: 425 – 440
28. Kristenson E. M., Ramos L. and Brinkman U. A. T. (2006). Recent advances in matrix solidphase dispersion. Trends Anal. Chem. 25 (2): 96 – 111
29. Kroll U. (1963). The effect of fertilizers, manures, irrigation and ridging on the yield of pyrethrum. East African Agricultural and Forestry Journal 28 (3): 139-145
30. Kušan F. (1938.). Ljekovito bilje. Vlastita naklada. Zagreb.
31. Lichtenthaler H., Rohmer K. M., Schwender J. (1997). Two independent biochemical pathways for isopentenyl diphosphate and isoprenoid biosynthesis in higher plants. Physiologia Plantarum. 101: 643-652
32. Maciver D. R. (1995). Constituents of pyrethrum extracts. Pyrethrum flowers: Production, Chemistry, Toxicology, and Uses (JE Casida, GB Quistad, ur.). Oxford University Press, New York. 108 – 122
33. Matsuda K., Kikuta Y., Haba A., Nakayama K., Katsuda Y., Hatanaka A., Komai K. (2005). Biosynthesis of pyrethrin I in seedlings of *Chrysanthemum cinerariaefolium*. Phytochemistry. 66: 1529 – 1535
34. Moidoveanu C., David V. (2002). Sample Preparation in Chromatography. Journal of Chromatography library. 65: 1 – 930
34. Moslemi A. (2017). The pathology of pyrethrum yield – decline in Australia. Faculty of Veterinary and Agricultural Sciences, The University of Melbourne, Melbourne.
35. Nikolić T. ur. (2015): Flora Croatica baza podataka (http://hirc.botanic.hr/fcd). Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu (datum pristupa: 08.03.2020).

36. Nikolić T., Milović M., Bogdanović S., Jasprica N. (2015.). Endemi u hrvatskoj flori. Alfa. Zagreb.
37. Ozimec R., Karoglan Kontić J., Maletić E., Matotan Z., Strikić F (2015). Tradicijske sorte i pasmine Dalmacije. Program ujedinjenih naroda za razvoj, Zagreb. Tradicijske sorte i pasmine Dalmacije_UVOD, SADRZAJ I OPCI DIO (2).pdf – pristup 06.06.2020.
38. Ožanić S. (1955). Poljoprivreda Dalmacije u prošlosti. Izdanje društva agronoma NRH, Split. 230 – 231
39. Parlevliet J.E. (1969). Clonal selection for yield in pyrethrum Chrysanthemum cinerariaefolium Vis. Euphytica. 18: 21 – 26
40. Parlevliet J. E. (1970). The effect of picking interval and flower head development on the pyrethrins content of different pyrethrin clones. Pyrethrum Post. 10: 10 – 14.
41. Parlevliet J. E., Brewer J. G., Ottaro W. G. M (1979). Collecting pyrethrum, *Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis. in Yugoslavia for Kenya. Broadening the genetic base of crops. Proceedings of the conference, Wageningen, Netherlands. 91 – 96
42. Pattenden G. (1970). Some studies on the biosynthesis of the pyrethrins. Pyrethrum Post. 10 (4): 2-5
43. Potts W. C., Menary R. C. (1987). „Research report on pyrethrum“. University of Tasmania, Hobart.
44. Purseglove J. W. (1982). Tropical crops. Dicotyledons. Longman, New York.
45. Sawicki R. M., Thain E. M. (1962) Insecticidal activity of pyrethrum extract and its four insecticidal constituents against house flies. IV.—Knock-down activities of the four constituents. J Sci Food Agric 13:292 – 297. https://doi.org/10.1002/jsfa.2740130504
46. Sitango K. K. (2011). Factors affecting dry matter yield and pyrethrin content in pyrethrum in Tasmania. University of Tasmania, Tasmania.
47. Skender A., Knežević M., Đurkić M., Martinčić J., Guberac V., Kristek A., Stjepanović M., Bukvić G., Matotan Z., Šilješ I. (1999). Sjeme i plodovi poljoprivrednih kultura na području Hrvatske. Poljoprivredni fakultet, Osijek.
48. Stepanović B., Radanović D., Tursić I., Nemčević N., Ivanec J. (2009.). Uzgoj ljekovitog i aromatičnog bilja. Jan-Spider. Pitomača.
49. Todd D. G., Wohlers D., Citra M. (2003). Toxicological profile for pyrethrins and pyrethroids. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 1–287
50. Vasisht K. i Vishavjit K. (2000). Industrial Utilization of Pyrethrum. International Centre for Science and High Technology, Italy. 191.-Industrial-Utilization-of-Pyrethrum-29-30-May-2000-Dar-es-Salaam-Tanzania-Workshop-proceedings.pdf – pristup 25. 03. 2020.
51. Wandahwa P., Van Ranst E., Van Damme P. (1996.). Pyrethrum (Chrysanthemum cinerariaefolium Vis.) cultivation in West Kenya: origin, ecological conditions and management. Industrial Crops and Products. 5: 307 – 322
52. Wei D., Li Z., Wang G., Yang Y., Li Y., Xia Y. (2006). Separation and Purification of Natural Pyrethrins by Reversed Phase High Performance Liquid Cromatography. Chinese Journal of Analytical Chemistry. 34 (12): 1776 – 1779
53. Winney R. (1979). Performance of pyrethroids as domestic insecticides. Pyrethrum Post. 13 (4): 132 – 136

54. Zieg R. G., Zito S. W., Staba E. J. (1983). Selection of high pyrethrin production tissue cultures. Planta Medica. 48: 88 - 91

Izvori s web stranica:

1. FAO (2020). Food and Agrculture Organization of the United Nations. http://www.fao.org - pristup 13.3.2020.
2. BRA (2020). Botanical Resources Australia. https://www.botanicalresources.com - pristup 13.3.2020.

Životopis

Iva Parlov rođena je 1.6.1996. godine u Zagrebu. Pohađala je IX. gimnaziju u Zagrebu od 2011. do 2015. godine. Za vrijeme srednje škole volontirala je u Volonterskom klubu IX. gimnazije. Za vrijeme pohađanja osnovne škole završila je A2 stupanj engleskog jezika, dok je na Državnoj maturi položila engleski jezik B2 razine. Vrlo dobro se služi radom na računalu (Microsoft Office). Završila je preddiplomski studij Agrarna ekonomika na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Trenutno je na Diplomskom studiju Ekološka poljoprivreda i agroturizam.

U slobodno vrijeme voli se družiti s prijateljima i obitelji, a najviše sa svojom nećacima Tenom i Tomom.