

Analiza sastava i sadržaja piretrina u samoniklim populacijama dalmatinskog buhača (*Tanacetum cinerariifolium*)

Gradišćak, Laura

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:204:196640>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-20**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

**Analiza sastava i sadržaja piretrina u samoniklim
populacijama dalmatinskog buhača
(*Tanacetum cinerariifolium*)**

DIPLOMSKI RAD

Laura Gradinščak

Zagreb, rujan, 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

Diplomski studij:

Biljne znanosti

**Analiza sastava i sadržaja piretrina u samoniklim
populacijama dalmatinskog buhača
(*Tanacetum cinerariifolium*)**

DIPLOMSKI RAD

Laura Gradinščak

Mentorica:
izv. prof. dr. sc. Martina Grdiša

Zagreb, rujan, 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZJAVA STUDENTA
O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, Laura Gradinščak, JMBAG 0178104917, rođena 19.11.1996. u Zagrebu, izjavljujem da sam samostalno izradila diplomski rad pod naslovom:

**ANALIZA SASTAVA I SADRŽAJA PIRETRINA U SAMONIKLIM
POPULACIJAMA DALMATINSKOG BUHAČA (*Tanacetum cinerariifolium*)**

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

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studentice **Laure Gradinščak**, JMBAG 0178104917, naslova

**ANALIZA SASTAVA I SADRŽAJA PIRETRINA U SAMONIKLIM
POPULACIJAMA DALMATINSKOG BUHAČA (*Tanacetum cinerariifolium*)**

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____, dana _____.

Povjerenstvo:

1. izv. prof. dr. sc. Martina Grdiša, mentor _____

2. izv. prof. dr. sc. Jana Šic Žlabur, član _____

3. izv. prof. dr. sc. Klaudija Carović-Stanko, član _____

Zahvala

Ovime zahvaljujem mentorici Martini Grdiši što mi je pomogla da pisanje ovog rada bude lijepo iskustvo kojim završavam važan dio svog životnog puta. Hvala mentorici što je svaki put pregledavala rad s strpljenjem i razumijevanjem te uvijek pronašla vrijeme za konzultacije i sva moja pitanja.

Zahvaljujem se svim kolegama i kolegicama koji su koračali sa mnom kroz ove predivne godine i postali prijatelji za cijeli život.

Najveće hvala mami i seki koje su bile u svakom trenutku uz mene kao najveća podrška i motivacija, kako u životu tako i na ovom akademskom putu.♡

SADRŽAJ

1. Uvod.....	1
1.1. Hipoteza i cilj istraživanja	2
2. Pregled literature.....	3
2.1. Sistematska klasifikacija i rasprostranjenost	3
2.2. Uzgoj dalmatinskog buhača kroz povijest i danas	5
2.3. Morfološka svojstva dalmatinskog buhača	6
2.4. Kemijski sastav dalmatinskog buhača	8
3. Materijali i metode	10
3.1. Biljni materijal	10
3.2. Poljski pokus.....	11
3.3. Ultrazvučna ekstrakcija piretrina	11
3.4. Identifikacija i kvantifikacija sastavnica piretrina	12
3.5. Statistička obrada podataka	12
4. Rezultati i rasprava.....	13
5. Zaključak	22
6. Popis literature	23
7. Životopis	26

Sažetak

Diplomskog rada studentice **Laure Gradinščak**, naslova

ANALIZA SASTAVA I SADRŽAJA PIRETRINA U SAMONIKLIM POPULACIJAMA DALMATINSKOG BUHAČA (*Tanacetum cinerariifolium*)

Piretrin je insekticidni spoj dalmatinskog buhača. Smjesa je šest aktivnih sastavnica; piretrina I i II, cinerina I i II te jasmolina I i II. Piretrin I i II su najzastupljenije sastavnice i njihov omjer određuje insekticidni potencijal piretrinskog ekstrakta. Istraživanje sastava i sadržaja piretrina provedeno je na sedam samoniklih populacija dalmatinskog buhača (P01 Žman, Dugi otok, P02 Sevid, P03 Budva, P04 Srđ, P05 Vis, P06 Korčula, P07 Murter). Ultrazvučna ekstrakcija korištenjem acetona kao ekstrakcijskog otapala korištena je za izdvajanje piretrina iz osušenih cvatnih glavica. Dobiveni ekstrakti piretrina analizirani su tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC DAD-UV/VIS). Varijabilnost u sastavu i sadržaju piretrina između prirodnih populacija utvrđene su analizom varijance (ANOVA) i analizom glavnih sastavnica (PCA). Dobiveni rezultati ukazuju na široku kemijsku varijabilnost prirodnih populacija dalmatinskog buhača. Prosječan sadržaj ukupnih piretrina u masi suhog cvata kretao se od 0,91 % (P02 Sevid) do 1,27 % (P03 Budva), a prosječni omjer piretrina I i piretrina II od 1,08 (P02 Sevid) do 1,74 (P04 Srđ).

Ključne riječi: autohtona vrsta, Hrvatska, prirodni insekticid, endem, ekološka poljoprivreda

Summary

Of the master's thesis - student **Laura Gradinščak**, entitled

ANALYSIS OF THE COMPOSITION AND CONTENT OF PYRETHRINS IN DALMATIAN PYRETHRUM (*Tanacetum cinerariifolium*) NATURAL POPULATIONS

Pyrethrin is an insecticidal compound of Dalmatian pyrethrum. The mixture consists of six active components: pyrethrin I and II, cinerin I and II and jasmolin I and II. Pyrethrin I and II are the most abundant components and their ratio determines the insecticidal potential of the pyrethrin extract. Studies on the composition and content of pyrethrins were conducted on seven wild populations of Dalmatian pyrethrum (P01 Žman, Dugi otok, P02 Sevid, P03 Budva, P04 Srđ, P05 Vis, P06 Korčula, P07 Murter). Ultrasonic extraction with acetone as extraction solvent was performed to isolate pyrethrins from the dried flower heads. The obtained pyrethrin extracts were analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC DAD-UV /VIS). Variability in composition and content of pyrethrins between natural populations was determined by analysis of variance (ANOVA) and principal component analysis (PCA). The obtained results indicate a great chemical variability among natural populations of Dalmatian pyrethrum. The average content of total pyrethrins in flower dry matter ranged from 0.91% (P02 Sevid) to 1.27% (P03 Budva), and the average ratio of pyrethrin I to pyrethrin II ranged from 1.08 (P02 Sevid) to 1.74 (P04 Srđ).

Keywords: indigenous species, Croatia, natural insecticide, endemic, organic agriculture

1. Uvod

Dalmatinski buhač (*Tanacetum cinerariifolium* (Trevis.) Sch.Bip.) endemska je biljna vrsta istočne obale Jadranskog mora. Uz obalno područje Hrvatske i njezine otoke, dalmatinski buhač može se pronaći u južnim dijelovima Bosne i Hercegovine, obalnim dijelovima Crne Gore i Albanije. Dalmatinski buhač jedan od najstarije korištenih prirodnih insekticida. Tradicionalno se koristio za zaštitu od raznih štetnika u poljoprivredi, ali i u suzbijanju buha i ušiju kod ljudi (Grdiša i sur., 2009; Grdiša i sur., 2013, Nagar i sur., 2015).

Uz adekvatnu primjenu piretrin nije otrovan za sisavce i druge toplokrvne životinje, ima širok spektar djelovanja, ne nakuplja se u hranidbenim lancima i podzemnim vodama. Time predstavlja odličan prirodni insekticid koji ne šteti okolišu (Duchon i sur., 2009). Unatoč svojoj dugoj povijesti korištenja nije zabilježen razvoj rezistentnosti kod štetnika, zbog složene kemijske strukture, što je vrlo česta pojava kod sintetskih insekticida (Babić i sur., 2012). Dalmatinski buhač se od davnina uzgaja na istoku, a svijetom se proširio tijekom 19.-og stoljeća otkrićem njegovog snažnog insekticidnog djelovanja. Dalmacija je dugi niz godina bila vodeći proizvođač dalmatinskog buhača te je velike količine izvozila. No, otkrićem kemijskih sredstava za zaštitu i jačih proizvođača kao što je Japan, proizvodnja u Hrvatskoj je prestala (Vasiht i sur., 2000; Grdiša i sur., 2009; Benić Penava, 2012; Moslemi, 2017). Prema dostupnim podacima, danas se dalmatinski buhač uglavnom uzgaja u istočnoj Africi i Australiji (FAOSTAT, 2022), a u Hrvatskoj se ne uzgaja na značajnijim poljoprivrednim površinama već se sporadično uzgajaju pojedinačne biljke unutar okućnica i manjih obiteljskih vrtova.

Prirodne populacije dalmatinskog buhača predstavljaju vrijedne biljne genetske izvore koje je potrebno sačuvati. Dosad provedena istraživanja na samoniklim populacijama pokazala su veliku kemijsku i genetsku raznolikost na razini populacija i između populacija (Grdiša i sur., 2013; Grdiša i sur., 2014; Varga i sur., 2021). U sklopu Kolekcije ljekovitog i aromatičnog bilja, Nacionalne banke biljnih gena Republike Hrvatske čuva se veliki broj primki dalmatinskog buhača, a na sakupljenih primkama provodi se opis i procjena svojstava. Procjena svojstava uključuje analizu sastava i sadržaja piretrina, što je kod dalmatinskog buhača agronomski najznačajnije svojstvo. Podaci o sastavu i sadržaju piretrina, odnosno insekticidnom potencijalu nužan su preduvjet za razvoj budućih oplemenjivačkih programa i uvođenje dalmatinskog buhača u poljoprivrednu proizvodnju.

1.1. Hipoteza i cilj istraživanja

Postoji velika varijabilnost u sastavu i sadržaju piretrina kod samoniklih populacija dalmatinskog buhača, a povezano s tim i u insekticidnom potencijalu piretrinskih ekstrakata tih istih populacija.

Cilj istraživanja je utvrditi sastav i sadržaj piretrina kod sedam populacija dalmatinskog buhača uzorkovanih na području prirodne rasprostranjenosti u Hrvatskoj i Crnoj Gori.

2. Pregled literature

2.1. Sistematska klasifikacija i rasprostranjenost

Dalmatinski buhač (*Tanacetum cinerariifolium* (Trevis.) Sch.Bip) je višegodišnja biljna vrsta koja pripada porodici glavočika (Asteraceae) i rodu *Tanacetum*, jednom od 1300 rodova porodice Asteraceae (Grdiša i sur., 2009). Rod *Tanacetum* broji između 70 i 150 vrsta te se smatra jednim od najvećih rodova porodice Asteraceae (Lal i sur., 2014). Vrste iz roda *Tanacetum* rasprostranjene su u Europi, Aziji, sjevernoj Africi i Sjevernoj Americi. Neke vrste introducirane su u južnu Afriku, Južnu Ameriku, Australiju i Novi Zeland. Od ukupnih 150 vrsta na području europskog kontinenta rastu 22 vrste. Uz dalmatinski buhač svoje prirodno stanište nalaze još četiri vrste roda *Tanacetum* (Tablica 1). Dalmatinski buhač je jedina vrsta roda koja ima agronomsku važnost, iako se rod sastoji od nekoliko vrsta koje proizvode bioaktivne tvari insekticidnog djelovanja (Grdiša i sur., 2009; Catalano i sur., 2014).

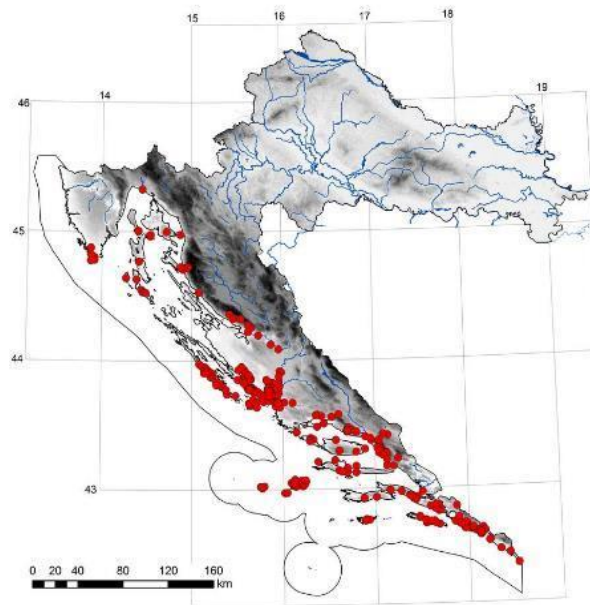
Tablica 1. Vrste roda *Tanacetum* rasprostranjene u Hrvatskoj (Nikolić, 2023)

Hrvatski naziv	Latinski naziv
Dalmatinski buhač	<i>Tanacetum cinerariifolium</i> (Trevis.) Sch.Bip.
Obični buhač	<i>Tanacetum vulgare</i> L.
Velikolisni buhač	<i>Tanacetum macrophyllum</i> (Waldst. & Kit.) Sch.Bip.
Majčinski buhač	<i>Tanacetum parthenium</i> (L.) Sch.Bip
Gronjasti buhač	<i>Tanacetum corymbosum</i> (L.) Sch.Bip. ssp. <i>clusii</i> (Fisch. ex Rchb.) Heywood ssp. <i>corymbosum</i>

Dalmatinski buhač autohtona je biljna vrsta za istočni dio jadranske obale i otoka. Pojavljuje se na mediteranskim i submediteranskim travnjacima s plitkim kamenitim tlima (Slika 1), na nadmorskoj visini do oko 200 m, a u nekim slučajevima može se pronaći i na nadmorskoj visini iznad 500 m (Nikolić i sur., 2015). U Hrvatskoj brojne populacije mogu se pronaći u južnom dijelu Istre, na Kvarnerskim otocima (Krk, Cres, Lošinj), na Velebitu i Biokovu te duž dalmatinske obale uključuju i dalmatinske otoke (Brač, Hvar, Biševo, Vis, Korčula, Lastovo, Mljet) (Nikolić, 2023; Slika 2). Osim u Hrvatskoj, ova vrsta rasprostranjena je i u južnim dijelovima Bosne i Hercegovine te u priobalnim područjima Crne Gore i Albanije (Heywood, 1976).



Slika 1. Samonikle biljke dalmatinskog buhača na Biokovu
Autorica: Grdiša M., 2010.



Slika 2. Rasprostranjenost dalmatinskog buhača u Hrvatskoj
(Nikolić, 2023)

2.2. Uzgoj dalmatinskog buhača kroz povijest i danas

Otkrićem insekticidnog djelovanja tijekom 19. stoljeća došlo je do širenja dalmatinskog buhača svijetom i proizvodnje velikih razmjera. Od kraja 19. stoljeća na području Dalmacije odvijala se značajna proizvodnja što je trajalo sve do Prvog svjetskog rata. Od 1930 – ih godina proizvodnja se smanjuje a, postepenom smanjenju proizvodnje pridonio je i razvoj sintetskog insekticida DDT- a (dikloro-difenil-trikloroetan) (Chandler, 1948; Vasisht i sur., 2000; Grdiša i sur., 2009; Benić Penava, 2012).

Proizvodnja buhača proširila se diljem svijeta, u više od 10 zemalja: Kenija, Australija, Tanzanija, Ruanda, Ekvador, Francuska, Čile (Grdiša i sur., 2009). Japan je bio najveći proizvođač dalmatinskog buhača sve do kraja Drugog svjetskog rata, do 1945. godine kada započinje proizvodnja u Keniji (Vasisht i sur., 2000). Većina uzgojenog buhača 1980. godine proizvodila se u Keniji, a određenim dijelom i u Tanzaniji, Ruandi i Ekvadoru što je činilo 90 % svjetske proizvodnje od koje se 85 % izvezilo na svjetsko tržište (Casida, 1980; Vasisht i sur., 2000).

Danas su najveći proizvođači u svijetu Ruanda, Tanzanija i Kenija (Tablica 2) s više od 5 000 ha površine pod dalmatinskim buhačem. Ruanda, iako najveći proizvođač, od 2017. do 2021. bilježi pad uzgojnih površina dok Papua Nova Gvineja i Kenija bilježe povećanje površina pod dalmatinskim buhačem (FAOSTAT, 2022).

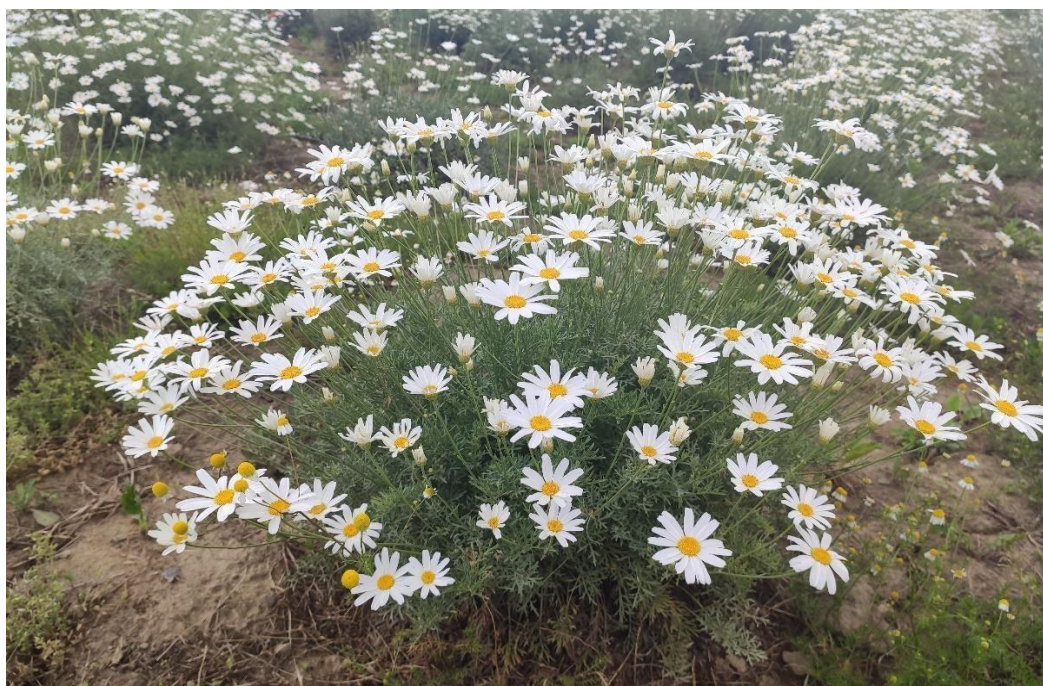
Tablica 2. Uzgoj dalmatinskog buhača u svijetu 2017. – 2021. (ha)

	Ruanda	Ujedinjena Republika Tanzanija	Papua Nova Gvineja	Kenija	Maroko	Tunis
2017.	8 453 ha	5 091 ha	1 820 ha	1 404 ha	700 ha	610 ha
2018.	4 869 ha	5 282 ha	1 879 ha	2 518 ha	700 ha	610 ha
2019.	8 769 ha	4 351 ha	1 890 ha	2 584 ha	700 ha	600 ha
2020.	4 867 ha	5 335 ha	1 896 ha	2 622 ha	700 ha	600 ha
2021.	5 172 ha	5 045 ha	1 903 ha	5 300 ha	700 ha	600 ha

Izvor: FAOSTAT, 2023.

2.3. Morfološka svojstva dalmatinskog buhača

Dalmatinski buhač je višegodišnja zeljasta biljna vrsta koja s godinama poprima grmolik oblik (Slika 3), a uz pravilnu njegu može doživjeti i više od 20 godina (Catalano i sur., 2014). Veličina grma ovisi o mnogim čimbenicima okoliša kao što su temperatura, tip tla i vlaga (Grdiša i sur., 2014). Visina biljke kreće se od 30 cm do (70) 100 cm (Bhat, 1995; Kovačić i sur., 2008; Nikolić i sur., 2015). Stabljika je razgranata, srebrno zelene boje i obrasla je sitnim dlačicama. Listovi su također srebrno-zelene boje, nasuprotno poredani, uski, razdijeljeni, perastog oblika. Bazalni listovi su duljine 10 do 20 cm te je plojka lista kraća od peteljke, a gornji listovi su manji i imaju kraću peteljku od plojke (Catalano i sur., 2014; Gallo i sur., 2017).



Slika 3. Dalmatinski buhač
Autorica: Grdiša M., 2021.

Tijekom vegetativnog razvoja razvijaju se izdanci koji se nekoliko puta granaju i na vrhu razvijaju cvatnu glavicu. Ona se sastoji od dvaju vrsta cvjetova; žutih središnjih cjevastih i bijelih rubnih jezičastih. Središnji cjevasti cvjetovi su hermafroditni i tvore žuti vjenčić s pet prašnika koji je povezan sa čaškom tučka (Slika 4).

Promjer potpuno otvorenog cvata kreće se od 2 do 5 cm, a promjer žutih plodnih cvjetova od 1 do 2 cm (Kolak i sur., 1999). Tijekom otvaranja cvjetova režnjevi koji okružuju tučak se otvaraju te na njušku tučka padaju peludna zrnca. Sazrijevanjem jajne stanice stvara se plod, roška duga 2,5 do 3,5 mm. Jezičasti rubni cvjetovi su jednospolni te sadrže samo ženske reproduktivne organe. Oplodnja sa cjevastim cvjetovima nije moguća zbog nekompatibilnosti reproduktivnih procesa (Bhat, 1995; Catalano i sur., 2014). Iako je samooprašivanje moguće, postotak samooplodnje je zanemarivo mali. Dalmatinski buhač uglavnom se oprašuje pomoću

kukaca, najčešće onima iz reda opnokrilaca (*Hymenoptera*). Kada kukac sleti na cvat i sakuplja njegov nektar ostavlja polen drugih biljaka te na taj način dolazi do stranooplodnje (Grdiša i sur., 2009).

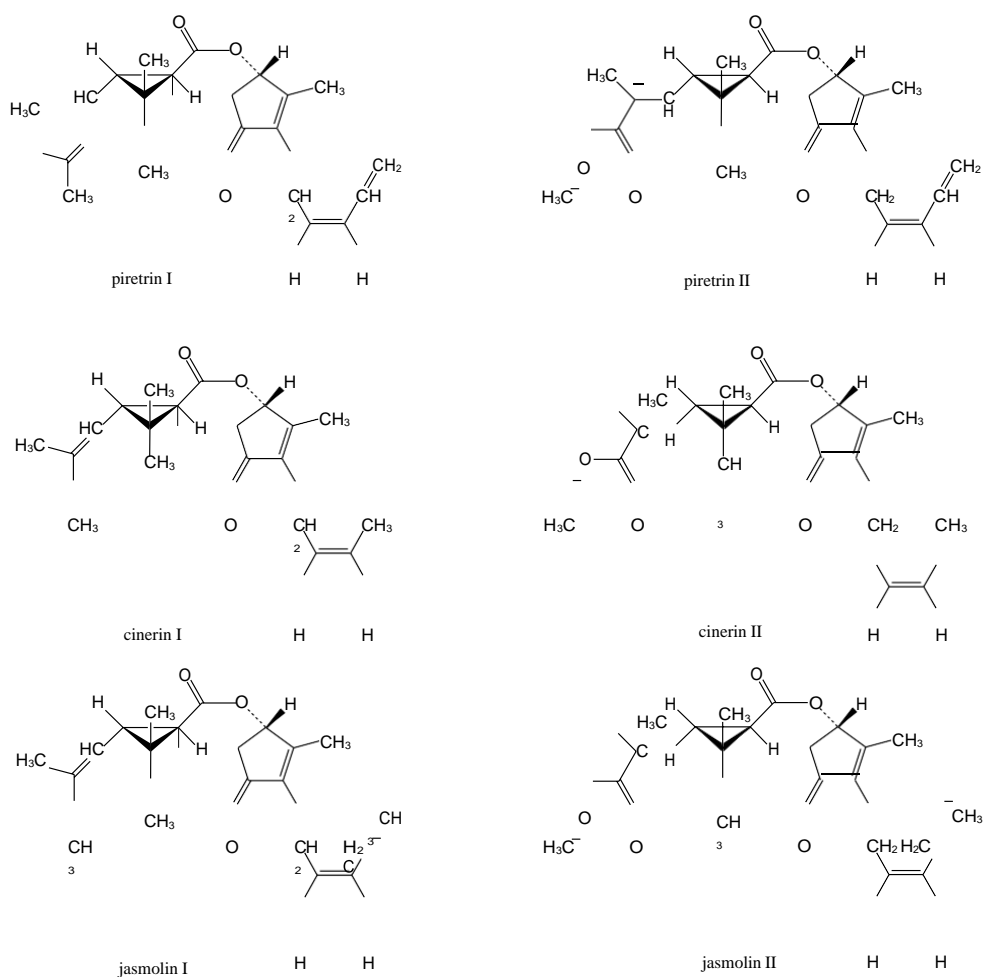


Slika 4. Cvat dalmatinskog buhača
Autorica: Grdiša M., 2018.

2.4. Kemijski sastav dalmatinskog buhača

Piretrin je sekundarni metabolit dalmatinskog buhača (Yang i sur., 2012). Piretrin je smjesa šest estera (Slika 5); piretrina I i II, cinerina I i II, i jasmolina I i II.

Piretrin I, cinerin I i jasmolin I esteri su krizantemske kiseline i jednog od tri alkohola (piretrolon, cinerolon i jasmolon), dok su piretrini II esteri piretrinske kiseline i jednog od tri spomenuta alkohola (Casida, 1973; Crombie 1995; Essig i Zhao 2001). Piretrin se sintetizira unutar uljnih žlijezda smještenih na vanjskoj površini roške (93,7 %), a manje količine u cjevastim cvjetovima (2 %), u jezičastim cvjetovima (1,7 %) te u čaški cvijeta (2,6 %).



Slika 5. Strukturne formule piretrina I, piretrina II, cinerina I, cinerina II, jasmolina I i jasmolina II

Ukupni sadržaj piretrina u samoniklim populacija dalmatinskog buhača varira između 0,36 % i 1,3 % s prosječnom vrijednošću od 0,86 % (Grdiša i sur., 2013). U uzgojenim kultivarima u Tasmaniji sadržaj piretrina je veći i iznosi 1,8 % – 2,5 %, dok je u kultivarima uzgojenim u Australiji, Keniji i SAD-u zabilježeno 3,0 % ukupnih piretrina u suhom cvijetu (Hitmi i sur., 2000). Kvaliteta (bioaktivnost) ekstrakta buhača određena je omjerom piretrina I i piretrina II. Insekticidno djelovanje raste s povećanjem omjera (Jeran i sur., 2021). Omjer obično varira između 0,90 i 1,30, a u razvijenim kultivarima dalmatinskog buhača utvrđen je omjer do čak 3,50 (Grdiša i sur., 2014).

Piretrin djeluje kao kontaktni insekticid (Isman, 2008), prodirući u živčani sustav kukaca, uzrokujući *knock-down* učinak i smrt (Grdiša i sur., 2014). Način djelovanja piretrina na štetnike je ometanje normalnog funkcioniranja živčanog sustava utjecajem na natrijeve kanale, slično učincima DDT-a i piretroida. Kada štetnik dođe u kontakt s piretrinom on brzo prodire u centralni živčani sustav. U roku nekoliko minuta dolazi do paralize, što na kraju dovodi do smrti. Piretrin brzo i vrlo učinkovito djeluje u usporedbi s drugim biljnim insekticidima koji imaju sporije djelovanje. Čak i pri niskim dozama, piretrin je vrlo učinkovit. Piretrin I posjeduje smrtonosni učinak i djeluje za nekoliko minuta, dok je piretrin II povezan s već spomenutim knock-down učinkom. Iz tog razloga kombinacija piretrina I i piretrina II ima izvanredan učinak na različite vrste štetnika (Casida i Quistad 1995).

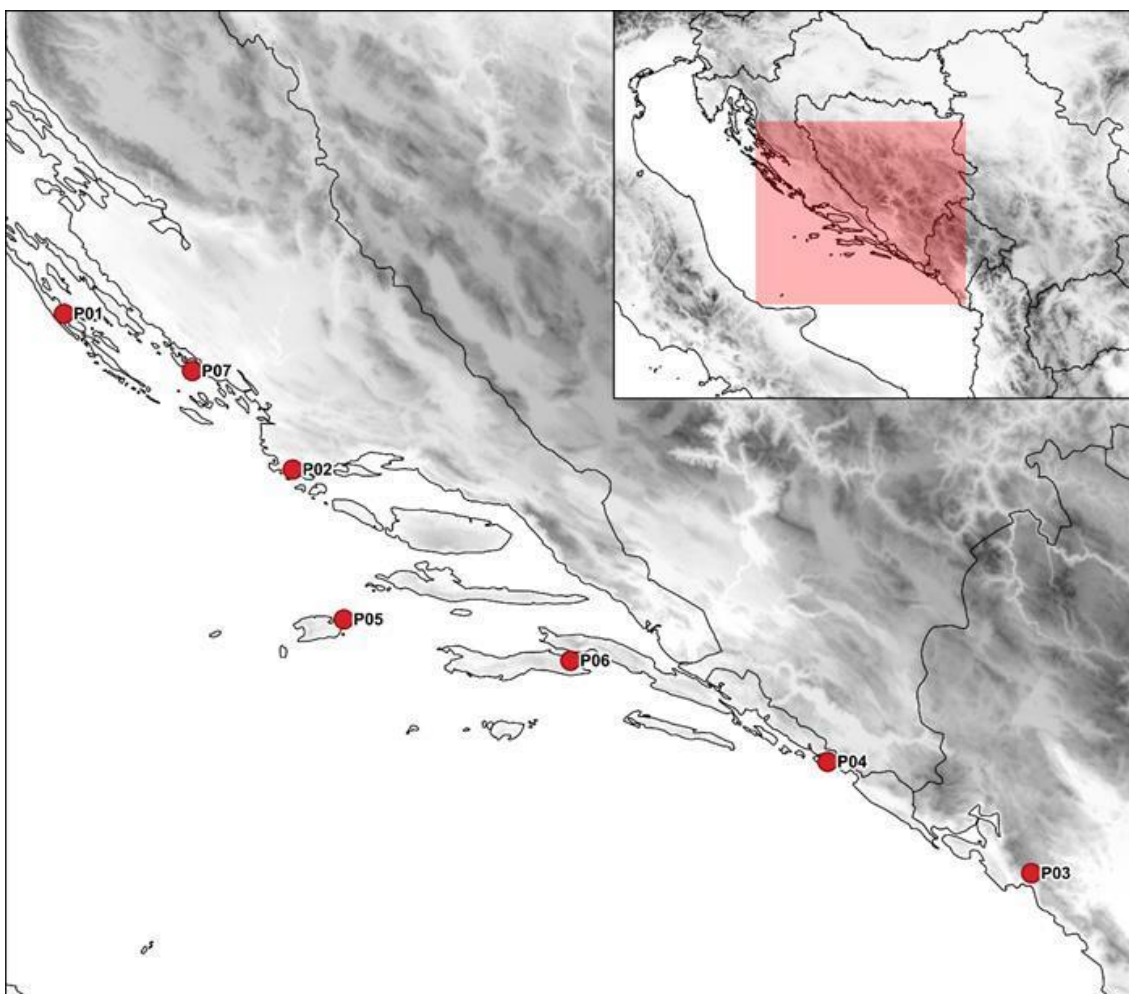
Sadržaj piretrina u biljkama ovisi o genotipu, morfološkim svojstvima (Bhat i Menary, 1986; Bhat, 1995), klimatskim uvjetima rasta/uzgoja biljaka, vremenu berbe, metodi ekstrakcije piretrina, načinu i uvjetima sušenja i skladištenja (Moslemi, 2017). U istraživanju Grdiša i sur. (2013) proučavana je kemijska raznolikost samoniklih populacija dalmatinskog buhača. Unutar istraživanih populacija zabilježeno je pet različitih kemotipova koji se razlikuju po insekticidnom potencijalu te predstavljaju vrijedne izvore kemijske varijabilnosti. Prosječni sadržaj piretrina varirao je od 0,36 % do 1,3 % po masi suhog cvata. Omjer piretrina I i piretrina II kretao se od 0,64 do 3,33. Također, Varga i sur. (2021) proučavali su raznolikost sastava i sadržaja piretrina u 10 samoniklih populacija dalmatinskog buhača. Jedinka s najnižim ukupnim udjelom piretrina sadržavala je 0,10 %, a jedinka sa najvišim udjelom piretrina sadržavala je 1,35 % ukupnih piretrina po masi suhog cvata. Istraživanje je dokazalo visoku kemijsku raznolikost unutar i između populacija. Kao što je već rečeno osim o genotipu, sadržaj piretrina ovisi i o vremenu berbe biljaka. Prema Grdiša i sur. (2022) optimalna faza za berbu cvatova dalmatinskog buhača je FS4, kad se otvori 2 do 5 reda cjevastih cvjetova. U navedenom istraživanju, sadržaj piretrina kretao se od 0,82 % do 1,14 % u ukupnoj masi suhog cvijeta, dok je najviša utvrđena vrijednost omjera piretrina I i piretrina II iznosila 1,92.

Ban i sur. (2010) proučavali su utjecaj metode ekstrakcije i vrste otapala na sastav i sadržaj piretrina. U radu je ispitivana učinkovitost dviju metode (Sohxhlet ekstrakcija i ultrazvučna ekstrakcija) i učinkovitost triju različitih otapala (heksan, etanol i petroleter). Ukupan sadržaj piretrina kretao se od 0,5 % (Sohxhlet ekstrakcija i etanol) do 1,2 % (ultrazvučna ekstrakcija i etanol) u ukupnoj masi suhog cvijeta. Uspoređujući ove dvije metode ekstrakcije, ultrazvučna ekstrakcija pokazala je veću učinkovitost, a etanol se pokazao kao najbolje ekstrakcijsko otapalo.

3. Materijali i metode

3.1. Biljni materijal

Sjeme prirodnih populacija dalmatinskog buhača uključenih u ovo istraživanje prikupljeno je 2018. godine na sedam lokacija prikazanih na slici 6. Detaljan opis lokacija uzorkovanja sjemena dan je u tablici 3. Prikupljeno sjeme (primke) čuva se u sklopu Kolekcije ljekovitog i aromatičnog bilja Nacionalne banke biljnih gena Republike Hrvatske, a podaci o njima dostupni su u Hrvatskoj bazi podataka o biljnim genetskim izvorima (*Croatian plant genetic resources database - CPGRD*).



Slika 6. Lokacije uzorkovanja prirodnih populacija dalmatinskog buhača
Autor: Varga F., 2023.

Tablica 3. Detaljan opis lokacija uzorkovanja sjemena

Oznaka populacije	MAP*	Lokacija	Zemljopisna dužina	Zemljopisna širina	Nadmorska visina
P01	MAP02959	Žman, Dugi otok (CRO)	435626N	0150825E	85 m
P02	MAP02965	Sevid (CRO)	433000N	0160240E	159 m
P03	MAP02976	Budva (MNE)	421854N	0185306E	772 m
P04	MAP02966	Srđ (CRO)	423856N	0180644E	382 m
P05	MAP02973	Vis (CRO)	430411N	0161445E	16 m
P06	MAP02824	Korčula (CRO)	425658N	0170741E	118 m
P07	MAP02796	Murter (CRO)	434653N	0153849E	22 m

* MAP – broj primke u Hrvatskoj baza podataka o biljnim genetskim izvorima (eng. *Croatian Plant Genetic Resources Database*). Dostupno na: <https://cpgrd.hapih.hr/> - pristup: 23.08.2023.

3.2. Poljski pokus

Presadnice sedam populacija dalmatinskog buhača proizvedene su iz sjemena u zaštićenom prostoru (Slika 7). Poljski pokus postavljen je u svibnju 2019. na Pokušalištu Zavoda za biljnu bioraznolikost, Maksimir (Slika 8), Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu po slučajnom bloknom rasporedu. Svaka populacija bila je predstavljena s 10 jedinki. Razmak unutar redova iznosio je 100 cm, a između redova 120 cm.



Slika 7. Presadnice dalmatinskog buhača
Autor: Grdiša, M., 2019.



Slika 8. Poljski pokus na Pokušalištu Maksimir
Autorica: Grdiša M., 2019.

3.3. Ultrazvučna ekstrakcija piretrina

Ekstrakcija piretrina iz osušenih cvatnih glavica dalmatinskog buhača provedena je prema istom postupku kao i u istraživanju Grdiša i sur. (2022). Ekstrakcija piretrina provedena je u ultrazvučnoj kupelji (Labsonic LBS2-10, FALC, Treviglio, Italija) iz 0,25 g biljnog materijala, korištenjem 5 ml acetona kao ekstrakcijskog otapala, pri konstantnoj temperaturi od 50 °C tijekom 60 minuta. Dobiveni ekstrakt filtriran je kroz najlonski filter promjera 0,45 μm.

3.4. Identifikacija i kvantifikacija sastavnica piretrina

Identifikacija i kvantifikacija šest sastavnica piretrina provedena je tekućinskom kromatografijom visoke učinkovitosti (HPLC-DAD-UV/VIS; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD) na koloni Zorbax SB C18 250 × 4,6 mm, veličine čestica 5 μm (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD). Primijenjeno je gradijentno eluiranje, a mobilna faza korištena u kromatografskom sustavu sastojala se od 0,1 % fosforne kiseline u MilliQ vodi (A) i acetonitrila (B) (Tablica 4.). Brzina protoka mobilne faze bila je 1,4 mL/L, dok je volumen injektiranja iznosio 5 μL. Istovjetna metoda korištena je i u istraživanju Grdiša i sur. (2022).

Tablica 4. Gradijent pokretne faze korišten za razdvajanje sastavnica piretrina

Vrijeme (min)	A (%)	B (%)
0,00	40	60
15,00	40	60
25,00	20	80
35,00	20	80
35,10	40	60
40,00	40	60

3.5. Statistička obrada podataka

Statistička obrada podataka provedena je pomoću statističkog programa SAS (SAS Institute, 2004). Razlike između populacija u sadržaju šest sastavnica piretrina, ukupnog sadržaja piretrina i omjera piretrina I i piretrina II utvrđene su analizom varijance. Razlike između prosječnih vrijednosti ovih kemijskih svojstava utvrđene su pomoću *post-hoc* Tukey-Kramerovog testa. Odnosi između izmjerenih svojstava ispitani su pomoću Pearsonovog koeficijenta korelacije. Na temelju svih svojstava provedena je i analiza glavnih sastavnica (engl. *Principal Component Analysis* - PCA). Broj glavnih sastavnica određen je na temelju njihovih svojstvenih vrijednosti (eng. *eigenvalues*), korištenjem Kaiserovog kriterija koji zadržava sastavnice kod kojih su svojstvene vrijednosti veće od 1 i Catellovog dijagrama (*scree plot*; Cattell, 1966), kao i kumulativnog postotka objašnjene varijance. Izrađen je dijagram u kojem su u koordinatnom sustavu točkama prikazani položaji analiziranih jedinki populacija i prosjeci populacija, a vektorima ispitivana svojstva (sadržaj svih šest sastavnica piretrina, sadržaj ukupnih piretrina, omjer piretrina I i II).

4. Rezultati i rasprava

Korelacije između sastavnica piretrina, ukupnih piretrina i omjera piretrina I i II prikazane su u tablici 5. Jaka pozitivna i statistički značajna korelacija utvrđena je između jasmolina II i piretrina II ($r = 0,788$; $P < 0.001$) te jasmolina I i piretrina I ($r = 0,835$; $P < 0.001$), kao i između ukupnih piretrina i piretrina I ($r = 0,804$; $P < 0.001$). Srednje jaka, pozitivna i značajna korelacija utvrđena je između ukupnih piretrina i piretrina II ($r = 0,707$; $P < 0.001$), jasmolina II ($r = 0,719$; $P < 0.001$) te jasmolina I ($r = 0,718$; $P < 0.001$).

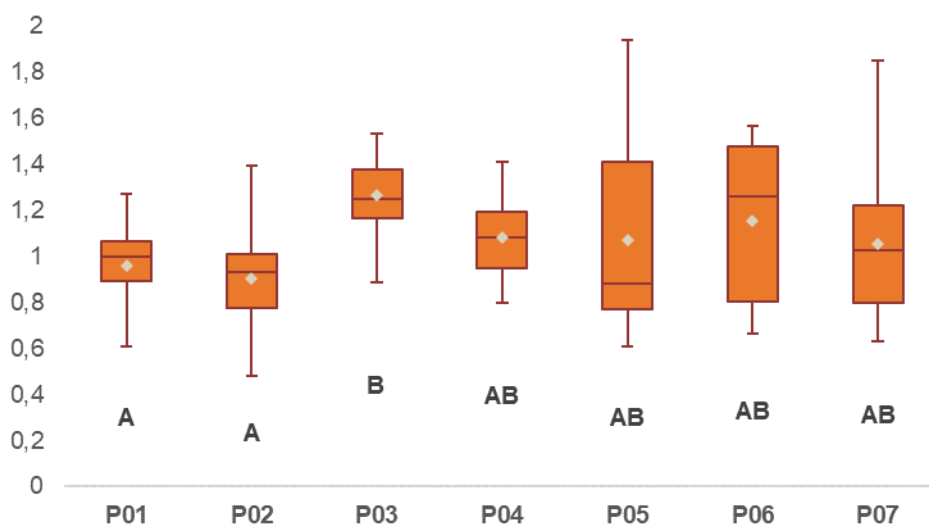
Tablica 5. Pearsonov korelacijski koeficijent između šest sastavnica piretrina (% od ukupnog sadržaja piretrina) i ukupnog sadržaja piretrina (% po masi suhog cvata)

	Cin II	Pir II	Jas II	Cin I	Pir I	Jas I	Ukupni piretrin	pirI/pirII
Cin II		***	***	***	ns	ns	***	***
Pir II	0,524		***	ns	ns	*	***	***
Jas II	0,360	0,788		ns	***	***	***	***
Cin I	0,516	-0,057	0,072		***	***	***	***
Pir I	0,063	0,167	0,335	0,618		***	***	***
Jas I	0,037	0,187	0,599	0,511	0,835		***	***
Ukupni piretrin	0,449	0,707	0,719	0,491	0,804	0,718		ns
pirI/pirII	-0,400	-0,636	-0,416	0,424	0,455	0,300	-0,060	

ns – nije statistički značajno; * statistički značajno na razini $P < 0.05$; ** statistički značajno na razini $P < 0.01$; *** statistički značajno na razini $P < 0.001$

Analizom varijance i *post-hoc* Tukey-evim testom utvrđene su razlike prosječnih vrijednosti sadržaja ukupnih piretrina i svih šest sastavnica piretrina između sedam analiziranih populacija dalmatinskog buhača.

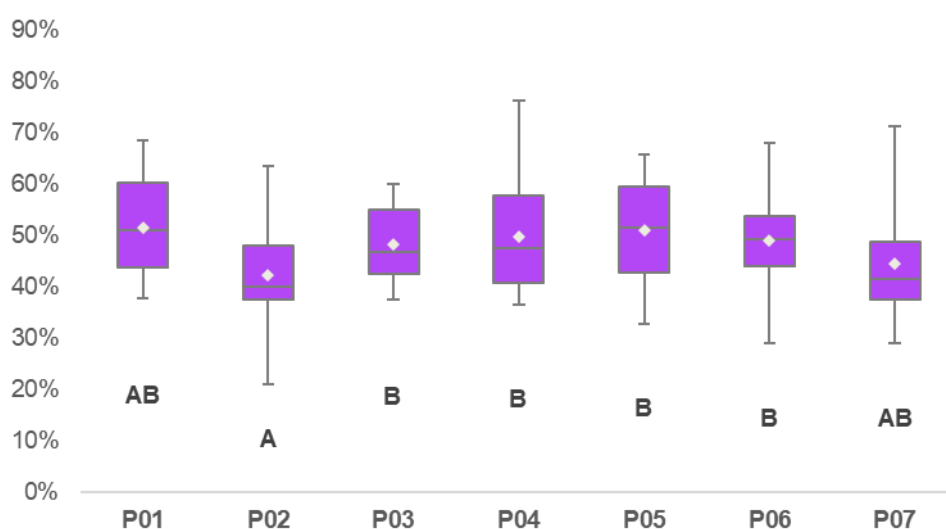
Prosječne vrijednosti sadržaja ukupnih piretrina kretale su se od 0,91 % mase suhих cvjetova kod populacije P02 Sevid do 1,27 % mase suhих cvjetova kod populacije P03 Budva. Između ove dvije populacije utvrđena je značajna razlika u sadržaju ukupnih piretrina, kao i između populacije P01 Žman, Dugi otok i P03 Budva. U populaciji P02 Sevid utvrđene su jedinice s najnižim i sadržajem ukupnih piretrina (0,48 % mase suhих cvjetova), dok su kod populacije P05 Vis utvrđene jedinice s sadržajem piretrina od čak 1,94 % mase suhих cvjetova u populaciji (Grafikon 1), što je karakteristika modernih kultivara koji se uzgajaju u svijetu (Jeran i sur., 2021). Utvrđen je veći sadržaj piretrina u odnosu na rezultate istraživanja Varga i sur. (2021) u kojem se sadržaj piretrina kretao od 0,10 % do 1,35 % suhe mase cvijeta. Pri usporedbi s ovim istraživanjem valja imati na umu da nisu korištene iste metode ekstrakcije, što je jedan od čimbenika koji utječe na sadržaj i sastav piretrina (Ban i sur., 2010). Prema istraživanju (Grdiša i sur., 2013) prosječni sadržaj ukupnih piretrina kretao se između 0,36 % do 1,30 % po masi suhog cvijeta.



Grafikon 1. Ukupni sadržaj piretrina u istraživanim populacijama

*vrijednosti označene istim slovima ne razlikuju se značajno na razini $P < 0.05$

Prosječne vrijednosti piretrina I u ukupnom sadržaju piretrina prikazane su na Grafikonu 2. Prosječne vrijednosti su se kretale između 42,13 % kod populacije P02 Sevid do 51,43 % ukupnih piretrina kod populacije P01 Žman, Dugi otok i između ove dvije populacije je utvrđena statistički značajna razlika. Populacija P02 Sevid se značajno razlikovala od ostalih populacija u sadržaju piretrina I, uz izuzetak P07 Murter.



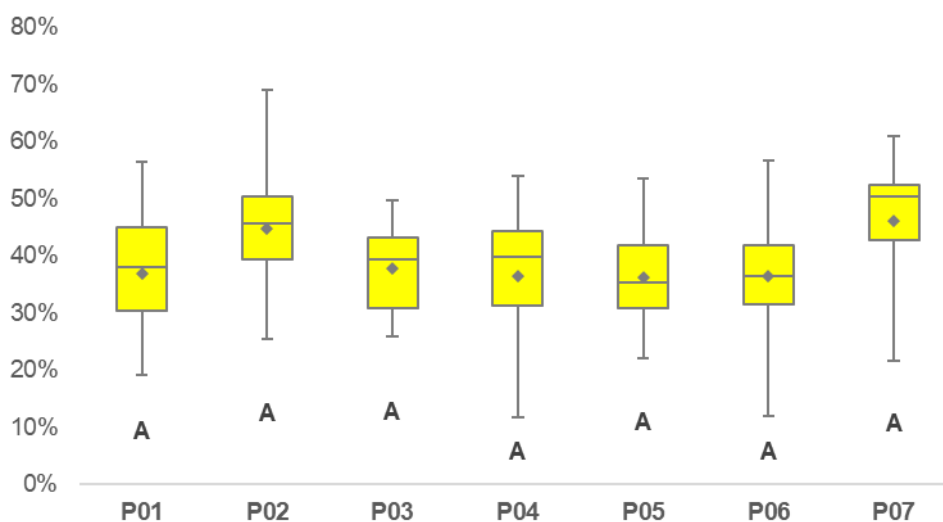
Grafikon 2. Udio piretrina I u ukupnom sadržaju piretrina

*vrijednosti označene istim slovima ne razlikuju se značajno na razini $P < 0.05$

U populacijama P02 Sevid i P04 Srđ utvrđene su jedinice s najnižim i najvišim vrijednostima piretrina I; 20,99 % ukupnih piretrina kod P02 Sevid i 76,00 % ukupnih piretrina kod P04 Srđ. Kod svih populacija, izuzev P02 Sevid i P07 Murter, udio piretrina I u ukupnom sadržaju piretrina bio je veći u odnosu na piretrin II. U istraživanju (Varga i sur., 2021)

najniži sadržaj piretrina I iznosio je 12,33 % kod populacije s Čiova, a najviši sadržaj piretrina I u ukupnim piretrinima iznosio je 77,17 % kod populacije s Malog Lošinja. Prosječni udio piretrina u proučavanim populacijama kretao se 36,45 % do 60,52 %. U istraživanju Grdiša i sur. (2013) najviši sadržaj piretrina I u ukupnom sadržaju piretrina zabilježen je u populaciji sa Osora (67,46 %), dok je najniža vrijednost zabilježena kod populacije iz Premanture (31,02 %).

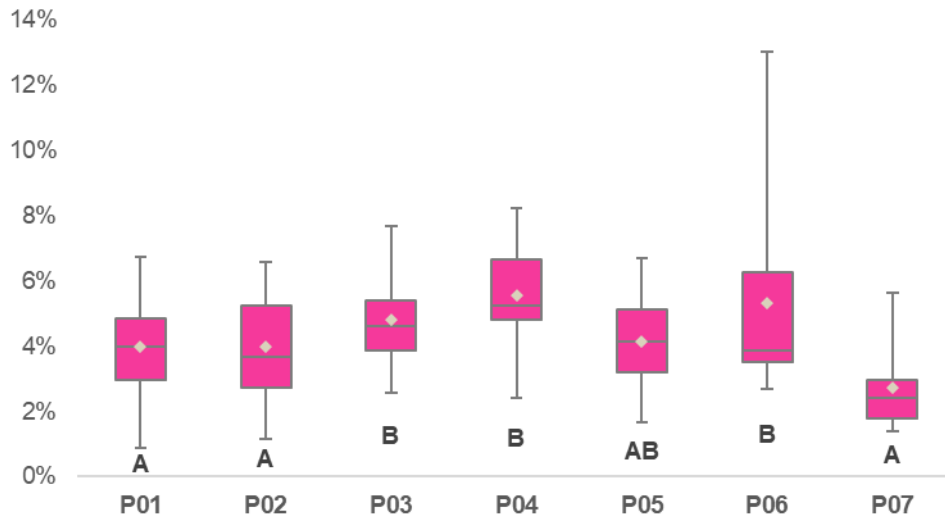
Kao što je već i navedeno kod dvije analizirane populacije utvrđen je viši udio piretrina II u usporedbi s piretrinom I (P02 Sevid i P07 Murter). Prosječne vrijednosti piretrina II kretale su se od 36,19 % ukupnih piretrina u populaciji P05 Vis do 46,03 % ukupnih piretrina kod populacije P07 Murter. U populaciji P04 sakupljenoj na Srđu zabilježen je najniži udio piretrina II (11,79 %), a u populaciji P02 sakupljenoj na Sevidu utvrđene su jedinice s najvišim vrijednostima piretrina II (69,00 %; Grafikon 3). U istraživanju Varga i sur. (2021) najniži sadržaj piretrina II kretao se od 12,68 % ukupnih piretrina do 61,21 % ukupnih piretrina. Razlike između populacija u sadržaju piretrina II nisu utvrđene. Piretrin II je uz piretrin I glavna aktivna sastavnica, koja ima knock-down učinak. Piretrin I je sastavnica koja u konačnici ima smrtonosni učinak. Stoga se preferiraju ekstrakti koji sadrže više piretrina I u odnosu na piretrin II, što u konačnici rezultira njihovim višim omjerom i većim insekticidnim učinkom.



Grafikon 3. Udio piretrina II u ukupnom sadržaju piretrina

*vrijednosti označene istim slovima ne razlikuju se značajno na razini $P < 0.05$

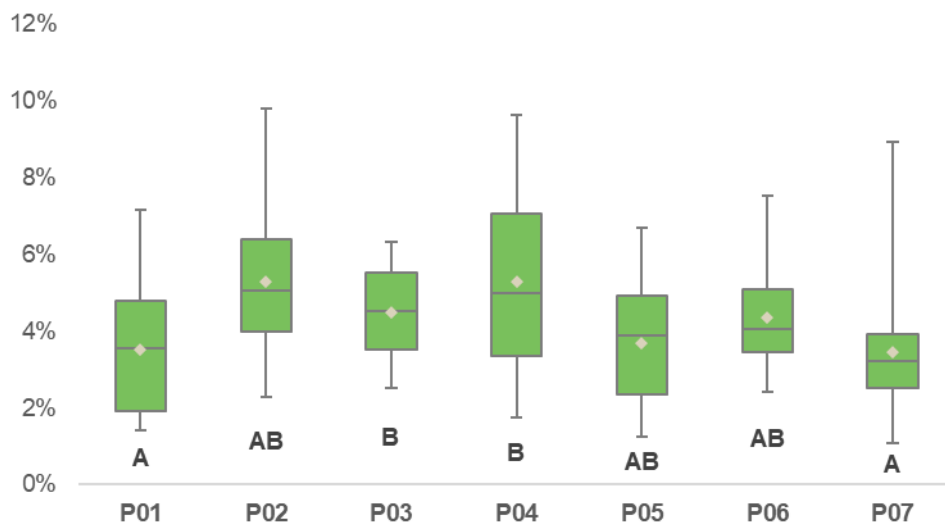
Prosječne vrijednosti cinerina I (Grafikon 4) u istraživanim populacijama kretale su se od 2,7 % kod populacije P07 Murter do 5,5 % u ukupnom sadržaju piretrina kod populacije P04 Srđ, koja se u sadržaju cinerina I nije statistički značajno razlikovala od P03 Budva, P05 Vis, P06 Korčula. Najviši sadržaj cinerina I (13 %) utvrđen je kod jedinki populacije P06 Korčula, najniži (0,8 % ukupnih piretrina) kod P01 Žman, Dugi otok.



Grafikon 4. Udio cinerina I u ukupnom sadržaju piretrina

*vrijednosti označene istim slovima ne razlikuju se značajno na razini $P < 0.05$

Prosječne vrijednosti cinerina II (Grafikon 5) kretale su se od 3,46 % ukupnih piretrina u populaciji P07 Murter do 5,30 % ukupnih piretrina kod populacije P04 Srđ. U uzorku populacije P05 sakupljene na Visu zabilježene su jedinke s najnižim udjelom cinerina II (1,24 %), a u populacijama P02 i P04 sakupljenim na Sevidu i Srđu utvrđene su jedinke s najvišim vrijednostima cinerina II (10,00 %). Populacije P01 Dugi otok, P02 Sevid, P05 Vis, P06 Korčula i P07 Murter nisu se značajno razlikovale u sadržaju cinerina II.

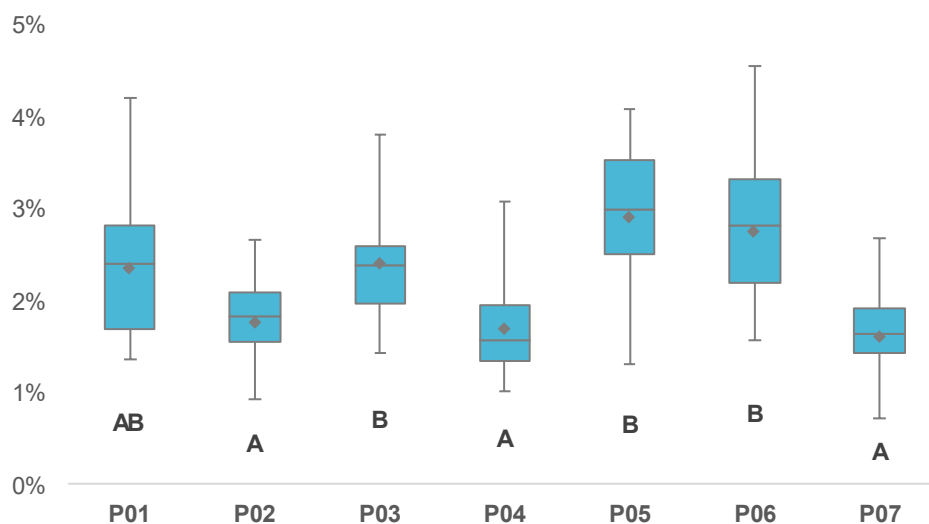


Grafikon 5. Udio cinerina II u ukupnom sadržaju piretrina

*vrijednosti označene istim slovima ne razlikuju se značajno na razini $P < 0.05$

Prosječne vrijednosti jasmolina I (Grafikon 6) iznosile su od 1,61 % ukupnih piretrina kod populacije P07 Murter do 2,92 % kod populacije P05 Vis. U populaciji P07 Murter utvrđene su jedinke s najnižim vrijednostima jasmolina I (0,72 % ukupnih piretrina), a najviši

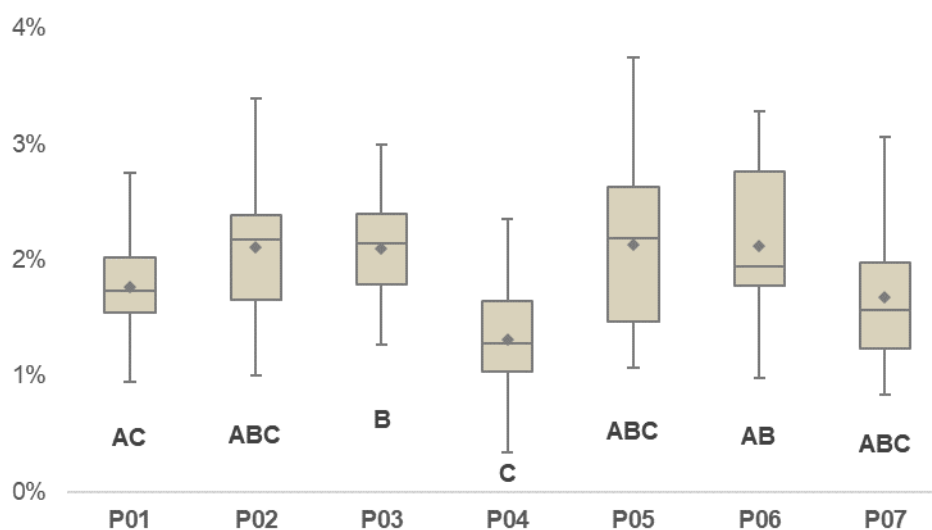
sadržaj od 5,00 % ukupnih piretrina utvrđen je kod jedinki s Korčule P06. U istraživanju Grdiša i sur. (2013) prosječni udio jasmolina I u proučavanim populacijama iznosio je 3,50 % ukupnih piretrina.



Grafikon 6. Udio jasmolina I u ukupnom sadržaju piretrina

*vrijednosti označene istim slovima ne razlikuju se značajno na razini $P < 0.0$ *

Kod populacije P05 Vis utvrđen je najviši udio jasmolina II (Grafikon 7) koji iznosi 2,14 % ukupnih piretrina, međutim, po sadržaju ove sastavnice nije se razlikovala od većine populacija u istraživanju, izuzev P04 Srđ kod koje je utvrđen najniži sadržaj jasmolina II (1,32 % ukupnih piretrina).

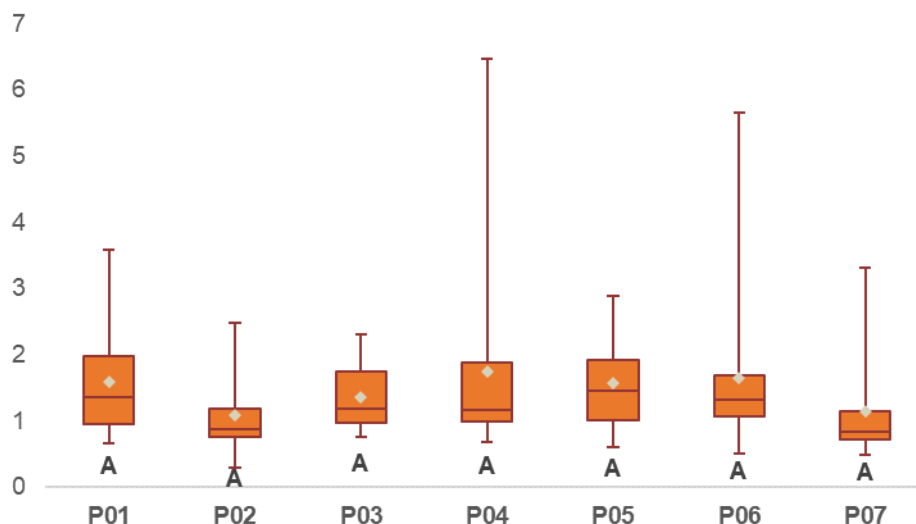


Grafikon 7. Udio jasmolina II u ukupnom sadržaju piretrina

*vrijednosti označene istim slovima ne razlikuju se značajno na razini $P < 0.0$

Prosječne vrijednosti omjera piretrina I i piretrina II (Grafikon 8) kretale su se od 1,08 kod populacije P02 Sevid do 1,74 kod populacije P04 Srđ. U populaciji P02 Sevid zabilježene

su jedinke s najmanjim omjerom piretrina I i piretrina II (2,31). Najveći omjer od 6,46 zabilježena kod jedinki populacije P04 Srđ. Između populacija nisu utvrđene značajne razlike u omjeru piretrina I i II. U usporedbi s istraživanjem (Grdiša i sur., 2013) zabilježen je znatno veći omjer piretrina I i piretrina II. Prosječni omjer u istraživanju kretao se između 0,64 i 3,33, a najviši je omjer zabilježen kod populacije Osor i iznosio je 3,3. U istraživanju (Varga i sur., 2021) najviši omjer zabilježen je kod populacije s Malog Lošinja koji je iznosio 5,88. Utvrđeni omjeri piretrina I i II kod pojedinih jedinki u ovom istraživanju su izrazito visoki i ukazuju na visoki insekticidni potencijal ekstrakata istraživanih populacija.



Grafikon 8. Omjer piretrina I/ piretrina II u istraživanim populacijama

*vrijednosti označene istim slovima ne razlikuju se značajno na razini $P < 0.05$

U već spomenutim istraživanjima Grdiša i sur. (2013) i Varga i sur. (2021) analizirane populacije svrstane su u kemotipove ovisno o sastavu piretrina. Radi usporedbe s ovim istraživanjem u tablici 6. i tablici 7. prikazana su svojstva navedenih kemotipova.

Tablica 6. Kemotipovi dalmatinskog buhača prema Grdiša i sur. (2013)

Kemotip	Opis kemotipa
A	najviši udio (%) piretrina I
B	visoki udio piretrina I i II i niži udio ostalih sastavnica
C	niži udio piretrina I te viši udio cinerina I i II i jasmolina II
D	niži udio piretrina I i II, te viši udio jasmolina I
E	niži udio piretrina I i viši udio cinerina I i II, jasmolina II i piretrina II

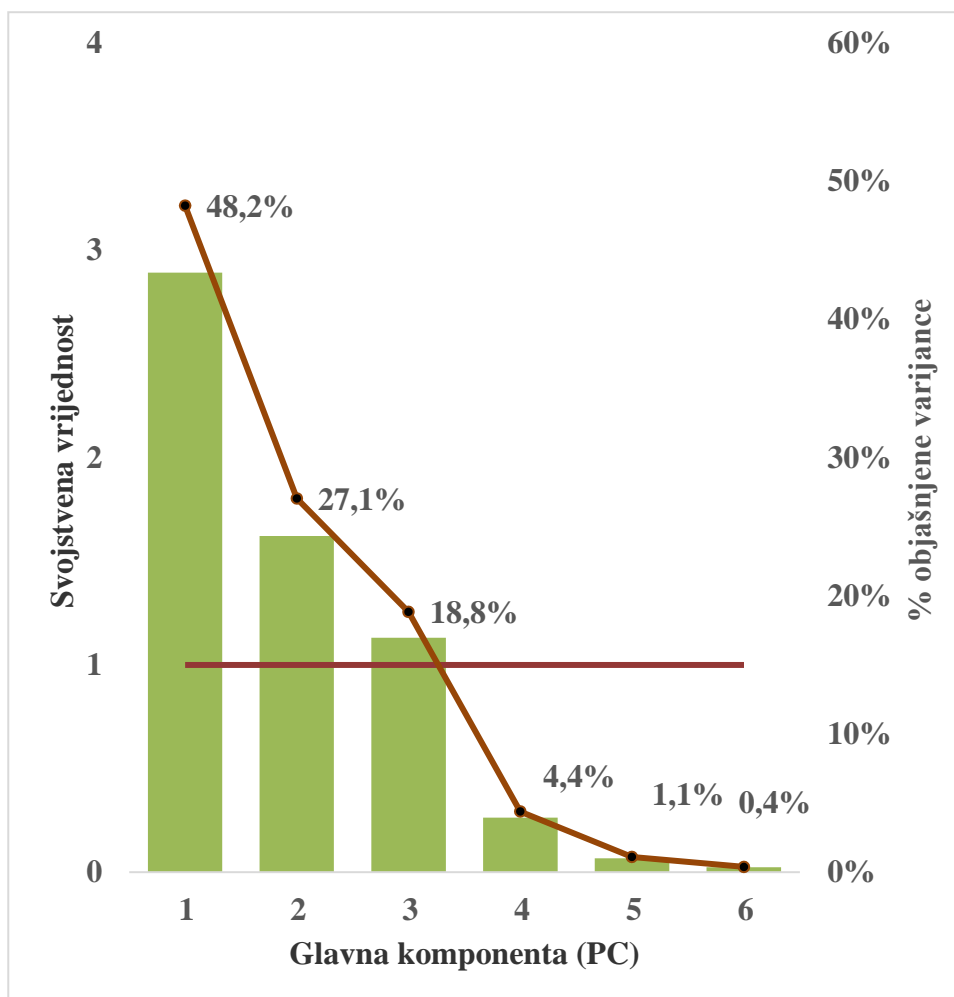
Usporedno s istraživanjem Grdiša i sur. (2013) populacije P01 Žman i P05 Vis mogu se svrstati u kemotip A koji je definiran visokim udjelom piretrina I. Populacije P04 Srđ i P07 Murter sadrže visoki udio piretrina I i piretrina II te manji udio ostalih sastavnica, iz tog razloga se mogu svrstati u kemotip B. U kemotip C, koji je definiran nižim udjelom piretrina I te višim udjelom cinerina I i II te jasmolina II mogu se svrstati populacije P02 Sevid, P03 Budva i P06 Korčula.

Tablica 7. Kemotipovi prema Varga i sur. (2021).

Kemotip	Opis kemotipa
P1	visoki udio (%) piretrina I i niski udio piretrina II, cinerina II i jasmolina II
P2	visoki udio (%) piretrina II
C1/J1	visoki udio cinerina I i jasmolina I
P1/P2	visoki udio piretrina I, piretrina II i visoki omjer piretrina I/II

Prema Varga i sur. (2021) u kemotip P1 koji definira visok udio piretrina I i niži udio piretrina II, cinerina II i jasmolina II mogu se svrstati populacije P01 Žman, Dugi otok i P05 Vis. Visoki udio piretrina II zabilježen kod populacija P02 Sevid i P07 Murter što je karakteristično za kemotip P2. U kemotip C1/J1 koji je definiran visokim udjelom cinerina I i jasmolina I može se uvrstiti populacija P03 Budva. Visoki udio piretrina I, piretrina II i visoki omjer piretrina I/II karakteristično je za kemotip P1/P2 te su takvi rezultati zabilježeni kod populacija P04 Srđ i P06 Korčula.

Analiza glavnih sastavnica (*Principal Component Analysis*; PCA) provedena je na temelju mjerenih kemijskih svojstava (sadržaja šest sastavnica piretrina). Prve tri glavne sastavnice (PC1, PC2, PC3) imale su svojstvenu vrijednost (engl. *eigenvalue*) veću od 1 i objašnjavale su 94,1 % ukupne varijabilnosti u sadržaju sastavnica piretrina analiziranih jedinki/populacija (Grafikon 9). U tablici 8. prikazane su korelacije između prve tri glavne sastavnice (PC) i šest sastavnica piretrina.



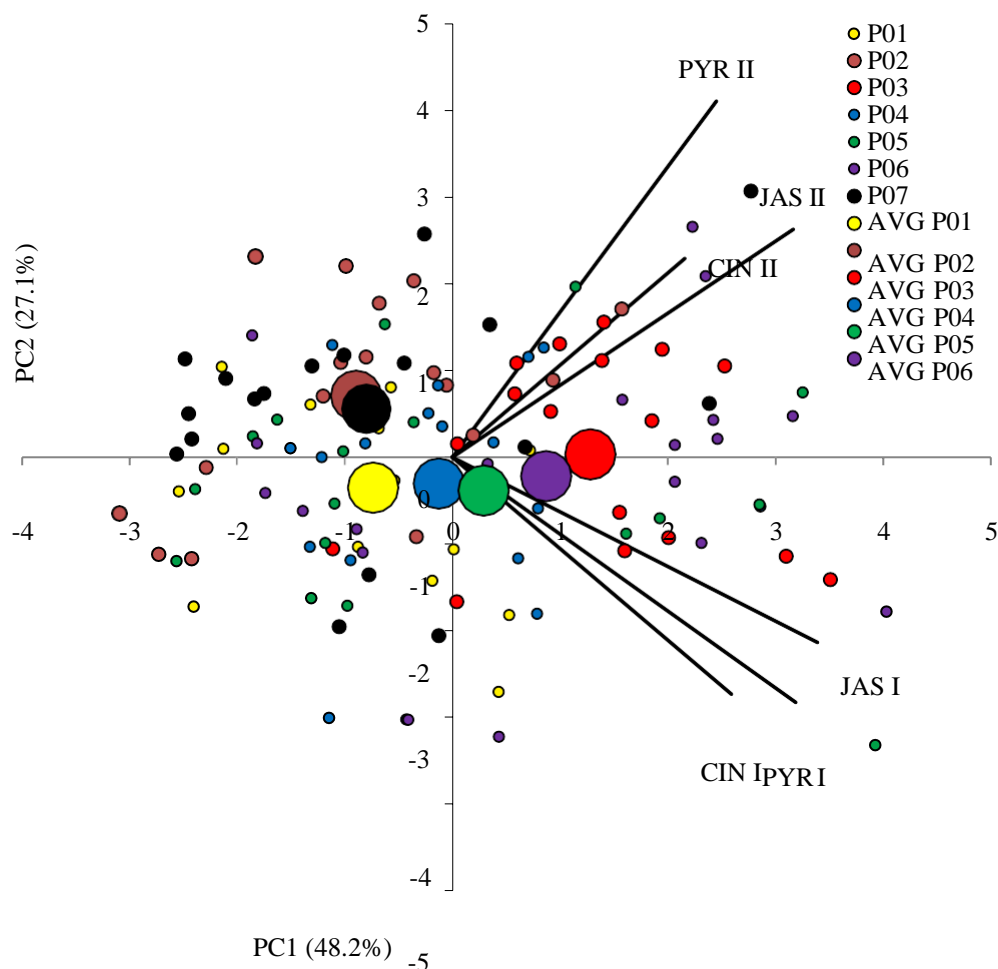
Grafikon 9. Svojstvene vrijednosti glavnih sastavnica (PC) i postotak objašnjene varijance

Tablica 8. Pearsonov korelacijski koeficijent između šest sastavnica piretrina i vrijednosti prve tri glavne sastavnice.

	PC1		PC2		PC3	
Piretrin I	0,77	***	-0,51	***	-0,17	ns
Piretrin II	0,60	***	0,75	***	-0,10	ns
Cinerin I	0,63	***	-0,50	***	0,57	***
Cinerin II	0,52	***	0,42	***	0,73	***
Jasmolin I	0,82	***	-0,39	***	-0,35	***
Jasmolin II	0,77	***	0,48	***	-0,34	***

ns – nije statistički značajno; * statistički značajno na razini $P < 0.05$; ** statistički značajno na razini $P < 0.01$; *** statistički značajno na razini $P < 0.001$

Utvrđena je pozitivna visoko značajna korelacija između prve glavne sastavnice (PC1) i svih sastavnica piretrina; s piretrinom I, jasmolinom I i jasmolinom II utvrđena je jaka korelacija ($r < 0,70$; $P < 0.001$). Pozitivna i visoko značajna korelacija utvrđena je između druge glavne sastavnice (PC2) i piretrina II.



Grafikon 10. Biplot dobiven analizom glavnih sastavnica na temelju šest sastavnica piretrina

Grafikon 10 prikazuje dijagram u kojem je u koordinatnom sustavu točkama prikazan položaj analiziranih jedinki i prosječnih vrijednosti populacija, a vektorima šest sastavnica piretrina. Iz priložene Tablice 8. i Grafikona 10. vidljivo je da je prva glavna sastavnica objasnila 48,2 % ukupne varijabilnosti, dok je druga glavna sastavnica (PC2) objasnila 27,1 % ukupne varijabilnosti između jedinki/populacija u sastavu i sadržaju piretrina. Jedinke, odnosno populacije označene su različitim bojama. Veći krugovi prikazuju prosječne vrijednosti populacija (*avg*). Raspršenost jedinki u prostoru ukazuje na veliku varijabilnost populacija u kemijskom sastavu. Populacijama P03 Budva, P05 Vis, P06 Korčula svojstven je viši prosječni sadržaj piretrina I, jasmolina I i cinerina I, dok su kod P02 Sevid i P07 Murter utvrđene niže prosječne vrijednosti ovih sastavnica. Većinu jedinki P03 Budva karakterizira viši sadržaj piretrina II, jasmolina II i cinerina II. Uz navedenu sličnost u kemijskom sastavu kod populacija P03 Budva, P05 Vis i P06 Korčula, bitno je napomenuti i njihovu geografsku poziciju točnije sve tri populacije uzorkovane su na južnom dijelu Jadrana. Isto tako, populacije P02 Sevid i P07 Murter koje su slične u sadržaju piretrina, geografski pripadaju sjevernoj Dalmaciji.

5. Zaključak

Cilj istraživanja bio je utvrditi sastav i sadržaj piretrina kod sedam populacija buhača uzorkovanih na području prirodne rasprostranjenosti u Hrvatskoj i Crnoj Gori.

Prema dobivenim rezultatima doneseni su sljedeći zaključci:

1. Samonikle populacije dalmatinskog buhača pokazuju veliku kemijsku raznolikost na razini populacija i između populacija.
2. Prosječne vrijednosti sadržaja ukupnih piretrina kretale su se od 0,91 % (P02 Sevid) do 1,27 % mase suhog cvijeta (P03 Budva).
3. Utvrđeni omjeri piretrina I i II kod pojedinih jedinki u ovom istraživanju su izrazito visoki i ukazuju na visoki insekticidni potencijal ekstrakata istraživanih populacija. Populacija sa Srđa ima prosječno najviši omjer piretrina I i II, također i jedinka sa najvišim omjerom je zabilježena u populaciji sa Srđa.
4. Statistički značajna korelacija utvrđena je između jasmolina II i piretrina II te jasmolina I i piretrina I, kao i između ukupnih piretrina i piretrina I te između ukupnih piretrina i piretrina II, jasmolina II i jasmolina I.
5. Svrstavanjem populacija po kemotipovima, utvrđeno je da populacije P01 Žman, Dugi otok i P05 Vis pripadaju u kemotip A kojeg karakterizira visoki udio piretrina I (> 50 %).

6. 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. *Agrochimica* 56: 193 – 206.
2. Ban D., Sladonja B., Luki M., Luk, I., Gani K. K. (2010). Comparison of pyrethrins extraction methods efficiencies. *African Journal of Biotechnology* 9(18): 2702 – 2708.
3. Benić Penava M. (2012). Proizvodnja buhača u Dubrovačkom kotaru između dva Svjetska rata. *Ekonomika i ekohistorija* 8: 108 – 115.
4. 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.
5. Bhat B. K. (1995). Breeding Methodologies Applicable to Pyrethrum. In: *Pyrethrum Flowers: Production, Chemistry, Toxicology, and Uses* (Casida J. E., Quistad G. B.) Oxford University Press, New York, pp.: 67 – 94.
6. Casida J. E. (1973). Biochemistry of the Pyrethrins. In: Casida JE (ed) *Pyrethrum: The Natural Insecticide*. Academic Press, New York, str. 101 – 120.
7. Casida J. E., Quistad G. B. (1995). *Pyrethrum flowers: Production, Chemistry, Toxicology and Uses*. Oxford University Press, New York.
8. Casida, J. E. (1980). Pyrethrum flowers and pyrethroid insecticides. *Environmental health perspectives* (34): 189 – 202.
9. Catalano C., Abbate L., Fata 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. Cattell R. B. (1966). The Scree Plot Test for the Number of Factors. *Multivariate Behavioral Research*, 1, 140-161.
11. Chandler S. E. (1948). The Origin and Early History of the Production of Pyrethrum in Kenya. *Pyrethrum Post* 1 (1): 10 – 13.
12. Crombie L. (1995). Chemistry of pyrethrins. U: Casida JE, Quistad GB (Ur.) *Pyrethrum Flowers: Production, Chemistry, Toxicology and Uses*. Oxford University Press, New York, str. 123 – 193.
13. Duchon S., Bonnet J., Marcombe S. (2009.) Pyrethrum: a mixture of natural pyrethrins has potential for malaria vector control. *J Med Entomol* 46:516 – 522.
14. Essig K., Zhao Z. (2001). Method development and validation of a high-performance liquid chromatographic method for pyrethrum extract. *J Chromatogr Sci* 39:473 – 480.
15. Gallo M., Formato A., Ianniello D., Andolfi A., Conte E., Ciaravolo M., Naviglio D. (2017). Supercritical fluid extraction of pyrethrins from pyrethrum flowers (*Chrysanthemum cinerariifolium*) compared to traditional maceration and cyclic pressurization extraction. *The Journal of Supercritical Fluids* 119: 104 – 112.

16. 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.
17. Grdiša M., Babić S., Periša M., Carović-Stanko K., Kolak I., Liber Z., Jug-Dujaković M., Šatović Z. (2013). Chemical diversity of the natural populations of Dalmatian pyrethrum (*Tanacetum cinerariifolium* /Trevir. /Sch. Bip.) in Croatia. *Chemistry & biodiversity*. 10(3): 460 – 472.
18. Grdiša M., Liber Z., Radosavljević I., Carović-Stanko K., Kolak I., Satovic, Z. (2014). Genetic diversity and structure of Dalmatian pyrethrum (*Tanacetum cinerariifolium* Trevir./Sch./Bip., Asteraceae) within the Balkan refugium. *PloS one* 9(8): 12 – 15.
19. Grdiša M., Jeran N., Varga F., Klepo, T. Ninčević, T., Šatović, Z. (2022). Accumulation Patterns of six pyrethrin compounds across the flower developmental stages— comparative analysis in six natural Dalmatian pyrethrum populations. *Agronomy* 12(2): 252.
20. Heywood V. H. (1976). *Flora Europaea. Plantaginaceae to Compositae* (and *Rubiaceae*). Volume 4. Cambridge: Cambridge University Press: 169 – 171.
21. Hitmi A., Coudret A., Barthomeuf C. (2000). The production of pyrethrins by plant cell and tissue cultures of *Tanacetum cinerariifolium* and *Tagetes* species. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 35:317 – 337.
22. Isman M. B. (2008). Botanical insecticides: for richer, for poorer. *Pest Manag Sci* 64:8 – 11.
23. Jeran N., Grdiša M., Varga F., Šatović Z., Liber Z., Dabić D., Biošić M. (2021). Pyrethrin from Dalmatian pyrethrum (*Tanacetum cinerariifolium* (Trevir.) Sch. Bip.). Biosynthesis, biological activity, methods of extraction and determination 20(5): 907.
24. Kolak I., Šatović Z., Rukavina H., Filipaj B. (1999). Dalmatinski buhač (*Tanacetum cinerariifolium*/Trevir./Sch. Bip). *Sjemenarstvo* 16: 5.
25. Kovačić S., Nikolić T., Ruščić M., Milović M., Stamenković V., Mihelj D., Jasprica N., Bogdanović S., Topić J. (2008). *Flora Jadranske obale i otoka: 250 najčešćih vrsta. Školska knjiga. Zagreb.*
26. Lal R. K., Gupta, M. M., Verma, R. K., Gupta P., Sarkar, S, Singh, S. (2014). Genetic associations and path analysis of economic traits in Pyrethrum (*Chrysanthemum cinerariifolium* Vis.). *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants* 20(1): 92 – 101.
27. Moslemi A. (2017). *The pathology of pyrethrum yield–decline in Australia. Faculty of Veterinary and Agricultural Science. The University of Melbourne, Melbourne.*
28. Nagar A., Chatterjee A., Rehman L. U., Ahmad A., Tandon S. (2015). Comparative extraction and enrichment techniques for pyrethrins from flowers of *Chrysanthemum cinerariaefolium*. *Industrial Crops and Products* 76: 955 – 960.
29. Nikolić T., Milović M., Bogdanović., Jasprica N. (2015). *Endemi u hrvatskoj flori. Alfa d.d. Zagreb.*
30. Benić Penava M. (2012). *Proizvodnja buhača u Dubrovačkom kotaru između dva Svjetska rata. Ekonomska i ekohistorija* 8: 108 – 115.
31. SAS Institute 2004. *SAS SAS/STAT® 9.1 User’s Guide. Cary, NC, USA.*

32. Varga F., Jeran, N., Šatović Z., Biošić M., Grdiša, M. (2021). High diversity of natural Dalmatian pyrethrum based on pyrethrin composition at intra- and interpopulation level. *Phytochemistry* 192: 112934
33. Vasisht K. (2000). Overview of Pyrethrum industry. *Industrial Utilization of Pyrethrum. Workshop Proceedings*: 29 – 30.
34. Yang T., Stoopen G., Wiegers G., Mao J., Wang C., Dicke M., Jongsma M. A. (2012). Pyrethrins protect pyrethrum leaves against attack by western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*. *Journal of Chemical Ecology* 38: 370 – 377.

Elektronski izvori:

1. FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2022). (URL: <https://www.fao.org/faostat/en/>). Pristupljeno: 9. rujna 2023.
2. Nikolić T. (2023): Flora Croatica Database (URL: <http://hirc.botanic.hr/fcd>). Pristupljeno: 1. rujna 2023.

7. Životopis

Laura Gradinščak rođena je 19. studenog 1996. godine u Zagrebu. Pohađala je Osnovnu školu Matka Laginje te je nakon toga upisala Prehrambeno-tehnološku školu. Nakon četverogodišnjeg školovanja postigla je stupanj obrazovanja srednje stručne spreme smjera „Tehničarka nutricionistica“. Agronomski fakultet upisala je akademske godine 2015./2016. Završetkom preddiplomskog studija na smjeru Biljne znanosti postigla je stupanj obrazovanja više stručne spreme te je nakon toga upisala diplomski studij na istom smjeru.

Tijekom studiranja sudjelovala je u raznim događajima i izvanastavnim aktivnostima na fakultetu. Nekoliko puta predstavljala je Agronomski fakultet na Smotri Sveučilišta u Zagrebu. Pohađala je Vrtlarsku grupu gdje je proširila svoje znanje te je teorijsko znanje primjenjivala u praksi. Dugi niz godina bila je aktivan član udruge IAAS (Hrvatsko udruženje studenata agronomije i srodnih znanosti) od kojih je dvije godine izvršavala funkciju Potpredsjednice za komunikacije. Kao Popredsjednica za komunikacije unaprijedila je svoje komunikacijske vještine organizacijom raznih projekata, seminara i sastanaka. Kao član udruge obišla je mnogo poljoprivrednih gospodarstva u Hrvatskoj te proširila svoje znanje o poljoprivrednoj praksi, kako u Hrvatskoj tako i u zemljama diljem svijeta. Uz sve navedene aktivnosti radila je preko studentskog ugovora cijeli studij te je postigla razne poslovne vještine kao što su: poslovna pismenost, snalaženje u različitim poslovnim prilikama te efikasno rješavanje radnih zadataka.