

Povezanost sadržaja piretrina i morfoloških svojstva biljaka dalmatinskog buhača

Klarin, Kim

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:204:742372>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

**POVEZANOST SADRŽAJA PIRETRINA I
MORFOLOŠKIH SVOJSTVA BILJAKA
DALMATINSKOG BUHAČA**

DIPLOMSKI RAD

Kim Klarin

Zagreb, rujan, 2022.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

Diplomski studij:

Ekološka poljoprivreda i agroturizam

**POVEZANOST SADRŽAJA PIRETRINA I
MORFOLOŠKIH SVOJSTVA BILJAKA
DALMATINSKOG BUHAČA**

DIPLOMSKI RAD

Kim Klarin

Mentor:

izv. prof. dr. sc. Martina Grdiša

Neposredni voditelj:

dr. sc. Filip Varga

Zagreb, rujan, 2022.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

**IZJAVA STUDENTA
O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI**

Ja, **Kim Klarin**, JMBAG 0178108979, rođena 11. 8. 1997. u Zagrebu, izjavljujem da sam samostalno izradila diplomski rad pod naslovom:

**POVEZANOST SADRŽAJA PIRETRINA I MORFOLOŠKIH SVOJSTVA BILJAKA
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**

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studentice **Kim Klarin**, JMBAG 0178108979, naslova

**POVEZANOST SADRŽAJA PIRETRINA I MORFOLOŠKIH SVOJSTVA BILJAKA
DALMATINSKOG BUHAČA**

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____, dana _____ .

Povjerenstvo:

potpisi:

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

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

3. doc. dr. sc. Sanja Radman, član

dr. sc. Filip Varga, neposredni voditelj

Zahvala

Zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Martini Grdiša na uloženoj trudu i vremenu, što je bila uz mene kroz moje studiranje na fakultetu. Također veliko hvala što ste vjerovali u mene i bili mi podrška kada mi je to najviše trebalo. Pogotovo Vam moram zahvaliti na strpljenju i razumijevanju.

Zahvaljujem dr. sc. Filipu Vargi na uloženoj trudu i vremenu potrošenom na obradi statističkih podataka. Veliko Vam hvala na strpljivosti tijekom naših konzultacija i što ste se potrudili objasniti mi svaki dio. Hvala što ste bili dostupni za sva pitanja.

Zahvaljujem svojoj najboljoj prijateljici Nataši Virovac koja je bila uz mene kroz jako težak period u mom životu i što mi je bila najveća podrška. Hvala ti što si uvijek poslušala moja jadikovanja i uvijek bila spremna ustupiti utješnu riječ, ali i savjet koji u više navrata na tvoje nezadovoljstvo bih poslušala. Hvala ti što si slušala o ovome radu i bila puna pitanja, savjeta, ali najviše podrške. Hvala ti što vjeruješ u mene.

Zahvaljujem svojoj kolegici, ali i prijateljici Katarini Turkalj koja mi je uvelike pomogla u realizaciji ovog diplomskog rada. Hvala ti što si po najvećem suncu uz mene mjerila morfološka svojstva i brojala mnogobrojne glavice Dalmatinskog buhača. Hvala ti puno što si izdvojila svoje vrijeme i bez ikakvog problema pomogla mi.

Na kraju, zahvaljujem svojoj obitelji na podršci.

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1 Cilj rada	1
2. Pregled literature	2
2.1. Sistematska klasifikacija i rasprostranjenost.....	2
2.2. Morfološka svojstva dalmatinskog buhača	4
2.3. Kemijska svojstva dalmatinskog buhača.....	6
2.3.1. Čimbenici koji utječu na sadržaj piretrina.....	7
2.4. Insekticidna i repelentna svojstva/ Primjena u zaštiti bilja	8
2.5. Tehnologija uzgoja.....	10
2.6. Uzgoj dalmatinskog buhača u svijetu.....	13
3. Materijali i metode	15
3.1. Biljni materijal.....	15
3.2. Poljski pokus	16
3.3. Analiza morfoloških svojstava	17
3.4. Analiza kemijskih svojstava.....	19
3.5. Statistička obrada podataka	20
4. Rezultati i rasprava.....	21
4.1. Morfološka raznolikost	21
4.2. Kemijska raznolikost.....	24
4.3. Povezanost morfološke i kemijske raznolikosti	29
5. Zaključak.....	33
6. Popis literature.....	34
7. Izvori slika.....	40
8. Životopis.....	41

Sažetak

Diplomskog rada studentice **Kim Klarin**, naslova

POVEZANOST SADRŽAJA PIRETRINA I MORFOLOŠKIH SVOJSTVA BILJAKA DALMATINSKOG BUHAČA

Dalmatinski buhač (*Tanacetum cinerariifolium* (Trevis.) Sch. Bip.) je višegodišnja zeljasta biljna vrsta iz porodice glavočika (Asteraceae). Piretrin, ekonomski najvažniji prirodni insekticid dobiva se iz cvjetnih glavica, a sastoji se od šest aktivnih sastavnica: piretrina I i II, cinerina I i II te jasmolina I i II. Cilj istraživanja bio je usporediti varijabilnost morfoloških svojstva biljaka dalmatinskog buhača i sadržaja piretrina u šest prirodnih populacija dalmatinskog buhača te procijeniti njihovu povezanost. Istaživanje je provedeno na šest populacija. Ukupno je evaluirano šest morfoloških svojstava; promjer grma, visina biljke i broj cvatnih glavica po biljci mjereni su na polju, dok su ukupna površina cvata, površina jezičastih i cjevastih cvjetova. Ekstrakcija piretrina iz osušenih glavica dalmatinskog buhača provedena je ultrazvučnom ekstrakcijom, dok je identifikacija i kvantifikacija svih šest sastavnica piretrina provedena tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti. Provedena je analiza varijance kako bi se testirale razlike među populacijama. *Post hoc* usporedbe srednjih vrijednosti populacija provedene su korištenjem Tukey-Kramerovog testa. Odnosi između izmjenjenih svojstava ispitani su korištenjem Pearsonovog koeficijenta korelacije. Prosječna ukupna površina cvatne glavice kretala se od 542,95 mm² u populaciji Pop 4 (Žman) do 886,04 mm² u populaciji Pop 3 (Vrbnik). Prosječne vrijednosti sadržaja ukupnih piretrina kretale su se od 0,96 % mase suhih cvjetova kod populacija Pop 4 (Žman) do 1,38 % mase suhih cvjetova kod populacije Pop 5 (Korčula). Utvrđeno je da ne postoji značajna povezanost između morfoloških svojstva biljaka dalmatinskog buhača i sadržaja piretrina u šest istraživanih populacija dalmatinskog buhača.

Ključne riječi: biopesticid, piretrin, prirodne populacije, *Tanacetum cinerariifolium*

Summary

Of the master's thesis - student **Kim Klarin**, entitled

CORRELATION BETWEEN PYRETHRIN CONTENT WITH THE MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF DALMATIAN PYRETHRUM

Dalmatian pyrethrum (*Tanacetum cinerariifolium* (Trevis.) Sch. Bip.) is a perennial herbaceous plant species from the Asteraceae. Pyrethrin, the economically most important natural insecticide, is extracted from the flower heads. It is composed of six active ingredients; pyrethrin I and II, cinerin I and II, and jasmolin I and II. The aim of the study was to compare the variability of morphological characteristics of Dalmatian pyrethrum plants and pyrethrin content in six natural populations of Dalmatian pyrethrum and to evaluate their relationship. The research was conducted on six populations. Morphological measurements were performed on 10 individuals from each population. A total of six morphological properties were evaluated; bush diameter, plant height and number of flower heads per plant were measured in the field, while total inflorescence area, ligule and tubular flower. The extraction of pyrethrins from the dried heads of the Dalmatian pyrethrum was carried out by ultrasonic extraction, while the identification and quantification of all six components of pyrethrins was carried out by high-performance liquid chromatography. Analysis of variance was performed to test for differences between populations. *Post hoc* comparisons of population means were performed using the Tukey-Kramer test. Relationships between measured traits were examined using Pearson's correlation coefficient. The average total area of the flower heads ranged from 542.95 mm² in population Pop 4 (Žman) to 886.04 mm² in population Pop 3 (Vrbnik). The average values of the content of total pyrethrins ranged from 0.96% of the mass of dry flowers in the population Pop 4 (Žman) to 1.38% of the mass of dry flowers in the population Pop 5 (Korčula). It was determined that there is no significant correlation between the morphological properties of the Dalmatian pyrethrum plants and the pyrethrin content in the six investigated Dalmatian pyrethrum populations.

Keywords: biopesticide, pyrethrin, natural populations, *Tanacetum cinerariifolium*

1. Uvod

Dalmatinski buhač (*Tanacetum cinerariifolium* (Trevis.) Sch. Bip.) je višegodišnja endemična vrsta iz obitelji glavočika (Asteraceae) (Grdiša i sur., 2009). Grmolika je biljna vrsta niskog rasta sa središnjim bijelim jezičastim cvjetovima i rubnim žutim cjevastim cvjetovima (Brewer, 1968). Ova biljna vrsta ograničena je na područje istočne obale Jadranskog mora, a rasprostranjenost joj se proteže od obalnog područja do 200 metara nadmorske visine, ali je prisutna i u višim planinskim područjima Balkana iznad 500 metara nadmorske visine. U Hrvatskoj prirodne populacije mogu se naći u južnim dijelovima istarskog poluotoka (Premantura), Kvarnerskim otocima (Krk, Cres i Lošinj), na Velebitu i Biokovu te duž dalmatinskog priobalja i otoka (Brač, Hvar, Biševo, Vis, Korčula, Lastovo i Mljet) (Nikolić, 2014). Osim u Hrvatskoj, ova vrsta rasprostranjena je i u južnim dijelovima Bosne i Hercegovine te na priobalnim područjima Crne Gore i Albanije (Heywood, 1976).

Ekstrakt dalmatinskog buhača sadrži piretrin, kojeg čini šest insekticidnih estera (piretrin I i II, cinerin I i II, jasmolin I i II), koji se razlikuju po terminalnim supstituentima u bočnim lancima kiseline i alkohola. Piretrini se ekstrahiraju iz cvjetnih glavica, a predstavljaju ekonomski najvažniji prirodni insekticid koji je učinkovit protiv velikog broja štetnih kukaca u kućanstvima, vrtovima, stočarskoj i organskoj poljoprivredi (Yang i sur., 2014). Zbog sve veće zabrinutosti za okoliš te posljedično smanjenje broja dostupnih sintetičkih insekticida kroz uvedene zakone EU-a, javlja se potreba za razvojem održive ekološki prihvatljive zaštite bilja (Jeran i sur., 2020), u kojoj piretrin svavako nalazi svoje mjesto. Dalmatinski buhač se uzgaja u nekoliko država svijeta (Kenija, Tanzanija, Australija, itd), dok danas proizvodnje u Republici Hrvatskoj nema. Proizvodnja je bila značajna početkom 20. stoljeća, a razdoblje od 1910. do 1930. godine smatra se 'zlatnim godinama' proizvodnje u Dalmaciji. Od 1930. godine do početka Drugog Svjetskog rata proizvodnja se drastično smanjila, a otkriće sintetičkog pesticida DDT-a (diklor-difenil-trikloretan), doprinjelo je smanjenju i u konačnici potpunom prestanku proizvodnje dalmatinskog buhača u Dalmaciji (Chandler, 1948). Tijekom šezdesetih godina bilo je pokušaja revitalizacije proizvodnje, međutim, zbog visoke cijene uzgoja, uvoz gotovog proizvoda bila je isplativija opcija (Grdiša, 2009).

U uzgoju dalmatinskog buhača konačni cilj je postizanje što većeg prinosa piretrina po jedinici površine. Sadržaj piretrina ovisi o genotipu (Grdiša i sur., 2014; Varga i sur., 2021), klimatskim uvjetima (Wandahwa i sur. 1996; Ambrožič Dolinšek i sur., 2007), primijenjenim agrotehničkim mjerama (Suraweera i sur., 2017), kao i morfološkim svojstvima biljaka i to u najvećoj mjeri morfološkim svojstvima cvata dalmatinskog buhača. Na prinos i kvalitetu piretrina utječe i promjer grma, visina biljke te broj cvatova po biljci (Parlevliet, 1974; Bhat i Menary, 1986; Pandita i Bhat, 1986; Singh i sur., 1988; Bhat, 1995).

1.1. Cilj rada

Cilj ovog rada je usporediti varijabilnost morfoloških svojstava biljaka dalmatinskog buhača i sadržaja piretrina u šest prirodnih populacija dalmatinskog buhača te procijeniti fenotipske korelacije između svojstava.

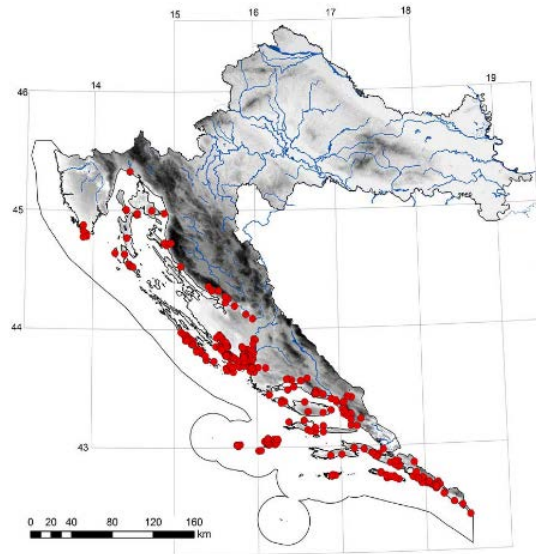
2. Pregled literature

2.1. Sistematska klasifikacija i rasprostranjenost

Dalmatinski buhač (*Tanacetum cinerariifolium* (Trevis.) Sch. Bip.) je višegodišnja zeljasta biljna vrsta iz porodice glavočika (Asteraceae) (Søreng i Cope, 1991). Poznat je i po narodnim nazivima dalmatinska krizantema, buvač, divlji pelin i matrikolda.

Porodica glavočika jedna je od najvećih porodica kritosjemenjača i obuhvaća oko 1300 rodova i 25 000 vrsta (Bremer i Humphries, 1993). Ranijom klasifikacijom, dalmatinski buhač bio je svrstan u rod krizantema (*Chrysanthemum* L.), dok je u novije vrijeme premješten u rod vratića (*Tanacetum* L.) (Søreng i Cope, 1991). U rod *Tanacetum* svrstano je oko 160 vrsta i treći je najveći rod u porodici glavočika, nakon vrstama bogatih rodova *Artemisia* L. (522 vrste) i *Anthemis* L. (175 vrsta) (Oberprieler i sur., 2009). Vrste iz roda *Tanacetum* rasprostranjene su u Europi, Aziji, sjevernoj Africi i Sjevernoj Americi. Neke vrste unesene su u Južnu Afriku, Južnu Ameriku, Australiju i Novi Zeland. Tutin i sur. (1964 – 1980) navode da u Europi rastu 22 vrste koje pripadaju rodu *Tanacetum*. Prema Nikoliću i sur. (2022), u hrvatskoj flori uz dalmatinski buhač raste i obični buhač ili obični vratić (*Tanacetum vulgare* L.), velikolistni buhač ili gronjasti vratić (*Tanacetum macrophyllum* (Waldst. & Kit.) Sch. Bip.), majčinski buhač (*Tanacetum parthenium* (L.) Sch. Bip.) i gronjasti buhač (*Tanacetum corymbosum* (L.) Sch. Bip.) s dvije podvrste *Tanacetum corymbosum* (L.) Sch. Bip. ssp. *clusii* (Fisch. ex Rchb.) Heywood i *Tanacetum corymbosum* (L.) Sch. Bip. ssp. *corymbosum*.

S obzirom na širu geografsku rasprostranjenost, dalmatinski buhač pripada u kategoriju subendema (HAOP, 2022). Biljka je propusnih, skeletom bogatih ili pjeskovito prozračnih tala i pokazatelj je tla sa osrednjom količinom humusa i dušika. Prirodne populacije dalmatinskog buhača u Hrvatskoj su rasprostranjene na suhim travnjacima mediteranske i submediteranske klime, a brojne populacije mogu se naći u južnim dijelovima Istre (Premantura), Kvarnerskim otocima (Krk, Cres, Lošinj), planinama Velebit i Biokovo, te uz dalmatinsko primorje i otocima (Brač, Hvar, Biševo, Vis, Korčula, Lastovo, Mljet) (slika 2.1.1.) (Nikolić, 2022). Osim u Hrvatskoj, ova vrsta rasprostranjena je i u južnim dijelovima Bosne i Hercegovine te na priobalnim područjima Crne Gore i Albanije (Heywood, 1976). Najveći proizvođači dalmatinskog buhača u svijetu su Tanzanija, Kenija, Nova Gvineja, Ekvador i Japan. O samoj proizvodnji u svijetu biti će više riječi u poglavlju 2.7.



Slika 2.1.1. Rasprostranjenost dalmatinskog buhača u Hrvatskoj
Izvor: Nikolić, 2022.

2.2. Morfološka svojstva dalmatinskog buhača

Dalmatinski buhač je višegodišnja zeljasta, busenasta (Kremer, 2018) biljna vrsta koja raste do visine od 30 do 70 cm (Kovačić i sur., 2008; Nikolić i sur., 2015). U povoljnim uvjetima može dosegnuti i visinu od 100 cm. Iz korjenova vrata debljine 0,8 – 1,5 cm izbija razgranat korijen koji prodire u tlo do dubine 30 – 35 cm. Svake godine izbija mnoštvo jednogodišnjih izbojaka, a svaki od njih završava cvatnom glavicom. Stabljike su nerazgranate i kao svi nadzemni dijelovi biljke prekrivene su sitnim sivkastim dlačicama koje biljci daju srebrnast izgled. Prizemni listovi okupljeni na dnu stabljike nalaze se na dugim peteljka dužine 10 – 20 cm, dvostruko su perasti te nepravilno duboko razdijeljeni. Listovi na samoj stabljici su sjedeći te izmjenično poredani. Iako su slični prizemnim listovima, oni se nalaze na kraćoj peteljci (2.2.1.). Brojni ovojni listići cvata raspoređeni su u tri reda, dužine 1,2 – 1,8 cm, izvana su dlakavi, dok s unutarnje strane glatki i bjelkasti. Cvat buhača sastavljen je od cijelih rubnih jezičastih i središnjih cjevastih cvjetova koji formiraju pojedinačnu glavicu (slika 2.2.2.). Središnji zbijeni, dvospolni cjevasti cvjetovi žute su boje, dok su rubni jezičasti bijeli, ženski, s jezičcima dugim 0,8 – 1,6 cm. Središnji cvjetovi sastavljeni su od pet čaškastih i pet kruničnih listića te pet kratkih prikrivenih prašnika. Prema Kolaku i sur. (1999) promjer potpuno otvorenog cvijeta iznosi 2 – 5 cm, a promjer žutih plodnih cvjetova iznosi 1 – 2 cm.



Slika 2.2.1. Listovi i stabljika
Autorica: Kim Klarin, 2020.









Slika 2.2.2. Jezičasti i cjevasti cvjetovi
Autorica: Kim Klarin, 2020.

Složeni cvijet buhača otvara se u fazama. Najprije se otvaraju jezičasti cvjetovi, a zatim se sukcesivno otvaraju cjevasti cvjetovi i to od ruba prema središtu cvata (Chandler, 1951). Nakon što se cjevasti cvjetovi otvore, boja cvjetova počinje blijedjeti i dolazi do dozrijevanja sjemena (Head, 1966a). Nakon dozrijevanja cvatnih glavica novi pupovi se ne razvijaju (Tattersfield, 1931; Faber, 1980). Uz ostale čimbenike, koji će biti objašnjeni u daljnjem tekstu, istraživanja su pokazala da sadržaj piretrina ovisi i o razvojnem stadiju cvatne glavice. Head (1966b) opisuje osam stadija, koje su kasnije revidirali Potts i Menary (1987). Grdiša i sur. (2021) u svome radu predstavljaju novu podjelu koja je prikazana u tablici 2.2.1.

Podrasla jednogradna plodnica sadrži samo jedan sjemeni zametak. Plod buhača je jednosjemena uska pri kraju sušena roška duljine 2,5 – 3,5 cm s 5 – 7 rebara te s nepravilno režnjastim, krunastim, 0,6 – 1 mm dugim papusom (Šilić, 1984; Kremer, 2018). Cvate u svibnju i lipnju, a prema Kolak i sur. (1999) može doživjeti starost i do 12 godina.

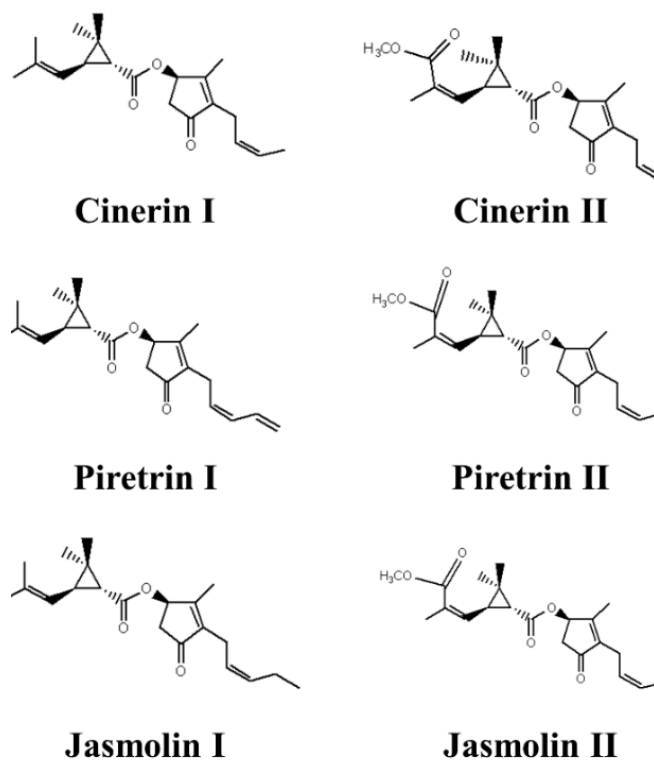
Tablica 2.2.1. Razvojni stadiji cvijeta Dalmatinskog buhača (Grdiša i sur., 2021)

Razvojni stadij	Slika	Opis
RS1		Dobro razvijeni zatvoreni pupovi
RS2		Pojava jezičastih cvjetova iz pupova
RS3		1-2 reda jezičastih cvjetova otvorena
RS4		2-5 reda cjevastih cvjetova otvoreno
RS5		Potpuno otvoreni cjevasti cvjetovi
RS6		Svi cvjetovi otvoreni i pola cjevastih cvjetova smeđe boje
RS7		Jezičasti cvjetovi suhi, cjevasti cvjetovi na cvatu, smeđe boje
RS8		Cjevasti cvjetovi otpali, stabljika suha, sjeme zrelo

2.3. Kemijska svojstva dalmatinskog buhača

Piretrin je smjesa šest estera, od kojih se svaki sastoji od monoterpenoidne kiseline konjugirane s oksilipin alkoholom retrolonskog tipa (LaForge i Barthel, 1947). Biosinteza piretrina počinje u trihomima plodnice, gdje se nalaze enzimi koji su uključeni u proces biosinteze kiselinskih i alkoholnih dijelova piretrina (krizantemska kiselina, 10-karboksikrizantemska kiselina piretrina, alkohol jasmolon i piretrolon), koji zatim prelaze u perikarp u kojem dolazi do sinteze (Ramirez i sur., 2012) piretrinskih estera (Xu i sur., 2019). Piretrini se akumuliraju u međustaničnim prostorima perikarpa koji okružuje klicu (embrij). Tijekom razvoja, klica absorbira piretrine pohranjene u perikarpu majčinskog tkiva te se na taj način štiti od napada štetnika i bolesti (Ramirez i sur., 2012; Xu i sur., 2019). Piretrin I najzastupljeniji je od svih šest sastavnica, dok je piretrin II drugi po zastupljenosti (Grdiša i sur., 2013). Kemijske formule pojedinih sastavnica prikazane su na slici 2.3.1. Prosječni udjeli šest sastavnica piretrina u ekstraktu cvjetova prirodnih populacija buhača su sljedeći: piretrin I (51,7 %), cinerin I (6,0 %), jasmolin I (3,50 %), piretrin II (30,4 %), cinerin II (5,2 %) i jasmolin II (2,6 %) (Grdiša i sur., 2013).

Piretrini se nalaze kao sekundarni metaboliti u cijeloj biljci dalmatinskog buhača, a kao što je već i rečeno, kod odrasle biljke najvećim dijelom u cvatnim glavicama (Head, 1966a), međutim, kroz razvojne stadije biljke to uvijek i nije tako. U istraživanju autora Kikuta i sur. (2012) uspoređen je sadržaj piretrina I u različitim dijelovima odrasle biljke i mladim sadnicama i utvrđeno je da se najveći sadržaj piretrina I nalazi u pupovima (čak četiri puta viši od sadržaja u cvatu), a zatim u listovima sadnica, u kojima je utvrđeno dva puta više piretrina nego u cvatovima. Kod starijih biljaka listovi sadrže značajno manje piretrina od cvatnih glavica (Ambrožič Dolinšek i sur., 2007).



Slika 2.3.1. Kemijske formule šest estera piretrina

Razine piretrina često se navode kao sadržaj piretrina, definiran kao postotak piretrina po jedinici suhe tvari. Omjer piretrina I i piretrina II određuje kvalitetu ekstrakta, a insekticidna aktivnost raste s povećanjem omjera, koji varira između 0,9 – 1,3 (Maciver, 1995). Kako se cvjetovi približavaju zrelosti, bilježi se smanjenje omjera piretrina I i II (Pattenden, 1970).

Najčešće korištene metode ekstrakcije u industriji i laboratorijima su Soxhlet (SOX) (Otterbach i Wenclawiak, 1999), ultrazvučna ekstrakcija (USE) (Kasaj i sur., 1999), superkritična fluidna ekstrakcija (SFE) (Otterbach i Wenclawiack, 1999) i nedavno optimizirana metoda disperzije matrice u čvrstoj fazi (MSPD) (Biošić i sur., 2020).

2.3.1. Čimbenici koji utječu na sadržaj piretrina

Na sadržaj piretrina u osušenim glavicama dalmatinskog buhača utječu brojni čimbenici. Uz morfološka svojstva, sadržaj piretrina ovisi i o već spomenutom razvojnom stadiju biljke (Parlevliet, 1974; Bhat i Menary, 1986; Pandita i Bhat, 1986; Singh i sur., 1988; Bhat, 1995);), vremenu berbe, genotipu, podrijetlu biljke, klimatskim i edafskim čimbenicima (Wandahwa i sur., 1996; Ambrožič Dolinšek i sur., 2007). Na sadržaj piretrina također utječu i agrotehnoški postupci, uključujući sušenje i skladištenje te metode ekstrakcije. Istraživanja su pokazala da je sadržaj piretrina povezan s morfološkim svojstvima biljaka dalmatinskog buhača, kao što su veličina cvata (promjer cjevastih cvjetova) (Pandita i Bhat 1986; Singh i sur., 1988), broj cvjetova po stabljici i broj stabljika, sadržaj suhe tvari u cvatovima (Parlevliet 1974) te prinos cvata (Bhat i Menary, 1986). Kao što je već i spomenuto sadržaj piretrina a ovisi o razvojnom stadiju cvatnih glavica (Gnadinger i Corl, 1930; Suraweera i sur. 2017a; Grdiša i sur., 2021). Dokazano je da prinos i sadržaj piretrina ovise i o promjeru grma i visini biljke (Parlevliet i Contant, 1970; Parlevliet, 1974; Singh i sur., 1987; Ban i sur., 2019).

Kao što je i prethodno rečeno vrijeme berbe, jedan je od čimbenika koji utječe na sadržaj piretrina, a ovisi o već spomenutim razvojnim stadijima cvata. U većini dostupnih istraživanja, dalmatinski buhač spreman je za berbu kada se otvori tri do četiri reda cjevastih cvjetova (Parlevliet i Contant, 1970; Parlevliet, 1974). U svome istraživanju, Bhat (1995) navodi da su cvjetne glavice spremne za berbu kada se otvori polovica cjevastih cvjetova. U toj fazi cvatnje utvrđen je najveći sadržaj piretrina, a prinos piretrina ne raste značajno dalje od ove faze (Head, 1966; Ambrožič Dolinšek i sur., 2007; Grdiša i sur., 2013). Istraživanje Grdiša i sur. (2022) pokazalo je da je optimalno vrijeme berbe cvjetnih glavica stadij FS4, odnosno kada se otvori dva do pet redova jezičastih cvjetova. U navedenom istraživanju maksimalne vrijednosti ukupnog sadržaja piretrina u šest istraženih populacija kretale su se od 0,82 do 1,14 % po masi suhog cvataa, dok je najveća vrijednost omjera piretrina I i piretrina II iznosila 1,92.

Cvjetovi buhača se beru i suše na otvorenom kako bi se izbjegla fermentacija i gubitak piretrina (Morris i sur., 2006). Istraživanja su pokazala da sušenje na temperaturi 50 °C ne samnjuje sadržaj piretrina, ali pri 60 °C dolazi do gubitaka (Beckley, 1952). Otieno i sur. (2020) proveli su istraživanje u kojem zaključuju da ukupni sadržaj piretrina koji se može ekstrahirati iz cvjetova buhača kada se suše na 50 °C u vremenu od 21 sat je 1,44 % s omjerom piretrina I:II od 1:0,73.

2.4. Insekticidna i repelentna svojstva/ Primjena u zaštiti bilja

Botanički insekticidi privlače sve više pozornosti ekoloških i malih poljoprivrednika diljem svijeta jer se smatraju prikladnom alternativom sintetičkim insekticidima. (Ogbaji i sur., 2018). Jedan od botaničkih insekticida za kojim se javlja sve veća potražnja je i piretrin, čija je učinkovita primjena dokumentirana kroz povijest. Osušeni i samljeveni cvjetovi buhača tradicionalno su se koristili u poljoprivredi i hrvatskim kućanstvima za suzbijanje ušiju i buha kod ljudi, a spaljivali su se za tjeranje letećih kukaca. U prah usitnjeni cvatovi prodavali su se pod nazivom '*Dalmatian Insect Powder*' u većini europskih ljekarni devetnaestog stoljeća (Glynne-Jones, 2001), a od 1860. osušeni cvjetovi također su se izvozili u ljekarne SAD-a (McDonnell i sur., 1920). U početku su se biljke dalmatinskog buhača masovno sakupljale s prirodnih staništa, no zbog velike potražnje buhač je 1850-ih uveden poljoprivrednu proizvodnju duž dalmatinskog obalnog područja i otoka. Dalmatinska regija Hrvatske bila je vodeći proizvođač visokokvalitetnog biljnog materijala dalmatinskog buhača sve do Prvog svjetskog rata. Od 1930. godine proizvodnja se naglo smanjila, a otkrićem i uporabom DDT-a dodatno je smanjena i prestaje. Ipak, proizvodnja je uvedena u druge dijelove svijeta (Jeran i sur., 2020).

Buhač je vrlo učinkovit protiv mnogih vrsta štetnika, a njegova je toksičnost za ljude i toplokrvne životinje niska (Duchon i sur., 2009.; Sharafzadeh, 2011.). Piretrini također imaju prednost u odnosu na sintetske insekticide u tome što se brzo razgrađuju pod utjecajem svjetlosti i zraka. Nakon primjene piretrina na tlo, poluživot (vrijeme potrebno da se polovica primijenjenog piretrina razgradi) iznosio je dva sata ili manje (WHO, 2000). Piretrini opstaju mnogo dulje u zatvorenom prostoru nego na otvorenom. Isto tako, piretrini su vrlo topljivi u mastima, no zbog lakoće metaboliziranja ne akumuliraju se u tijelu.

Piretrin djeluje kao kontaktni insekticid (Isman, 2008), Toksični učinak na štetnike započinje prodiranjem kroz kutikulu, nakon čega dolaze do živčanog sustava, te uzrokuje stanje hiperaktivnosti. Živčani impulsi kukca ne uspijevaju se nositi sa spomenutim, što uzrokuje takozvani *knockdown* učinak, nakon čega slijedi paraliza u roku od nekoliko minuta te smrt (Sawicki i Thain, 1962).

Dalmatinski buhač koristi se u komunalnim djelatnostima ili u poljoprivredi zbog svog prirodnog podrijetla i visokog biocidnog učinka (slike 2.4.1. i 2.4.2.). Uglavnom se koristi za zaštitu žitarica, povrća i životinja, a mogao bi se koristiti i za zaštitu kućanstva i životinja od štetnika. Može se primjenjivati u obliku praha cvjetnih glavica, ekstrakta te mirisnih štapića kao zaštita od komaraca koji su najpoznatiji vektori malarije (Toth i sur., 2012).



Slika 2.4.1. Defender™ Pyrethrum Insect Spray

Izvor: <https://www.lovethegarden.com/en/product/defender-pyrethrum-insect-spray-750ml-ready-use-trigger-spray-bottle>



Slika 2.4.2. Pyrethrum 5Ec Natural Organic Insect Pest Spray

Izvor: <https://www.gardenersdream.co.uk/pyrethrum-5ec-natural-organic-insect-pest-spray-p193>

Djelovanje piretrina vidljivo je već u vrlo malim dozama. Na primjer praškasti pripravak piretrina, koji se koriste za suzbijanje štetnika u hortikulturi, sadrže samo 0,3 % do 0,5 % piretrina i koriste se u količinama do 56 kg/ha (Rehman i sur., 2014).

Piretrini su izuzetno otrovni za ribe. Prema Agenciji za otrovne tvari i registar bolesti (*Agency for Toxic Substances and Disease*) srednje letalne doze (doza koja ubija pola testirane populacije) su u rasponu od 9 do 58 ppm. Američke Službe za ribu i divlje životinje (*United States Fish and Wildlife Service*) kanalski som (*Ictalurus punctatus* Rafinesque, 1818) i srebrni losos (*Oncorhynchus kisutch* Walbaum, 1792) su ribe koje su najosjetljivije na piretrin (Johnson i Finley, 1980). Također, Johnson i Finley (1980) navode kako su piretrini otrovniji za ribe u toplim nego u hladnijim vodama. Isto tako, piretrini su otrovni za pčele. U istraživanju Ramadan (1988) srednja letalna doza (LD₅₀) za pčele iznosila je 0,022 mg. Istraživanje Peppera (1941) pokazalo je pozitivan učinak ulja dalmatinskog buhača u suzbijanju kukuruzne uši (*Helicoverpa zea* Boddie, 1850) (slika 2.4.3.) na kukuruзу šećercu (*Zea mays* convar. *saccharata* var. *rugosa*). Bailey (1938) je svojim istraživanjem dokazao da je preparat dalmatinskog buhača uspješno suzbija nekoliko vrsta tripsa (*Thysanoptera*) na mnogim voćnim kulturama, uključujući groždani trips (*Drepanothrips reuteri* Uzel, 1895), cvjetni trips (*Thrips setosus* Moulton, 1928) i trips citrusa (*Heliethrips haemorrhoidalis* Bouché, 1833). Učinkovitost spreja na bazi piretrina u suzbijanju ličinki moljaca istražena je u radu Yothersa i sur. (1942) i dokazano je da ih dalmatinski buhač suzbija u stadiju kukuljice. Buhač se u ovom slučaju pokazao kao dodatna mjera kontrole. Dalmatinski buhač se već dugi niz godina koristi u borbi protiv štetnika kupusa jer je posebno učinkovit protiv kupusnog moljca (*Trichoplusia ni* Hübner, 1803) (slika 2.4.4.) što su već 1934. god. Walker i Anderson dokazali u svojem istraživanju.



Slika 2.4.3. Gusjenica kukuruzne uši
(*Helicoverpa zea*)

Izvor: www.researchgate.net



Slika 2.4.4. Gusjenica kupusnog moljac
(*Trichoplusia ni*)

Izvor: <https://entomology.ca.uky.edu>

2.5. Tehnologija uzgoja

Dalmatinski buhač najbolje uspjeva na duboko i dobro dreniranim tlima izloženim suncu te preferira sunčanu i toplu klimu s kratkom i blagom zimom i hladnim ljetom (Kolak, 1999; Savković, 2017). Roest (1976) je proveo istraživanje o utjecaju noćne, dnevne i prosječne temperature na cvatnju buhača. Zamijetio je da naizmjenično niske noćne (ispod 13 °C) i tople dnevne temperature (15 – 20 °C) rezultiraju povećanom proizvodnjom cvjetova, dok prosječne temperature iznad 21 °C u potpunosti inhibiraju cvatnju. Područja s hladnim, maglovitim mjesecima daju slab prinos. Razlog tomu su fiziološka oštećenja biljaka, nedostatak topline potreban za snažan rast te povećana učestalost bolesti pupova. Prema Parlevliet (1970) područja s godišnjom količinom padalina između 1000 i 1400 mm pogodna su za uzgoj, dok količine veće od 1400 mm povećavaju učestalost pojave truleži korijena i pupova.

Uzgoj dalmatinskog buhača provodi se izravnom sjetvom sjemena na polje, proizvodnjom presadnica u kljalištu, ali i vegetativnim oblikom razmnožavanja tj. dijeljenjem starijeg busena (Kolak, 1999). Kod direktne sjetve sjemena obrada tla započinje plitkim oranjem krajem ljeta i početkom jeseni, a u slučaju pojave korova potrebno je obaviti duboko oranje na dubini od 30 cm. Dalmatinski buhač može se saditi u jesen ili proljeće. Jesenska sadnja obavlja se u listopadu ili u studenom te je kao takva povoljnija zato što već u prvoj godini može se postići veća količina cvjetova. U odnosu na jesensku, proljetnu sadnju potrebno je napraviti što ranije (Stepanović i sur., 2009). Sjeme se sije na razmaku od 50 cm između redova, 20-25 cm u redu i na dubini od 1 cm. Sjetva se obavlja ručno ili sijačicama te je potrebno 1-1,2 kg/ha sjemena. Uzgoj sadnica provodi se u toplim kljalištima, ali i u hladnim lijehama. Sjetva sjemena za proizvodnju presadnica odvija se u veljači ili ožujku, a uzgojene presadnice presađuju se u travnju ili početkom svibnja. Sadnja se također može provesti i u jesen ako položaj nije podložen niskim temperaturama. Na 1 ha površine moguće je zasaditi 50 000- 55 000 presadnica. Kod vegetativnog načina razmnožavanja koriste se starije biljke (tri do pet godina) koje su završile eksploataciju i dobro su razvijene. Dijeljenje se provodi uzdužnim rezanjem glave korijena pri čemu se može dobiti oko pet do sedam novih sadnica. Uzgojene presadnice iz sjemena ili dobivene dijeljenjem buseva skraćuju vegetaciju u godini sadnje za 2.5-3 mjeseca. Nakon sjetve ili sadnje obavlja se zalijevanje i popunjavanje praznih mjesta.

Nasadi se održavaju međurednom kultivacijom i pljevljenjem sve do zatvaranja sklopa (slika 2.5.1.). Ogrtanje biljaka pred zimu pokazalo se kao korisna agrotehnička mjera protiv smrzavanja (Kolak, 1999).



Slika 2.5.1. Uklanjanje korova u usjevu dalmatinskog buhača u Keniji

Izvor: <https://farmbizafrica.com>

Bolest pravih i lažnih pupova uvelike utječu na normalan rast i razvoj dalmatinskog buhača. Neka istraživanja (Robinson, 1963; Pyrethrum Board of Kenya, 1992) pokazuju da je bolest uzrokovana napadom gljivice *Ramularia bellunensis* Spegazzini, *Alternaria tenuis* (Fr.) Keissl i *Didymella pinodes* (Berk. i A. Bloxam) Petr i oblića *Aphelenchoides ritzemabosi* Steiner (Schwartz, 1911). Prema Bullocku (1961), *A. ritzemubosi* je lisna oblić koji uzrokuje klorozu i nekrozu lišća, ali se ne smatra značajnim štetnikom. Gljiva *R. bellunensis* inficira cvjetne pupove kroz listove te naposljetku prodire u cvjetnu stapku. Pupoljci se počinju sušiti i postaju smeđi ili ljubičasto sivi, cvjetna stabljika vene do 2,5 cm ispod pupoljka te listovi odumiru. Bolest lažnih pupova fiziološki je poremećaj povezan s genetskom konstitucijom pojedinih biljaka ili klonova i uzrokovan je uvjetima okoline. Iako utječe na pupoljke svih veličina, oni promjera između 1 i 2 mm su najviše pogođeni, ali se ne mogu vidjeti jer su sakriveni unutar lišća. Karakterističan simptom bolesti lažnih pupova je brzo odumiranje nekoliko centimetara stabljike ispod mrtvog pupa, nakon čega slijedi savijanje mrtve stabljike (Robinson, 1963).

Truljenje korijena uzrokuju gljive *Fusarium graminearum* (Schwin.) Petch, *Sclerotinia minor* Jagger, *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary i oblići roda *Pratylenchus* (Pyrethrum Board of Kenya, 1992). Ulazne točke gljivama su rane nastale mehaničkim oštećenjima i probijanje oblića, a zahvaćene biljke polako venu i umiru. Korijenova trulež lokalno je rasprostranjena i povezana je s lošom drenažom tla (Robinson, 1963; Acland, 1971). Prava bolest pupova i trulež korijena suzbijaju se prskanjem fungicidom Benlate u količini od 0,5 kg/ha svaka dva tjedna. Preventivne mjere uključuju: spaljivanje posječenih biljaka na kraju sezone, sadnja materijala bez bolesti tretiranog fungicidima kako bi se zaštitile rane uzrokovane dijeljenjem, primjena nematocida u područjima gdje prevladavaju oblići i prakticiranje plodoreda kako bi se smanjila učestalost bolesti. Praktičnije rješenje je uzgoj sorti otpornih na bolesti.

U Keniji je poznato da dvije različite vrste tripsa uzrokuju ekonomske štete. Lisni trips (*Thrips nigropilosus* Uzel, 1895) je najčešći uzročnik šteta u nasadu, a cvjetni trips (*Thrips tabaci* Lindeman, 1889) utječe na proizvodnju sjemena. *T. nigropilosus* koji je prvi put otkriven u Keniji 1957. oštećuje epidermu lista te tako smanjuje sadržaj klorofila i hrani se sadržajem stanica. Javlja se isušivanje listova i oštećenja lišća popraćeno srebrnastim mrljama koje kasnije postaju nekrotične. Nimfe provode prvu i drugu fazu života na lišću, dok treću i posljednju fazu provode u tlu. *Thrips tabaci* prvi put zabilježen u Keniji 1937. godine, živi isključivo u cvijetu gdje napada latice i cvjetove čineći ih smeđima (Bullock, 1961). Budući da gubitak može biti vrlo velik (43 %) u sušnoj sezoni, poljoprivrednicima se savjetuje prskanje već kod pojave prvih listova (Smith i Hanson, 1991). Preventivne mjere uključuju uklanjanje korova poput sitnocvjetne konice (*Galinsoga parviflora* Cav) (slika 2.5.2) i dlakavog dvozubca (*Bidens pilosa* L.) (slika 2.5.3.) koji su alternativni domaćini lisnog tripsa.



Slika 2.5.2. Sitnocvjetne konice
(*Galinsoga parviflora* Cav)
Izvor: <https://www.plantea.com.hr>



Slika 2.5.3. Dlakavi dvozub
(*Bidens pilosa* L.)
Izvor: <https://www.researchgate.net>

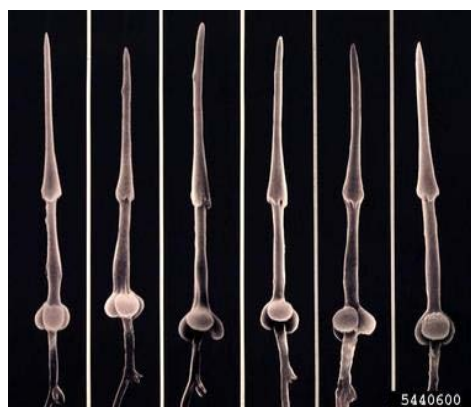
Crveni pauk (*Tetranychus urticae* C. L. Koch, 1836) je štetnik od gospodarske važnosti u područjima s izrazitom sušnom sezonom (Acland, 1971) (slika 2.5.4.). U Keniji se štetnik nalazi na svim područjima uzgoja dalmatinskog buhača i može se suzbiti prskanjem dimetoata 40 % i tiodena 35 % po površini od 11 ha. Ranija istraživanja Bullock (1961) i Robinson (1963) ukazuju na to da je buhač ili tolerantan na napad oblića (*Meloidogyne hapla* Chitwood, 1949) (slika 2.5.5.) ili da napad vrste ne šteti normalnom rastu biljke. Kasnije je, međutim, otkriveno da oblići mogu biti prilično opasni tijekom sušnog razdoblja (Acland, 1971). Napadaju korijenje buhača i stvaraju čvorove, te biljke izgledaju zdrave tijekom kišne sezone, dok se simptomi napada pojavljuju za vrijeme sušnog razdoblja. Preventivne mjere uključuju: sadnju materijala bez bolesti, uzgoj otpornih sorti i korištenje žitarica (npr. pšenice) u plodoredu (Johnson, 1985).

U Keniji, buhač kontinuirano cvate u razdoblju od osam do devet mjeseci, zbog čega se berba obavlja ručno. U tom razdoblju prisutne su sve faze razvoja cvijeta.



Slika 2.5.4. Crveni pauk (*Tetranychus urticae*)

Izvor: <https://en.wikipedia.org>



Slika 2.5.5. Oblici (*Meloidogyne hapla*)

Izvor: <https://www.ipmimages.org>

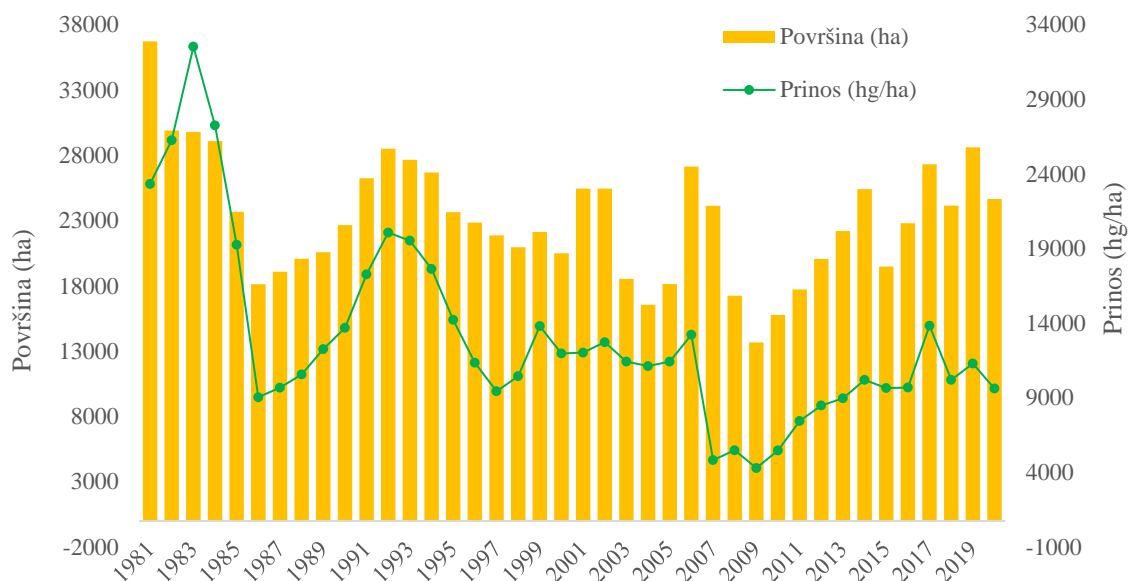
Nakon berbe, cvjetne glavice potrebno je odmah osušiti kako bi se izbjegla fermentacija i gubitak piretrina. Cvjetovi se suše u optimalnim uvjetima, a zatim se melju u sitne čestice prije ekstrakcije. Fino mljeveni cvjetni prah prikladniji je za upotrebu kao insekticid, dok grubo mljeveni ima dugi vijek trajanja i manje se kvari (Ang'endu, 1994). Mali poljoprivrednici cvjetne glavice stavljaju na polietilenske plahte na izravno sunce ili u sjenu u trajanju od dva tjedna. Napredniji uzgajivači koriste solarne sušare kako bi se ubrzao proces sušenja (Otieno i sur., 2020). U Japanu, cvjetovi se vješaju naopako kako bi se osušili, zato što se smatralo da se tako povećava koncentracija piretrina u cvjetovima. Tijekom procesa sušenja, temperatura sušenja i sadržaj vlage u cvjetovima su od velikog značaja i treba ih pratiti. Razna istraživanja pokazala su da su piretrini termički i fotokemijski nestabilni. Toplina uzrokuje promjenu u strukturi piretrina te formiranje izopiretrina koji su insekticidno neaktivni. Velike su šanse da rezonantna konjugacija nezasićenog bočnog lanca s ciklopropanskim prstenom obuhvaća nestanak vitalno aktiviranog metilena pored prstena i tako smanjuje biološku aktivnost u nastalim izopiretrinima (Wang i sur., 2017).

2.6. Uzgoj dalmatinskog buhača u svijetu

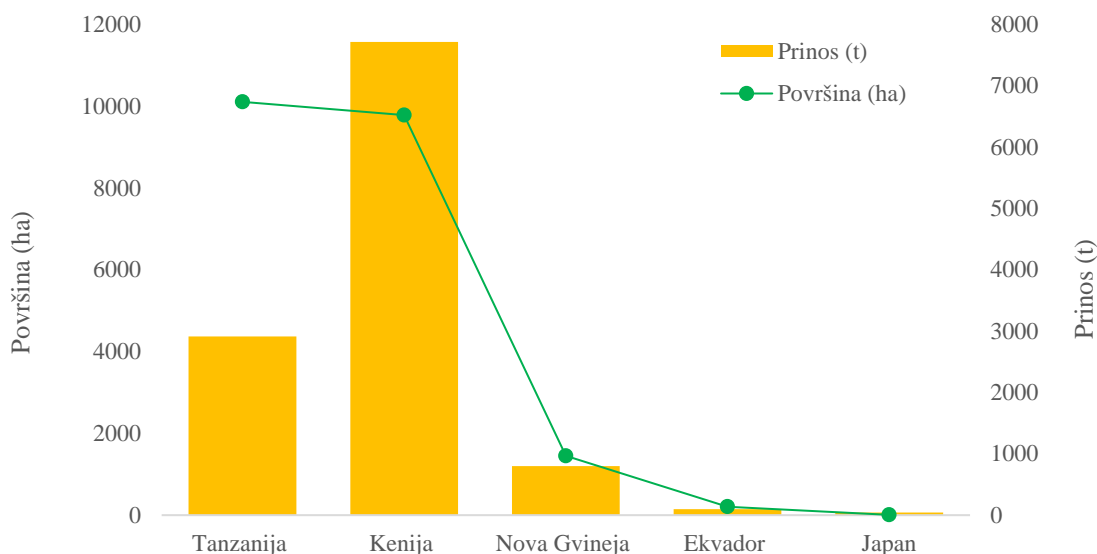
Prema podacima FAOSTAT-a u razdoblju od 1981. do 2020. godine u svijetu dalmatinski buhač uzgajao se na prosječno 23 734 ha, a prosječni prinos iznosio je oko 1 336 kg/ha. U grafu 2.6.1. prikazano je kretanje površina i prinosa dalmatinskog buhača u svijetu u razdoblju od 1981. do 2020. godine. Godine 1981. postignuta je najveća proizvodna površina od 36 740 ha, dok je 1983. godine ostvaren najviši prinos (32 546 t) (Jeran i sur., 2020).

Prosječna svjetska proizvodnja suhog cvijeta dalmatinskog buhača je od 1981. do 2020. godine iznosila 5615,87 t. Najveći svjetski proizvođači u razdoblju od 1981. do 2020. godine su Tanzanija (10104,28 ha), Kenija (9780,36 ha) i Papua Nova Gvineja (1448,33 ha) (graf 2.6.2.). Najveći prosječni prinos u razdoblju od 1981. do 2020. (graf 2.1.3.) godine ostvarile su Kenija (7711,925 t), Tanzanija (2912,925 t) i Papua Nova Gvineja (799,45 t). Svjetske površine pod buhačem 2020. godine iznosile su 24 666 ha, a najveće proizvodne površine nalazile su se u Tanzaniji (15 012 ha) i Keniji (2 622 ha). U Keniji, dalmatinski buhač, peta je po važnosti kultura u proizvodnji, a izvozi se ponajviše u SAD, Indiju te zemlje Južne Amerike i

Skandinavije. Proizvodnja i prerada, odnosno prodaja cvjetova buhača, kao i oplemenjivanje novih kultivira nalazi se pod Kenijskim vijećem za buhač (Kenya Tourist Board, 1999). Ekstrakti buhača uglavnom se izvoze u SAD, Europu i azijske zemlje. U bazi FAOSTAT nisu dostupni podaci o uzgoju dalmatinskog buhača u Australiji. Prema dostupnim podacima glavnog australskog proizvođača, Botanical Resources Australia, u 2017. proizvodnja u Australiji (Tasmanija) iznosila je cca. 7000 t (BRA 2021). Nažalost, u Republici Hrvatskoj nema značajnog uzgoja dalmatinskog buhača.



Graf 2.6.1. Kretanje površina i prinosa dalmatinskog buhača u svijetu u razdoblju od 1981. do 2020. godine (FAOSTAT, 2022)

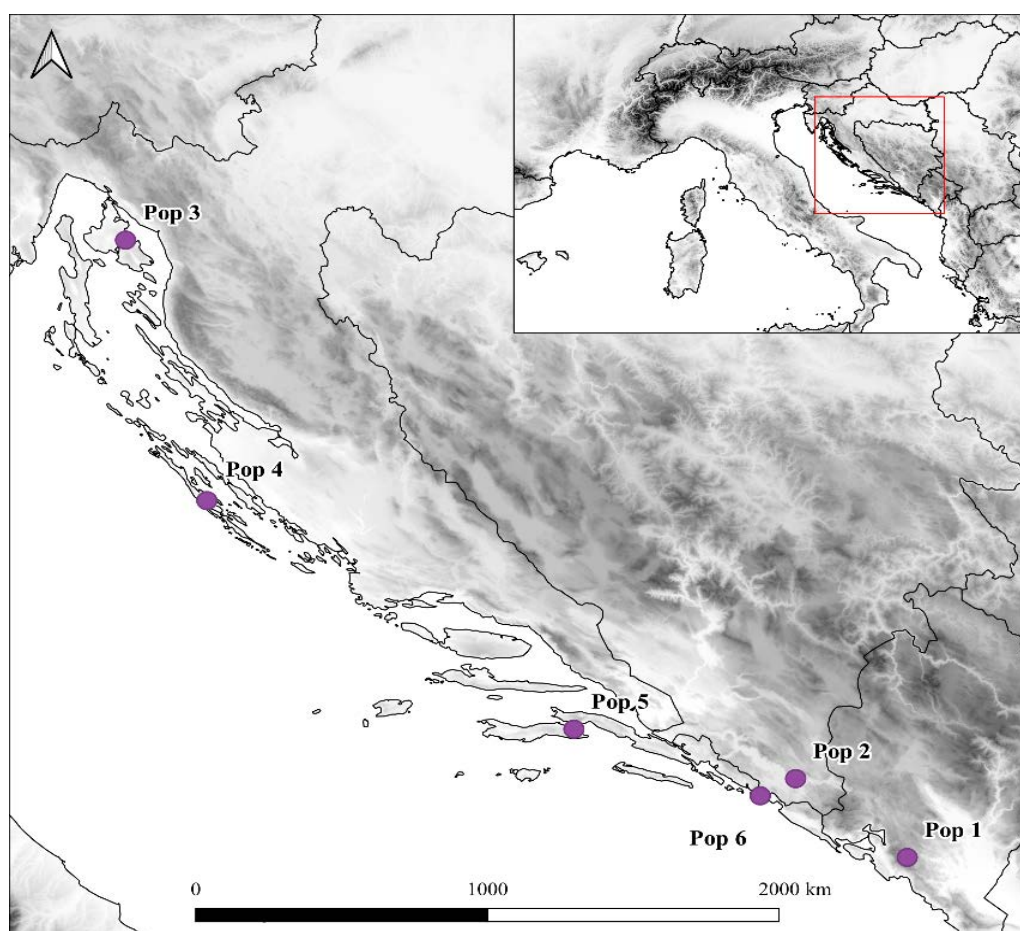


Graf 2.6.2. Prikaz površina pod dalmatinskim buhačem i prinosa u razdoblju od 1981. do 2020. u pet država s najvećom proizvodnjom u Svijetu (FAOSTAT)

3. Materijali i metode

3.1. Biljni materijal

Istraživanje je provedeno na šest prirodnih populacija dalmatinskog buhača (Pop 1 – Pop 6). Slika 3.1.1. prikazuje lokacije prikupljanja sjemena istraživanih populacija, dok tablica 3.1.1. sadrži podatke o lokaciji prikupljanja, broju primke, zemljopisnoj širini i dužini te nadmorskoj visini. Primke istraživanih populacija sastavni su dio Kolekcije ljekovitog i aromatičnog bilja, Nacionalne banke biljnih gena Republike Hrvatske. Prikazani podaci dostupni su u Hrvatskoj bazi podataka o biljnim genetskim izvorima (*Croatian plant genetic resources database - CPGRD*).



Slika 3.1.1. Lokacije prikupljanja istraživanih populacija dalmatinskog buhača
Autor: Filip Varga, 2021.

Tablica 3.1.1. Podaci o primkama dalmatinskog buhača uključenim u istraživanje

Oznaka populacije	Lokacija	MAP*	Zemljopisna širina	Zemljopisna duljina	Nadmorska visina
Pop1	Lovćen (ME)	MAP02979	42° 21' 59" N	18° 53' 00" E	1031 m
Pop2	Trebinje (BIH)	MAP02969	42° 43'14"N	18° 18'10" E	507 m
Pop3	Vrbnik (CRO)	MAP02970	45° 04'15" N	14° 39'49" E	100 m
Pop4	Žman, Dugi otok (CRO)	MAP02959	43°56'26" N	15°08'25" E	85 m
Pop5	Korčula (CRO)	MAP02824	42°56'58" N	17°07'41" E	118 m
Pop6	Srđ (CRO)	MAP02966	42°38'56" N	18°06'44" E	382 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: 13.04.2022.

3.2. Poljski pokus

Poljski pokus postavljen je u svibnju 2019. na Pokušalištu Zavoda za sjemenarstvo, Maksimir (slika 3.2.1., slika 3.2.2), Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Presadnice dalmatinskog buhača proizvedene su iz sjemena u zaštićenom prostoru. Poljski pokus postavljen je po slučajnom bloknom rasporedu. Uključivao je šest populacija dalmatinskog buhača, a svaka populacija bila je predstavljena s 10 jedinki. Razmak unutar redova iznosio je 100 cm, a između redova 120 cm.



Slika 3.2.1. Pokušalište Maksimir
Autorica: Kim Klarin, 2020.



Slika 3.2.2. Pokušalište Maksimir
Autorica: Kim Klarin, 2020.

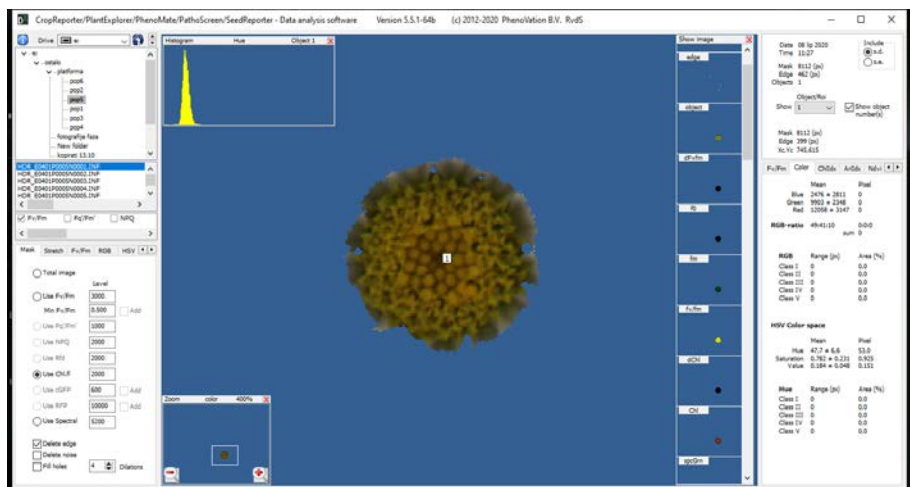
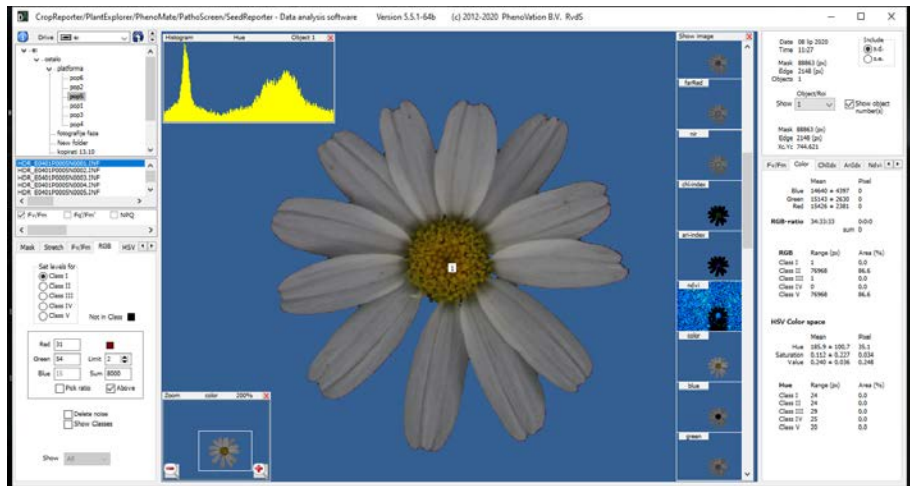
3.3. Analiza morfoloških svojstava

Morfološka mjerenja provedena su u drugoj godini pokusa u razdoblju od svibnja do lipnja 2020. godine. Na 10 jedinki iz svake populacije ukupno je evaluirano šest morfoloških svojstava; promjer grma, visina biljke i broj cvatnih glavica po biljci mjereni su na polju, dok su ukupna površina cvata, površina jezičastih i cjevastih cvjetova izmjereni pomoću CropReporter® multispektralne platforme (PhenoVation, Wageningen, Nizozemska) u kontroliranim uvjetima. Visina grma dalmatinskog buhača mjerena je kao dužina središnje stabljike od površine tla do visine zadnjega cvata biljke (Tablica 3.3.1.).

Tablica 3.3.1. Oznake morfoloških svojstava

Svojstvo	Oznaka	Mjerna jedinica
Promjer grma	BD	cm
Visina grma	PH	cm
Broj cvatnih glavica	NF	
Ukupna površina cvatne glavice	TA	mm ²
Površina cjevastih cvjetova	CA	mm ²
Površina jezičastih cvjetova	WFA	mm ²

Snimanje površine cvatnih glavica provedeno je na deset jedinki iz svake populacije, pomoću već spomenutog CropReportera. CropReporter se sastoji od ormarića sa sustavom kamera: CCD-kamerom s optičkim filtarskim kotačićem i jedinicom za fokusiranje, integriranim crvenim LED diodama visokog intenziteta za pobuđivanje fotosinteze, LED diodama u 6 spektralnih vrpca za spektralno snimanje i atonično svjetlo za snimanje fotosinteze i integrirano upravljačko računalo. Sve slike su snimljene istim objektivom i CCD-kamerom. Time se omogućava analiza slike na bazi piksel do piksela. Ukupno filter kotačić može primiti deset optičkih filtera. Slike se snimaju različitim kombinacijama svjetla i optičkih filtara ispred CCD-kamere. Jedinstveno svojstvo CropReportera je da se na bilo kojoj udaljenosti između 10 i 140 cm fokusiranjem optičkog sustava može dobiti oštra slika. Nadalje, to omogućuje snimanje u rasponu od sitnih detalja do velikih slika cijele biljke. Slike su zatim obrađene u programu Data Analysis (DA) v. 5.5.1-64b (slika 3.3.1.), a kao rezultat dobiveni su podaci o površini središnjih cvjetova i cijeloukupna površina glavice. Površina bijelih cvjetova dalmatinskog buhača dobivena je oduzimanje površine središnjih cvjetova od cijeloukupne površine. Rezultati mjerenja površina dobiveni pomoću programa DA bili su izraženi u pikselima te su pretvoreni , u mm², pri čemu je 1 piksel jednak 0,01 mm². Ovako obrađeni podaci pridodani su rezultatima ostalih izmjerenih morfoloških svojstava te statistički obrađeni.



Slika 3.3.1 Postupak određivanja površine cjevastih i jezičastih cvjetova te ukupne površine cvatne glavice pomoću programa Data Analysis.

Autorica: Kim Klarin, 2021.

3.4. Analiza kemijskih svojstava

Ekstrakcija svih šest sastavnica piretrina (Tablica 3.4.1.) iz osušenih cvatova dalmatinskog buhača provedena je prema postupku opisanom u radu autora Babić i sur. (2012). Ekstrakcija je provedena iz 0,25 g biljnog materijala, korištenjem acetona kao ekstrakcijskog otapala, pri konstantnoj temperaturi od 50 °C tijekom 60 minuta, u ultrazvučnoj kupelji (Labsonic LBS2-10, FALC, Treviglio, Italija).

Tablica 3.4.1. Oznake kemijskih svojstva

Svojstvo	Oznaka	Mjerna jedinica
Piretrin I	PIR I	mg/g
Piretrin II	PIR II	mg/g
Cinerin I	CIN I	mg/g
Cinerin II	CIN II	mg/g
Jasmolin I	JAS I	mg/g
Jasmolin II	JAS II	mg/g
Ukupni piretrini	PIRETRINI	mg/g

Detekcija i kvantifikacija šest spojeva piretrina provedena je tekućinskom kromatografijom visoke učinkovitosti (HPLC-DAD-UV/VIS; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD) na Zorbax SB C18 250 × 4,6 mm, veličine čestica 5 μm (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD). Korišteno 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 3.4.2.). Brzina protoka mobilne faze bila je 1,4 mL/L, dok je volumen injektiranja bio 5 μL.

Tablica 3.4.2 Gradijent pokretne faze korišten za separaciju sastavnica piretrina

Vrijeme (minute)	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

Na temelju 12 svojstava; od kojih je šest morfoloških, a šest biokemijskih provedena je analiza varijance kako bi se testirale razlike među populacijama s obzirom na mjerena svojstva. *Post-hoc* usporedbe srednjih vrijednosti populacija provedene su korištenjem Tukey-Kramerovog testa. Odnosi između izmjerenih svojstava ispitani su korištenjem Pearsonovog koeficijenta korelacije. Na temelju svih svojstava provedena je i analiza glavnih sastavnica (eng. *Principal Component Analysis* - PCA). Broj glavnih sastavnica određen je na temelju svojstvenih vrijednosti (eng. *eigenvalues*) glavnih sastavnica, 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 i prosjeci populacija, a vektorima morfološka i kemijska svojstva. Sve analize provedene su pomoću statističkog programa SAS.

4. Rezultati i rasprava

4.1. Morfološka raznolikost

Korelacija između broja cvjetova (NF) i promjera grma (BD) bila je visoko značajno pozitivna ($r = 0,822$), kao i ukupna površina cvatne glavice (TA) s ukupnom površinom jezičastih cvjetova (WFA) ($r = 0,995$). Površina cjevastih cvjetova (CA) bila je umjereno pozitivno korelirana s površinom jezičastih cvjetova te ukupnom površinom cvatne glavice (Tablica 4.1.).

Tablica 4.1.1. Pearsonov koeficijent korelacije između šest morfoloških svojstva

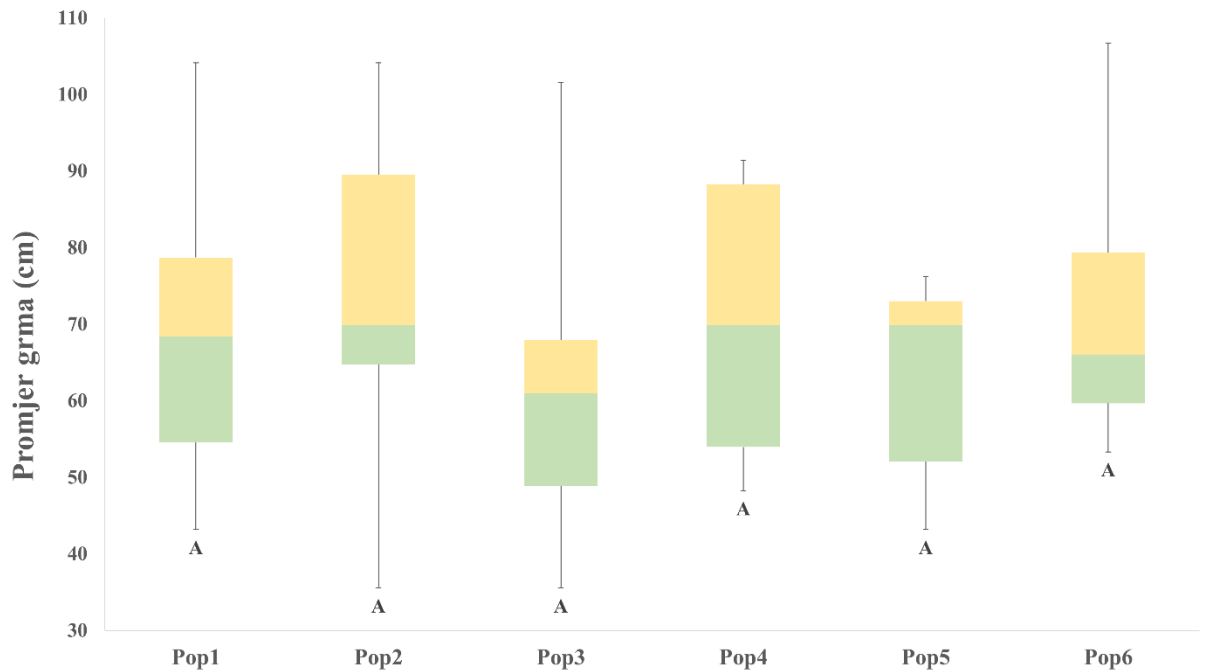
	BD	PH	NF	TA	CA	WFA
BD	1	**	***	ns	ns	ns
PH	0,407	1	**	ns	ns	ns
NF	0,822	0,394	1	ns	ns	ns
TA	0,008	0,216	-0,041	1	***	***
CA	0,012	0,197	0,143	0,640	1	***
WFA	0,007	0,208	-0,062	0,995	0,564	1

ns – nije statistički značajno; * statistički značajno na razini $P < 0,05$; ** statistički značajno na razini $P < 0,01$; *** statistički značajno na razini $P < 0,001$

Prosječne vrijednosti promjera grma kretale su se od 61,22 cm u populaciji Pop 3 (Vrbnik) do 73,72 cm u populaciji Pop 2 (Trebinje) (grafikon 4.1.1.). Unutar populacije Pop 6 (Srđ) istaknula se jedinka sa širinom grma od 106,68 cm, najvećim promjerom unutar istraživanih populacija. Dvije jedinice s najmanjim promjerom grma utvrđene su u Pop 2 (Trebinje), Pop 3 (Vrbnik), s promjerom od samo 35,56 cm. Analizom varijance nisu utvrđene statistički značajne razlike između populacija s obzirom na promjer grma.

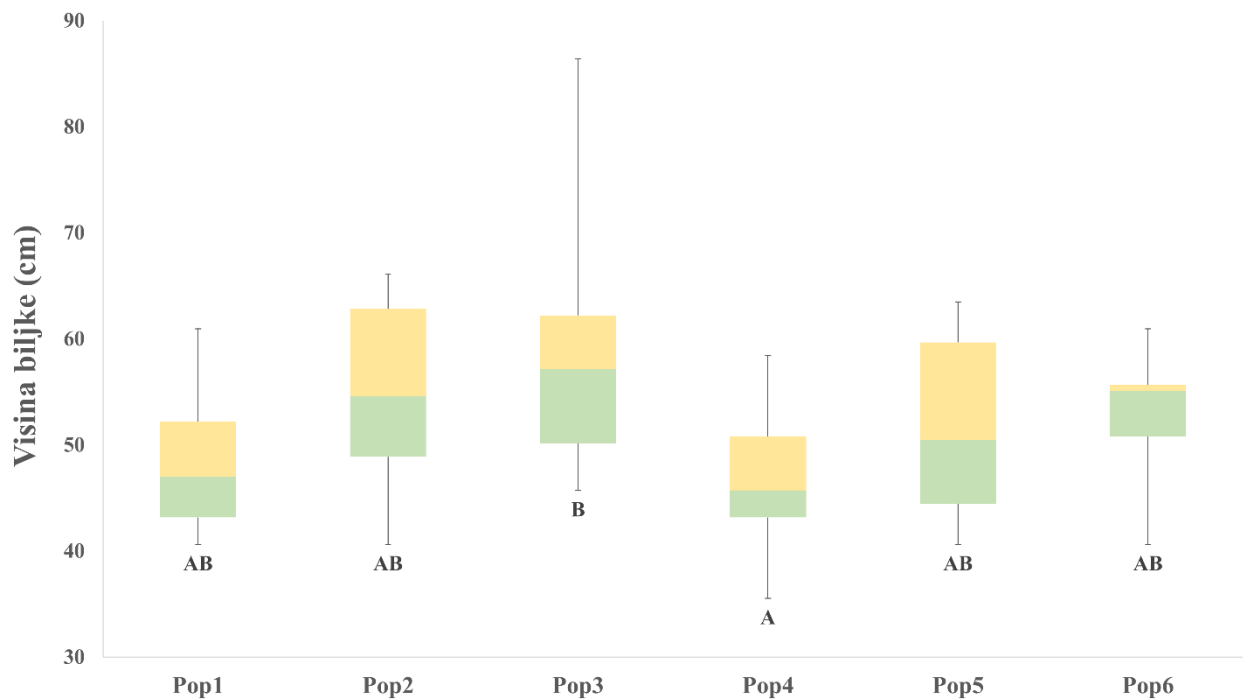
Prosječna visina biljke kretala se od 47,24 cm u populaciji Pop 4 (Žman) do 59,19 cm u populaciji Pop 3 (Vrbnik) (grafikon 4.1.2.) Kod Pop 3 (Vrbnik) utvrđena je najviša jedinka s visinom od 86,42 cm dok je najniža jedinka zabilježena u Pop 4 (Žman) visine 35,56 cm. S obzirom na visinu biljaka populacija Pop 6 (Srđ) je najhomogenija. Kod ove populacije većina jedinki je visine veće od 55 cm. U ostalim populacija visina jedinki varirala je znatno više. Analizom varijance utvrđene su značajne razlike u visini biljaka između Pop 3 (Vrbnik) i Pop 4 (Žman). Prema Kolak i Rozić (1998) visina i razgranatost grma dalmatinskog buhača ima vrlo veliku važnost kod selekcije i odabira genotipova za proizvodnju. Obzirom na različite lokacije s kojih su prikupljene populacije vidljiva je razlika u visini i promjeru grma, ali i u

broju cvjetova. Također, kod mjerenja određenih jedinki primijećeno je polijeganje što se može povezati sa težinom cvjetnih glavica.



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

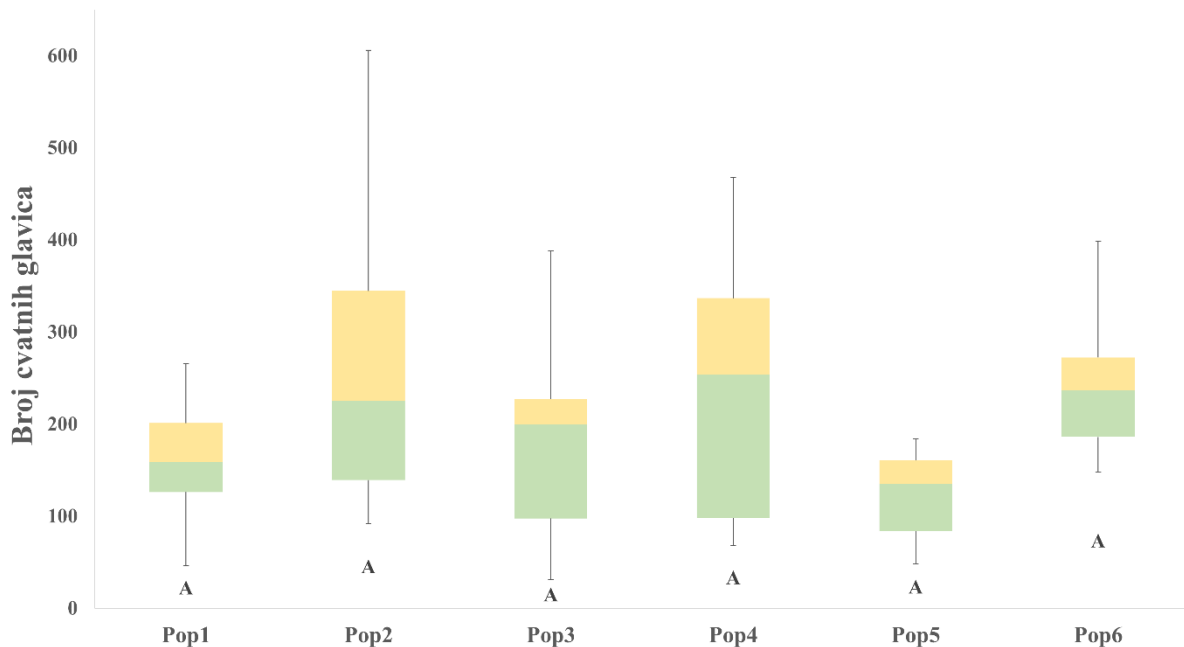
Grafikon 4.1.2. Promjer grma (cm) u istaživanim populacijama



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

Grafikon 4.1.2. Visina biljke (cm) u istaživanim populacijama

Prosječan broj cvatnih glavica kretao se od 126 u populaciji Pop 5 (Korčula) do 258 u populaciji Pop 2 (Trebinje) (grafikon 4.1.3.). Jedinka s najvećim brojem cvatnih glavica (606) utvrđena je u populaciji Pop 2 (Trebinje) dok je najmanji broj cvatnih glavica (31) zabilježen kod jedinice iz populacije Pop 3 (Vrbnik). Analizom varijance nisu utvrđene značajne razlike između istraživanih populacija s obzirom na ovo svojstvo.



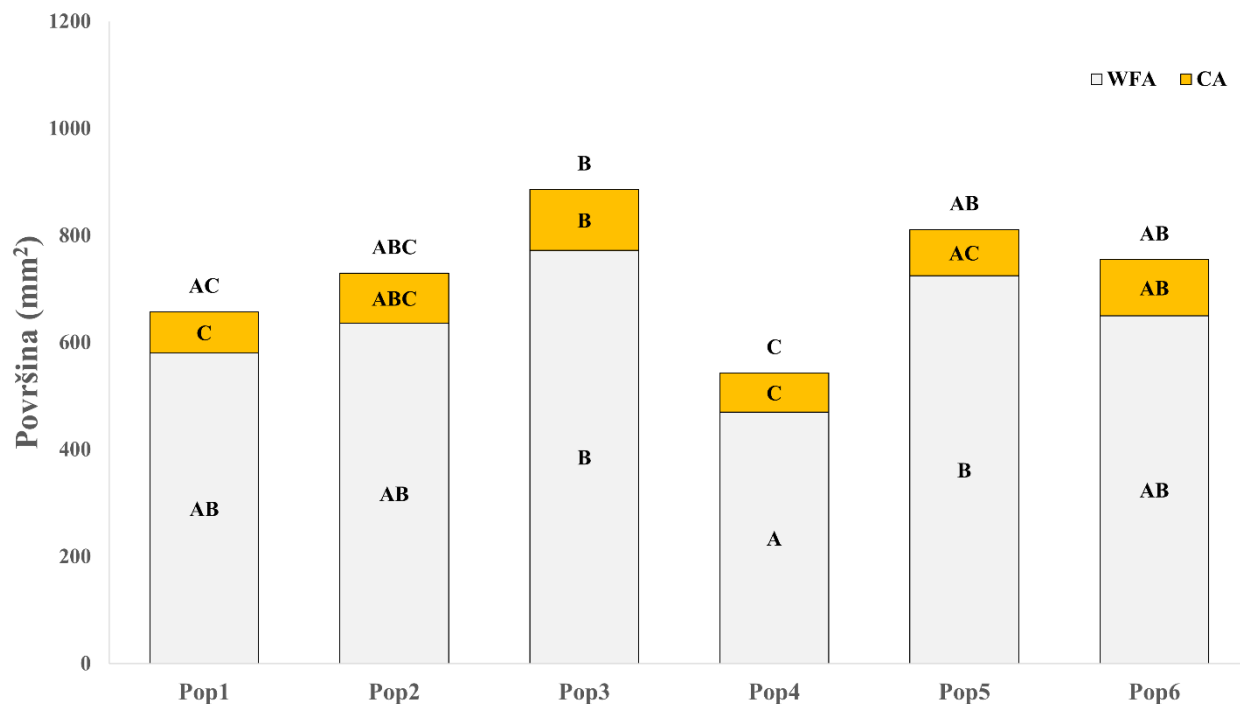
*vrijednosti označene istim slovima ne razlikuju se značajno na razini $P < 0.05$

Grafikon 4.1.3. Broj cvatnih glavica u istraživanim populacijama

Prosječna ukupna površina cvatne glavice (TA) kretala se od 542,95 mm² u populaciji Pop 4 (Žman) do 886,04 mm² u populaciji Pop 3 (Vrbnik) (grafikon 4.1.4.). Jedinka s najmanjom ukupnom površinom od 214,43 mm² cvatne glavice zabilježena je u populaciji Pop 4 (Žman), dok je jedinka s najvećom površinom od 1197,72 mm² zabilježena u populaciji Pop 3 (Vrbnik). Analizom varijance utvrđeno je postojanje značajne razlike između populacija Pop 3 (Vrbnik) i Pop 4 (Žman) s obzirom na ukupnu površinu cvatnih glavica.

Prosječna površina jezičastih cvjetova (CA) kretala se od 72,90 mm² u populaciji Pop 4 (Žman) do 113,64 mm² u populaciji Pop 3 (Vrbnik). Jedinka s najmanjom površinom jezičastih cvjetova (49,96 mm²) zabilježena je u Pop 4 (Žman) dok je jedinka s najvećom površinom jezičastih cvjetova (158,96 mm²) zabilježena u Pop 2 (Trebinje). Analiza varijance utvrdila je postojanje značajne razlike između Pop 3 (Vrbnik) i populacija Pop 1 (Lovćen) i Pop 4 (Žman) s obzirom na površinu jezičastih cvjetova (Graf 4.1.4).

Prosječna površina jezičastih cvjetova (WFA) kretala se od 470,05 mm² u Pop 4 (Žman) do 772,41 mm² u Pop3 (Vrbnik). Analizom varijance utvrđena je značajna razlika između Pop 4 (Žman) i populacija Pop 3 (Vrbnik) i Pop 5 (Korčula).



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

*slova iznad stupca označavaju razlike između ukupne površine (TA), dok slova unutar narančastog dijela prikazuju razlike između površine centralnih (CA) a sivi dio površinu cijelih cvijetova (WFA)

Grafikon 4.1.4. Ukupna površina cvijeta u istraživanim populacijama

4.2. Kemijska raznolikost

Korelacija između piretrina I i cinerina II, piretrina II i jasmolina II bila je negativna ($r < -0,62$). Umjerena pozitivna korelacija utvrđena je između piretrina I i jasmolina I ($r = 0,61$) te piretrina II i jasmolina II ($r = 0,64$). (tablica 4.2.1.)

Tablica 4.2.1. Pearsonov koeficijent korelacije između šest sastavnica piretrina i ukupnog sadržaja piretrina

	PIRETRINI	CIN II	PYR II	JAS II	CIN I	PIR I	JAS I
PIRETRINI	1	ns	ns	*	ns	ns	ns
CIN II	0,090	1	***	ns	***	***	***
PIR II	0,225	0,546	1	***	***	***	***
JAS II	0,316	0,106	0,644	1	***	***	ns
CIN I	-0,082	0,468	-0,408	-0,510	1	ns	ns
PIR I	-0,235	-0,733	-0,963	-0,617	0,171	1	***
JAS I	-0,003	-0,661	-0,586	0,169	-0,180	0,608	1

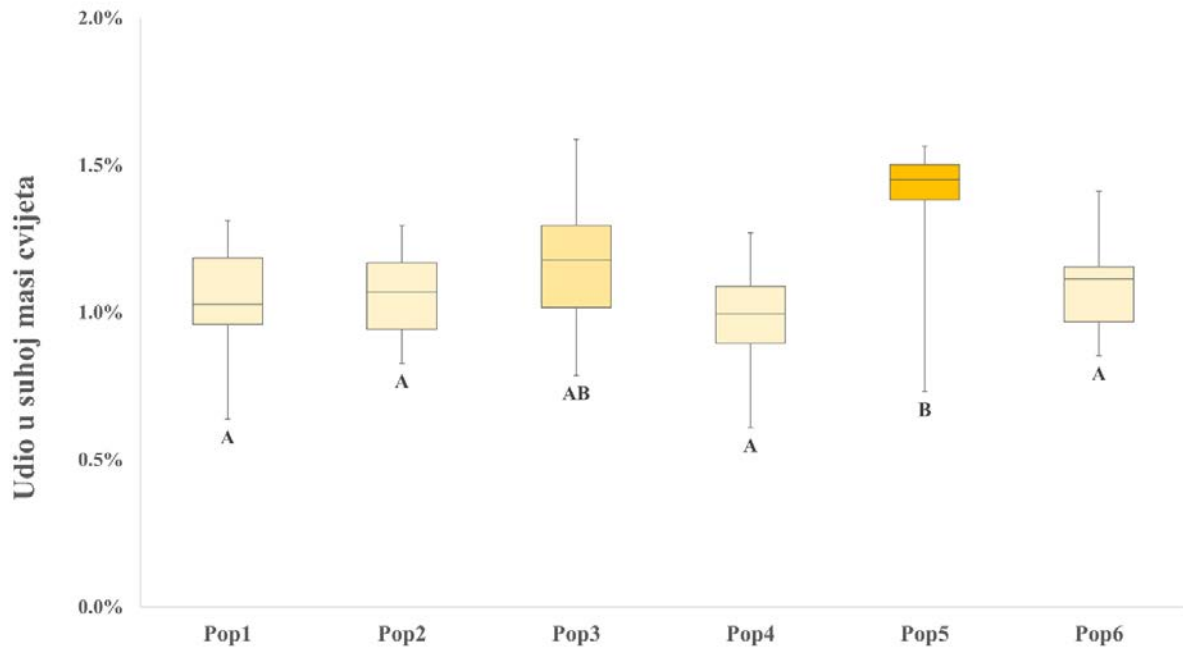
ns – nije statistički značajno; * statistički značajno na razini $P < 0.05$; ** statistički značajno na razini $P < 0.01$; *** statistički značajno na razini $P < 0.001$

Prosječne vrijednosti sadržaja ukupnih piretrina kretale su se od 0,96 % mase suhих cvjetova kod populacija Pop 4 (Žman) do 1,38 % mase suhих cvjetova kod populacije Pop 5 (Korčula) (grafikon 4.2.1.). U populaciji Pop 4 (Žman) utvrđena je jedinka s najnižom vrijednosti ukupnih piretrina 0,61 % mase suhих cvjetova, dok je najviša vrijednost utvrđena kod jedinke u populaciji Pop 3 (Vrbnik) i iznosila je 1,59 % mase suhих cvjetova. Zanimljivo je spomenuti visoke vrijednosti piretrina (iznad 1,2 % mase suhих cvjetova) u gotovo svim jedinkama populacije Pop 5 (Korčula) što je potvrdila i analiza varijance u kojoj se Pop 5 (Korčula) značajno razlikuje od ostalih populacija u uzorku s obzirom na sadržaj ukupnih piretrina. U odnosu na istraživanje Grdiša i sur. (2013) kojim je utvrđen ukupni sadržaj piretrina u rasponu od 0,36 % do 1,36 % suhe mase cvjetova, u ovom istraživanju utvrđen je manji sadržaj piretrina. U navedenom istraživanju populacija sa najvećim vrijednostima ukupnih piretrina je Pop (Osor) (1,29 % mase suhих cvjetova) koja je geografski vrlo blizu populacije Pop 3 (Vrbnik) iz ovog istraživanja, u kojoj su također utvrđene visoke vrijednosti ukupnih piretrina.

Prosječne vrijednosti udjela piretrina I u istraživanim populacijama kretale su se od 45,45 % u Pop 1 (Lovćen) do 55,22 % u Pop 2 (Trebinje). Unutar populacije Pop 3 (Vrbnik) utvrđena je jedinka s najvišim sadržajem piretrina I, odnosno 73,89 % ukupnih piretrina. U populaciji Pop 5 (Korčula) utvrđena je jedinka sa najmanjim udjelom piretrina I (33,56 %). Analizom varijance nisu utvrđene statistički značajne razlike između analiziranih populacija (grafikon 4.2.2.).

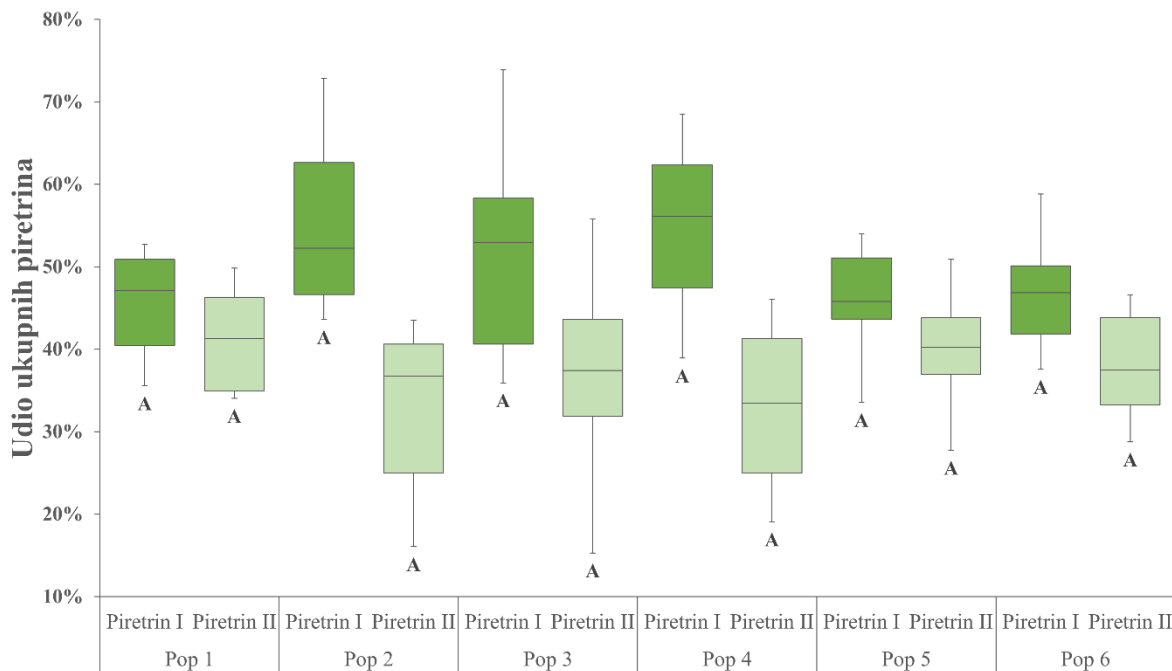
Prosječna vrijednost piretrina II kretala se od 32,5 % u Pop 2 (Trebinje) do 41,06 % u Pop 1 (Lovćen). Jedinke s najmanjim (15,31 % ukupnih piretrina) i najvećim (55,77 % ukupnih piretrina) udjelom piretrina II utvrđene su u istoj populaciji, Pop 3 (Vrbnik). Analizom varijance nisu utvrđene značajne razlike između istraživanih populacija.

Udio jasmolina I i II (% ukupnih piretrina) u istraživanim populacijama prikazan je u grafikonu 4.2.3. Prosječne vrijednosti jasmolina I kretale su se od 1,75 % ukupnih piretrina u populaciji Pop 6 (Srđ) do 3 % ukupnih piretrina u populaciji Pop 3 (Vrbnik). U odnosu na jasmolin I, prosječne vrijednosti jasmolina II kretale su se od 1,53 % ukupnih piretrina u Pop 6 (Srđ) do 2,34 % u Pop 5 (Korčula). Jedinke sa najvišom vrijednošću jasmolina I (5,62 % ukupnih piretrina) i jasmolina II (3,34 % ukupnih piretrina) zabilježene su u populaciji Pop 3 (Vrbnik). Najniža vrijednost jasmolina I zabilježena je u jedinki populacije Pop 6 (Srđ) s vrijednosti od 1,13 % ukupnih piretrina, a najniža vrijednost jasmolina II u populaciji Pop 2 (Trebinje) s vrijednošću od 0,62 % ukupnih piretrina. Analizom varijance utvrđena je statistički značajna razlika između Pop 3 (Vrbnik) i Pop 6 (Srđ) s obzirom na udio jasmolina I, a s obzirom na udio jasmolina II nisu utvrđene značajne razlike između istraživanih populacija.



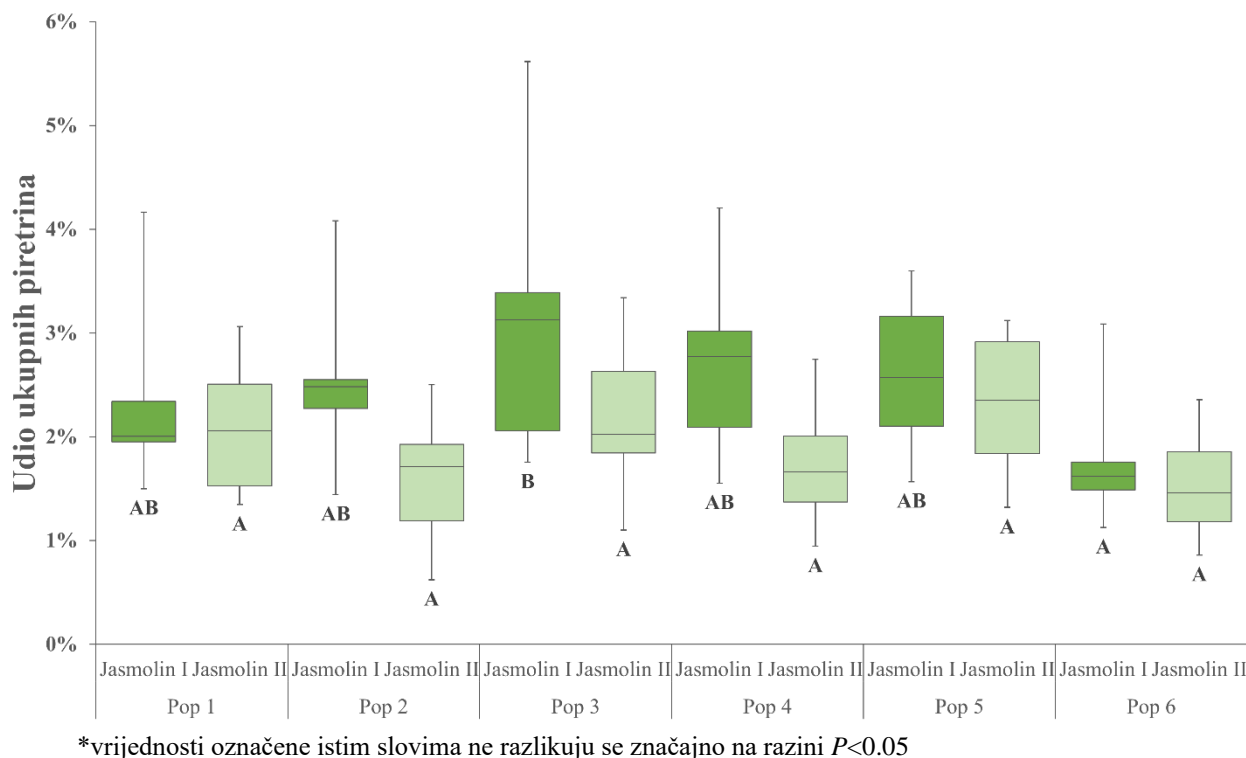
*vrijednosti označene istim slovima ne razlikuju se značajno na razini $P < 0.05$

Grafikon 4.2.1. Sadržaj ukupnih piretrina (%) u istaživanim populacijama



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

Grafikon 4.2.2. Udio piretrina I i II (% ukupnih piretrina) u istaživanim populacijama



*vrijednosti označene istim slovima ne razlikuju se značajno na razini $P < 0.05$
 Grafikon 4.2.3. Udio jasmolina I i II (% ukupnih piretrina) u istraživanim populacijama

Prosječni udio cinerina I kretao se od 3,01 % ukupnih piretrina u Pop 3 (Vrbnik) do 5,78 % ukupnih piretrina u Pop 6 (Srđ). Jedinke s izrazito visokim vrijednostima cinerina I (> 7 % ukupnih piretrina) utvrđene su u populacijama Pop 5 (Korčula) i Pop 6 (Srđ). Najniža vrijednost utvrđena je u jedinki populacije Pop 3 (Vrbnik), 1,21 % ukupnih piretrina. Analizom varijance utvrđena je statistički značajna razlika između Pop 3 (Vrbnik) i Pop 6 (Srđ) s obzirom na udio cinerina I.

Prosječna vrijednost cinerina II kretala se od 2,94 % ukupnih piretrina u populaciji Pop 3 (Vrbnik) do 5,77 % ukupnih piretrina u Pop 6 (Srđ). U Pop 6 (Srđ) također je utvrđena jedinka s najvećim udjelom cinerina II (9,25 % ukupnih piretrina). Najmanji udio cinerina II (0,89 % ukupnih piretrina) utvrđen je u jedinki populacije Pop 3 (Vrbnik). Udjeli cinerina I i II prikazani su u grafikonu 4.2.4. Analizom varijance utvrđeno je postojanje statistički značajnih razlika između Pop 6 (Srđ) i populacija Pop 2 (Trebinje), Pop 3 (Vrbnik) i Pop 4 (Žman).



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

Grafikon 4.2.4. Udio cinerina I i II (% ukupnih piretrina) u istraživanim populacijama

U doktorskom radu autorice Grdiša (2011) multivarijatnom analizom biokemijske raznolikosti identificirano je pet kemotipova različitog sadržaja i kvalitete piretrinskog ekstrakta, koji su označeni oznakama A, B, C, D i E, a razlikuju se prema udjelu pojedinih sastavnica piretrina. U tablici 4.2.2 prikazane su karakteristike svakog od kemotipova.

Tablica 4.2.2. Svojstva kemotipova prema Grdiša (2011)

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

Šest istraživanih populacija svrstano je u odgovarajuće kemotipove prema Grdiša (2011). Sve populacije osim populacije Pop 6 (Srđ) svrstane su u kemotip B zbog visokog udjela piretrina I i II, a nižeg udjela svih ostalih sastavnica. Populacija Pop 6 (Srđ) zbog nižeg udjela piretrina I i II i višeg udjela cinerina I i II svrstana je u kemotip C kojeg karakterizira niži udio piretrina i viši udio cinerina I i II. Iako ni jedna od populacija nije svrstana u kemotip A, kojeg karakterizira visoki udio piretrina, pojedine jedinke ipak se mogu svrstati u taj kemotip. Unutar populacije Pop 2 (Trebinje) mogu se izvojiti četiri jedinke, iz populacije Pop 3 (Vrbnik) pet jedinki, iz populacije Pop 4 (Žman) pet jedinki i iz populacije Pop 6 (Srđ) dvije jedinke koje sadrže visoki udio piretrina (%). Također, neke jedinke populacije Pop 5 (Korčula) koja je svrstana u kemotip B mogu se svrstati u kemotip C zbog visokog udjela cinerina I i II.

Tablica 4.2.3. Svojstva kemotipova 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

Varga (2021) je utvrdio postojanje četiriju kemotipa (tablica 4.2.3.). Prema navedenom autoru, u kemotip P1/P2 mogu se svrstati populacije Pop 1 (Lovćen) i Pop 5 (Korčula) koje karakterizira visoki udio piretrina I i piretrina II. Populacija Pop 6 (Srđ) zbog visokog udjela cinerina I i jasmolina I svrstana je u kemotipu C1/J1. Populacije Pop 2 (Trebinje), Pop 3 (Vrbnik) i Pop 4 (Žman) svrstane su u kemotip P1 zbog visokog udjela piretrina I i niskog udjela piretrina II, cinerina II i jasmolina II. U kemotip P2 kojeg karakterizira visoki udio piretrina II nije svrstana niti jedna od istraživanih populacija. Iako niti jedna populacija nema karakteristike kemotipa P2, zanimljivo je spomenuti da postoji jedna jedinka u populaciji Pop 3 (Vrbnik) koja se zbog visokog udjela piretrina II može svrstati u spomenuti kemotip.

4.3. Povezanost morfološke i kemijske raznolikosti

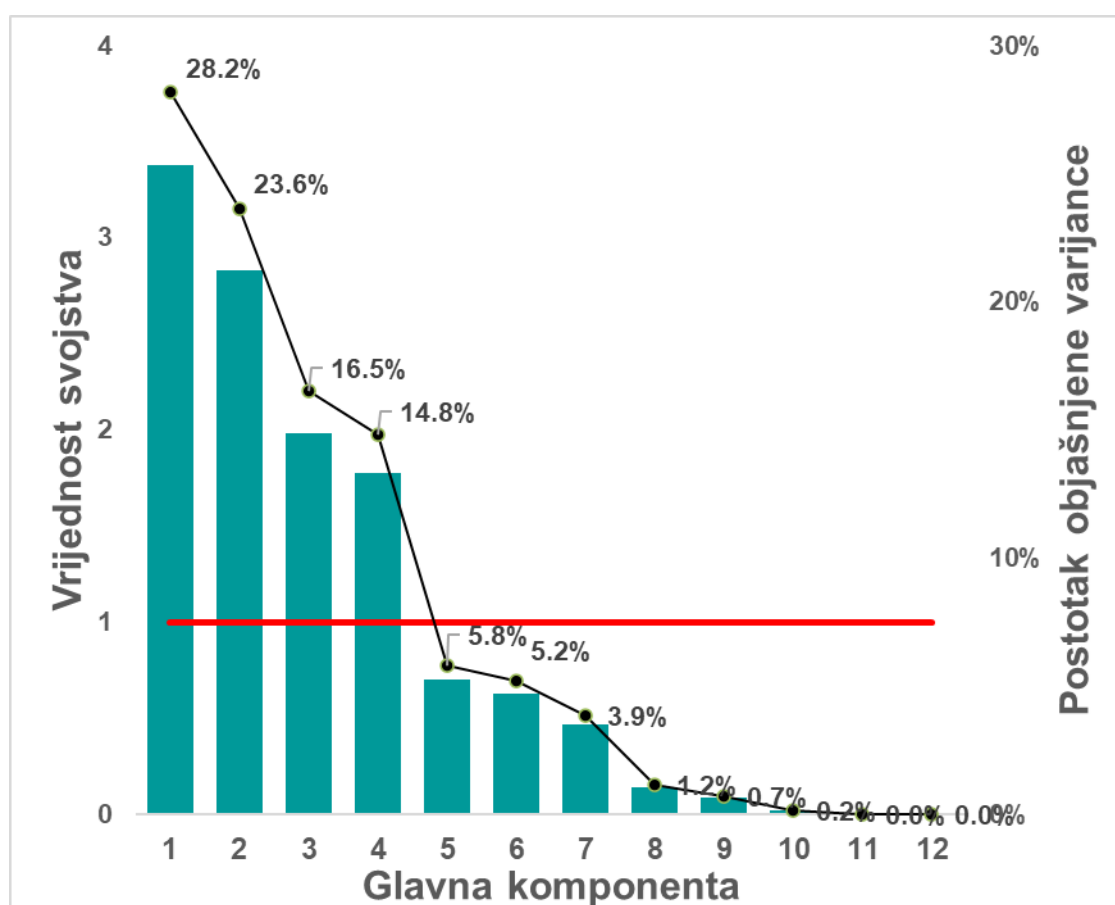
Statističkom analizom nisu utvrđene značajne korelacije između pojedinih morfoloških i kemijskih svojstava. Dodatno je provedena analiza glavnih sastavnica (PCA) na temelju mjerenih svojstava (šest morfoloških i šest kemijskih svojstava). Prve četiri glavne sastavnice imale su svojstvenu vrijednost (eigenvalue) veću od 1 i objašnjavale su 83,1 % ukupne varijabilnosti (grafikon 4.3.1.). Piretrin I, piretrin II, cinerin II i jasmolin I bili su visoko značajno korelirani sa prvom sastavnicom (piretrin I i jasmolin I pozitivno, a piretrin II i cinerin II negativno). Površina jezičastih cvjetova (WFA) te ukupna površina cvatne glavice (TA) bili su pozitivno korelirani s drugom glavnom sastavnicom (Tablica 4.3.1.), dok su promjer grma (BD) i broj cvatnih glavica (NF) bili pozitivno korelirani s trećom glavnom sastavnicom. Cinerin I bio je u pozitivnoj korelaciji s četvrtom glavnom sastavnicom.

Prva glavna sastavnica objasnila je 28,2 % ukupne varijabilnosti i razdvojila jedinke i populacije s višim sadržajem piretrina II i cinerina II od jedinki s višim sadržajem jasmolina I i piretrina I. Druga glavna sastavnica objasnila je 23,6 % varijabilnosti te razdvojila jedinke i populacije na temelju ukupne površine cvatne glavice, površine jezičastih i cjevastih cvjetova (slika 4.3.1.).

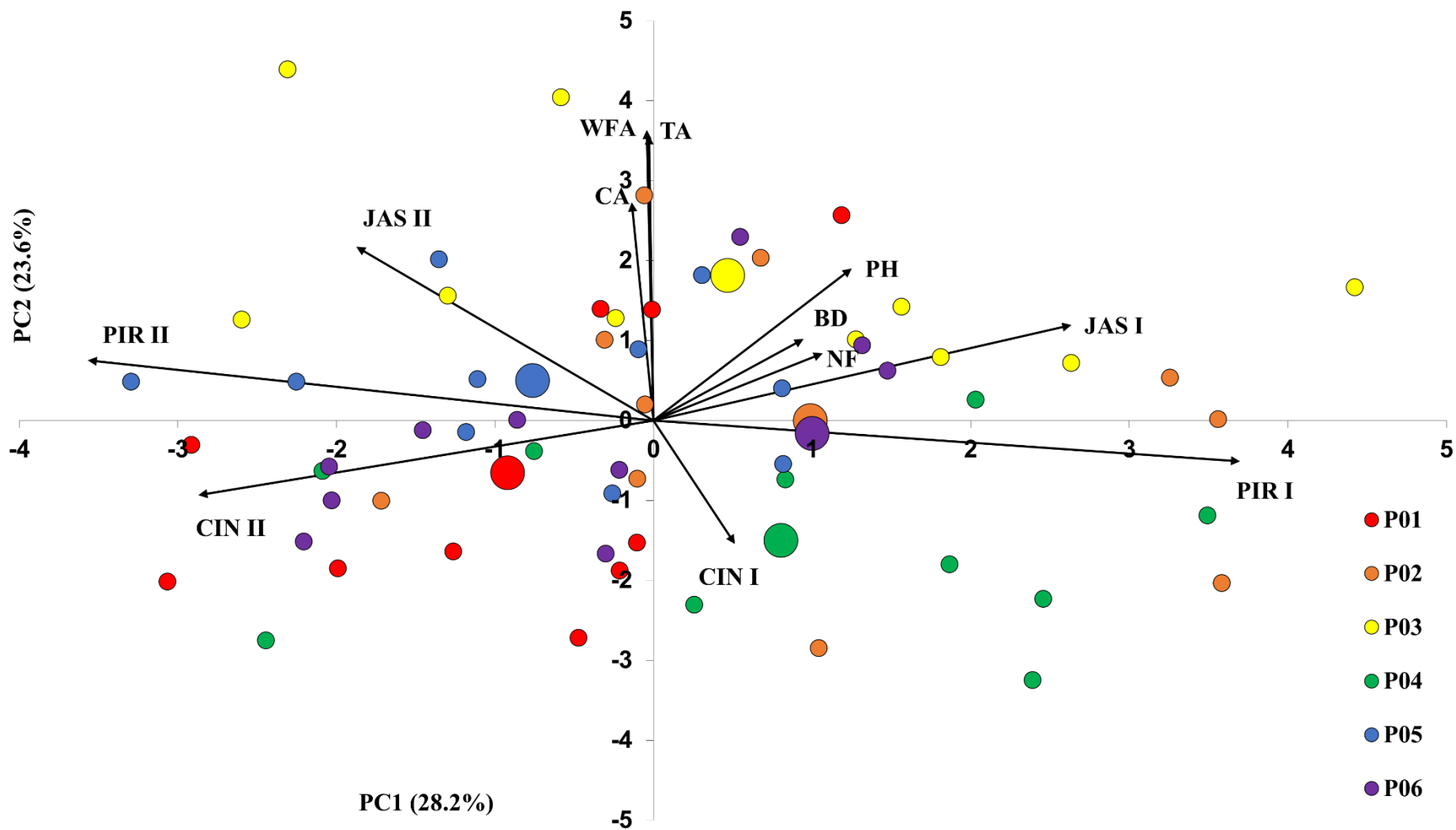
Tablica 4.3.1. Pearsonov koeficijent korelacije između 12 mjerenih svojstava i prve četiri glavne sastavnice (PC)

	PC 1	sign.	PC 2	sign.	PC 3	sign.	PC 4	sign.
BD	0,249	ns	0,246	ns	0,846	***	0,146	ns
PH	0,329	*	0,458	***	0,425	***	0,045	ns
NF	0,280	*	0,202	ns	0,835	***	0,223	ns
TA	-0,011	ns	0,874	***	-0,339	**	0,276	*
CA	-0,036	ns	0,657	***	-0,159	ns	0,438	***
WFA	-0,007	ns	0,858	***	-0,344	**	0,242	ns
PIR I	0,9712	***	-0,12251	ns	-0,17683	ns	0,025	ns
PIR II	-0,937	***	0,18135	ns	0,1714	ns	-0,2	ns
CIN I	0,1348	ns	-0,37217	**	-0,03646	ns	0,811	***
CIN II	-0,754	***	-0,22432	ns	0,09627	ns	0,497	***
JAS I	0,6922	***	0,28766	*	-0,1148	ns	-0,42	***
JAS II	-0,492	***	0,523	***	0,21608	ns	-0,51	***

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



Grafikon 4.3.1. Postotak objašnjene varijance i vrijednosti svojstva za glavne sastavnice (PCA)



Slika 4.3.1. Biplot analiza glavnih sastavnica uzoraka šest populacija na temelju sastava piperina i morfoloških svojstva (PC1 i PC2)

Iz dobivenih rezultata vidljivo je da je populacija Pop 2 (Trebinje) iz Bosne i Hercegovine vrlo slična Hrvatskoj populaciji Pop 6 (Srđ). Jedan od mogućih razloga sličnosti je geografska komponenta i mogućnost postojanja protoka gena između populacija, što je potrebno dodatno analizirati molekularnim analizama. Populacija iz Crne Gore, Pop 1 (Lovćen) ima veliku sličnost s populacijom Pop 3 (Vrbnik) te se po svim parametrima odvajaju od populacije Pop 4 (Žman). Populacija Pop 4 (Žman) se po morfološkim svojstvima, točnije ukupnoj površini cvatne glavice, bitno razlikuje od populacije Pop 3 (Vrbnik), koja se istaknula sa najvećom prosječnom visinom biljke.

Prosječni sadržaj ukupnih piretrina bio je najveći u populaciji Pop 5 (Korčula) koja se također istaknula s najmanjim brojem cvjetnih glavica po grmu. Najmanji prosječni sadržaj piretrina I imala je populacija Pop 1 (Lovćen) a najveći populacija Pop 2 (Trebinje). Zanimljiva je činjenica da je sadržaj piretrina II bio najmanji u populaciji Pop 2 (Trebinje), a najveći u populaciji Pop 1 (Lovćen). Osim visokog sadržaja piretrina I, populacija Pop 2 (Trebinje) istaknula se s najvišim prosjekom broja cvjetova po grmu i širini grma u odnosu na ostatak istraživanih populacija.

5. Zaključak

Cilj istraživanja bio je usporediti varijabilnost morfoloških svojstva biljaka dalmatinskog buhača i sadržaja piretrina u šest prirodnih populacija dalmatinskog buhača te procijeniti njihovu povezanost.

Na temelju dobivenih rezultata doneseni su sljedeći zaključci:

1. Utvrđena je velika varijabilnost u kemijskim i morfološkim svojstvima. Vrijedno je istaknuti populaciju Pop 2 (Trebinje) koja ima visoki sadržaj piretrina I i najveći broj cvatnih glavica u odnosu na ostatak istraživanih populacija.
2. Utvrđeno je visoko značajno pozitivna korelacija između broja cvatnih glavica i visine biljke, kao i između površine cvatne glavice i površine jezičastih i cjevastih cvjetova.
3. Utvrđena je visoko značajna negativna korelacija između sadržaja piretrina I i sadržaja cinerina II, jasmolina II te piretrina II.
4. Svrstavanjem populacija po kemotipovima, utvrđeno je da ni jedna od istraživanih populacija nije svrstana u kemotip A kojeg karakterizira visoki udio piretrina iako u većini populacija postoje jedinke koje se mogu svrstati u kemotip A.
5. Korelacija između morfoloških i kemijskih svojstva nije bila statistički značajna.
6. Provedbom analize glavnih sastavnica (PCA) utvrđeno je da prve četiri sastavnice objašnjavaju 83,1 % ukupne varijabilnosti. Prve dvije glavne sastavnice razdvojile su jedinke i populacije s obzirom na morfološka svojstva.

Trenutna istraživanja o dalmatinskom buhaču su oskudna i ograničena na područje Republike Hrvatske. Potrebno je provesti veći broj istraživanja na većem broju populacija kako bi se razvili kultivari s većim sadržajem piretrina te se očuvala genetska raznolikost ove vrste.

6. Popis literature

1. Acland J. D. (1971). East African crops. An introduction to the production of field and plantation crops in Kenya, Tanzania and Uganda. Longman/FAO. Rome.
2. Ambrožič Dolinšek J., Kovač M., Žel J., Camloh M. (2007). Pyrethrum (*Tanacetum cinerariifolium*) from the Northern Adriatic as a potential source of natural insecticide. *Ann Ser Hist Nat* 17:39 – 46.
3. Angendu Charles. A. (1994). Determination of the relationship between the pyrethrins and yellow pigmentation in pyrethrum flowers Msc. Thesis University of Nairobi.
4. Atkinson B. L., Blackman A. J., Faber H. (2004). The degradation of the natural pyrethrins in crop storage. *J. Agric. Food Chem.* 52: 280 – 287.
5. 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.
6. Bailey S. F. (1938). Thrips of economic importance in California. *Calif., Agr. Exp. Sta., Cite.* 346, 10, 19, 32, 38, 39, 44, 61, 64,69.
7. Berger-Preiß E., K. Levssen, A. Preiß. (1997). Analysis of individual natural pyrethrins in indoor matrices by HRG/ECD. *J. High Resol. Chromatogr.* 20: 284 – 289.
8. Berkley V. A., Gnadinger C. B, Ireland F. (1938). Pyrethrum flowers: Kenya a better source *Industrial and Engineering Chemistry* 30:835 – 838.
9. Bhat B. K. (1995). Breeding methodologies applicable to pyrethrum. In: Casida JE, Quistad GB (eds) *Pyrethrum flowers: production, chemistry, toxicology, and uses.* Oxford University Press. New York. Str. 67 – 94.
10. 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.
11. Bhat B. K., Menary R. C. (1984). Genotypic and phenotypic variation in floral development of difference clones of pyrethrum (*Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis). *Pyrethrum Post* 15:99 – 103.
12. Biošić M., Varga F, Dabić D. (2020). Matrix solid-phase dispersion optimization for determination of pyrethrin content in Dalmatian pyrethrum (*Tanacetum cinerariifolium*/Trevir./Sch. Bip.) by liquid chromatography. *Ind Crops Prod.*
13. BRA. Botanical Resources Australia. (2021).
Dostupno: <https://www.botanicalresources.com/> (Pristupljeno: 20.3.2021).
14. Bremer K., Humphries C.J. (1993). Generic monograph of the *Asteraceae–Anthemideae*. *Bull Nat Hist Mus Lond Bot.* 23:71 – 17.
15. Bullock J. A. (1961). The pests of pyrethrum in Kenya. *Pyrethrum Post.* 6(2): 22-24.
16. Cattell R. B. (1966). The Scree Plot Test for the Number of Factors. *Multivariate Behavioral Research.* 1:140 – 161.
17. Chandler S. E. (1948). The Origin and Early History of the Production of Pyrethrum in Kenya. *Pyrethrum Post* 1 (1): 10 – 13
18. Class J. T., Kintrup J. (1991). Pyrethroids as household insecticides: analysis, indoor exposure and persistence. *Fresenius J. Anal. Chem.* 340: 446 – 453.

19. Crombie L., Holloway S. (1985). Biosynthesis of the pyrethrins - unsaturated fatty-acids and the origins of the rethrolone segment. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*:1393 – 1400
20. 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.
21. FAOSTAT Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2000). (<https://www.fao.org/faostat/en/#search/Pyrethrum%2C%20dried>). (Pristupljeno: 19.6.2022).
22. FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2022). ([URL https://www.fao.org/faostat/en/#search/Pyrethrum%2C%20dried](https://www.fao.org/faostat/en/#search/Pyrethrum%2C%20dried)). (Pristupljeno: 19.6.2022).
23. Glover J. (1955). Chilling and flower bud stimulation in pyrethrum (*Chrysanthemum cinerariaefolium*). *Ann. Bot. (London)*. 19: 138 – 148.
24. Glynne-Jones A. (2001). Pyrethrum. *Pestic. Outlook* 12:195 – 198.
25. Gnadinger C. B., Corl C. S. (1930). Studies on pyrethrum flowers. II. The relation between maturity and pyrethrin content. *J Am Chem Soc* 52:680 – 684.
26. Grdiša M. (2011). Morfološka, kemijska i genetska raznolikost dalmatinskog buhaća (*Tanacetum cinerariifolium*/Trevir./sch. Bip.). Zagreb.
27. Grdiša M. (2013). Chemical diversity of the natural populations of Dalmatian pyrethrum (*Tanacetum cinerariifolium* (Trevir.) Sch.Bip.) in Croatia. *Chem. Biodivers.* 10, 460 – 472.
28. Grdiša M., Babić S., Periša M. (2013). Chemical diversity of the natural populations of Dalmatian pyrethrum (*Tanacetum cinerariifolium*/Trevir./Sch. Bip.) in Croatia. *Chem Biodivers.* 10:460 – 472.
29. Grdiša M., Carović-Stanko K., Kolak I., Šatović Z. (2009). Morphological and biochemical diversity of Dalmatian pyrethrum (*Tanacetum cinerariifolium* (Trevir.) Sch. Bip.). *Agric Conspec Sci* 74:73 – 80.
30. 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, 252. <https://doi.org/10.3390/agronomy12020252>
31. HAOP. Hrvatska agencija za okoliš i prirodu. (2022). ([URL https://www.haop.hr/hr/tematska-podrucja/prirodne-vrijednosti-stanje-i-ocuvanje/bioraznolikost/flora](https://www.haop.hr/hr/tematska-podrucja/prirodne-vrijednosti-stanje-i-ocuvanje/bioraznolikost/flora)). (Pristupljeno: 15.2.2022).
32. Head S. W. (1966). A study of the insecticidal constituents in *Chrysanthemum cinerariaefolium*. *Pyrethrum Post* 8:32 – 37.
33. Head S. W. (1973). Composition of pyrethrum extract and analysis of pyrethrins. In: Casida JE (ur.) *Pyrethrum: the natural insecticide*. Academic Press, New York, str. 25 – 53.
34. Heywood V. H. (1976). *Tanacetum*. U: Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Moore DM, Valentine DH. Walters SM- Webb DA. editors. *Flora Europaea. Plantaginaceae to Compositae (and Rubiaceae)*. Volume 4. Cambridge: Cambridge University Press. 169 – 171.

35. 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.
36. Isman M. B. (2008). Botanical insecticides: for richer, for poorer. *Pest Manag Sci* 64:8–11.
37. Jeran N., Grdiša M., Varga F., Šatović Z., Liber Z., Dabić D., Biošić M. (2020). Pyrethrin from Dalmatian pyrethrum (*Tanacetum cinerariifolium* /Trevir./Sch. Bip.): biosynthesis, biological activity, methods of extraction and determination. *Phytochemistry Reviews*
38. Johnson W.W., Finley M.T. (1980). Handbook of acute toxicity of chemicals to fish and aquatic invertebrates. Washington, D.C.: U.S. Dept. of the Interior. Fish and Wildlife Service. str. 70.
39. Kenya Tourist Board (1999). An overview of Kenya agriculture. Ministry of agriculture.
40. Kiriamiti H. K., Camy S., Gourdon C., Condoret J. S. (2003). Pyrethrin extraction from pyrethrum flowers using carbon dioxide. *Journal of Supercritical fluids* 26: 193 – 200
41. Kolak I., Šatović Z., Rukavina H., Filipaj B. (1999). Dalmatinski buhač (*Tanacetum cinerariifolium*/Trevir./sch. Bip). *Sjemenarstvo* 16: 5
42. 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.
43. Kremer D. (2018). Ljekovito bilje Farmaceutsko botaničkog vrta "Fran Kušan". Javna ustanova "Maksimir". Zagreb
44. Kroll U. (1948). Pyrethrum and good farming. *Pyrethrum Post*, 1(2): 23 – 27.
45. Kroll U. (1962). The improvement of pyrethrum yields through the application of fertilizers. *Pyrethrum Post*. 6(3): 32 – 33.
46. Kroll U. (1963). The effect of fertilizers, manures, irrigation and ridging on the yield of
47. LaForge F. B., Barthel W. F. (1947). Constituents of pyrethrum flowers; the partial synthesis of pyrethrins and cinerins and their relative toxicities. *J Org Chem*. Jan. 12(1):199 – 202.
48. Maciver D. R. (1995). Constituents of pyrethrum extract. In: Casida JE, Quistad GB (eds) *Pyrethrum flowers: production, chemistry, toxicology, and uses*. Oxford University Press, New York, pp 108 – 122.
49. McDonnell C., Roark R., Keenan G. (1920). Insect powder. US Department of Agriculture Bulletin No. 824:1 – 100.
50. Ngugi C. W., Ikahu, J. M. (1989). The response of pyrethrum (*Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis.) to phosphorus and nitrogen fertilizers. *Pyrethrum Post*. 17(2): 70 – 73.
51. Nikolić T. (2009). Flora Croatica Database. Department of Botany, Faculty of Science, University of Zagreb.
52. Nikolić T. (2014). Flora Croatica Database. Faculty of Science. University of Zagreb.
53. Nikolić T. ur. (2022): Flora Croatica Database (URL <http://hirc.botanic.hr/fcd>). (Pristupljeno: 20.7.2021).
54. Nikolić T., Milović M., Bogdanović., Jasprica N. (2015). Endemi u hrvatskoj flori. Alfa d.d. Zagreb.

55. Oberprieler C., Himmelreich S., Kallersjo M., Valles J., Vogt R. (2009). Anthemideae. In: Funk V., Susanna A., Stuessy T. F., Bayer R. (eds) Systematics evolution and biogeography of the Compositae. IAPT, Vienna, pp 631 – 666.
56. Ogbaji P. O., Li, J., Xue X., Shahrajabian M. H., Egrinya E. A. (2018). Impact of bio-fertilizer or nutrient solution on Spinach (*Spinacea Oleracea*) growth and yield in some province soils of P.R. China. Cercetari Agronomice in Moldova. 2(174):43 – 52.
57. Otieno H. O., Kariuki, D. & Wanjohi, J. (2020). Pyrethrum (*Chrysanthemum cinerariifolium*) Flowers' Drying Conditions for Optimum Extractable Pyrethrins Content. Journal of Plant Studies. 9. 11. 10.5539/jps.v9n2p11.
58. Otterbach A., Wenclawiak B. W. (1999). Ultrasonic/Soxhlet/supercritical fluid extraction kinetics of pyrethrins from flowers and allethrin from paper strips. Fresen J Anal Chem 365 (5): 472 – 474.
59. Pandita P. N., Bhat B. K. (1986). Correlations in phenotypic traits of Pyrethrum (*Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis). Pyrethrum Post 16:93 – 94.
60. Parlevliet J. E. (1975). Breeding pyrethrum in Kenya. Pyrethrum Post 13:47 – 54
61. Parlevliet J. E. (1970). The effects of rainfall and altitude on the yield of pyrethrins from pyrethrum flowers in Kenya. Pyrethrum Post. 10 (3): 20 – 25.
62. Parlevliet J.E. (1974). The genetic variability of the yield components in the Kenyan pyrethrum populations. Euphytica 23:377–384.
63. Pepper B. B. (1941). The corn earworm and its control on sweet corn. N.J. Agr. Exp. Sta., Circ. 413, 1 – 13.
64. Potts W. C., Menary R. C. (1987). „Research report on pyrethrum“. University of Tasmania, Hobart.
65. Pyrethrum Board of Kenya (1992). Recommendations Arising from Agronomic Research and Other Sources in Kenya. Pyrethrum Growers Handbook, Pyrethrum Board of Kenya, Nakuru.
66. Ramadan A.A. (1988). Actions of pyrethroids on the peripheral benzodiazepine receptor. Pest. Biochem. Physiol. 1988. 32: 106 – 113.
67. Ramirez A.M., Stoopen G., Menzel T. R. (2012). Bidirectional secretions from glandular trichomes of pyrethrum enable immunization of seedlings. Plant Cell 24:4252 – 4265.
68. Rehman H., Aziz A. T., Saggi S. (2014). Systematic review on pyrethroid toxicity with special reference to deltamethrin. J Entomol Zool Stud JEZS 2:60 – 70.
69. Robinson R. A. (1963). Diseases of pyrethrum in Kenya. Est. Afr. Agric. For. J. 28: 164 – 167.
70. Roest S. (1976). Flowering and Vegetative Propagation of Pyrethrum (*Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis) in Vivo and in Vitro. PbD Thesis. Pudoc. Wageningen
71. Sastry K. P., Dinesh K., Radhakrishnan K., Saleem S. M., Sushil K. (2001). Flowering characteristics of pyrethrum *Chrysanthemum cinerariaefolium* clones selected for high capitulum yield. Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences. 22/23:344 – 347.
72. Savković D. (2017). Enciklopedija ljekovitog, korisnog i medonosnog bilja. Begon d.o.o. Zagreb.
73. Sawicki R. M., Elliott M., Gower J. C. (1962). Insecticidal activity of pyrethrum extract and its four insecticidal constituents against house flies. I.—Preparation and relative

- toxicity of the pure constituents; Statistical analysis of the action of mixtures of these components. *J Sci Food Agric* 13:172 – 185.
74. Shafey O., Mehler L., Baum L. (2000). Illnesses associated with use of automatic insecticide dispenser units—selected states and United States, 1986–1999. *MMWR* 49(22): 492 – 495.
 75. Sharafzadeh S. (2011). Pyrethrum, coltsfoot and dandelion: important medicinal plants from Asteraceae family. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 5(12):1787 – 1791.
 76. Singh S. P., Sharma J.R., Rajeswara Rao B.R., Sharma S.K. (1988). Genetic improvement of pyrethrum. II. Parent-offspring correlation and progeny performance. *Pyrethrum Post.* 17:8 – 11 .
 77. Smith L. M., Hanson P. M. (1991). Yield reduction in pyrethrum caused by *Thrips nigropilosus* Uzel. (Thysanoptera: Thripidae). *Trop. Agric. (Trinidad)*. 68(3): 235 – 238.
 78. Soreng R. J., Cope. E. A. (1991). On the taxonomy of cultivated species of the *Chrysanthemum* genus-complex (Anthemideae; Compositae). *Baileya* 23:157.
 79. Stepanović B., Radanović D., Tursić I., Nemčević N., Ivanec J. (2009.). Uzgoj ljekovitog i aromatičnog bilja. Jan-Spider. Pitomača.
 80. Suraweera D. D., Groom T., Nicolas M. E. (2017a). Pattern of pyrethrin accumulation, achene and trichome development in relation to pattern of flower development in pyrethrum. *Acta Horti* 1169:93 – 100.
 81. Suraweera D. D., Groom T., Taylor P. W. J. (2017b). Dynamics of flower, achene and trichome development governs the accumulation of pyrethrins in pyrethrum (*Tanacetum cinerariifolium*) under irrigated and dryland conditions. *Ind Crops Prod* 109:123 – 133.
 82. Šilić Č. (1984). Endemične biljke. Priroda Jugoslavije. Sarajevo
 83. Tóth S., Stričík M., Týr S., Vereš T. (2012). The possibilities of Slovakian pyrethrum production. *Pesticidi i fitomedicina (Belgrade)* 27 (3):245 – 52.
 84. Tóth Š. (2011). The testing of the pyrethrum *Chrysanthemum cinarariaefolium* (Trevir.) Vis. and *Chrysanthemum parthenium* (L.) Smith production possibility in Slovakia. *Acta horticulturae et regioteecturae.* 2/2011: 32 – 36
 85. Tutin T.G. (1964-1980). *Flora Europaea*, 1-5. Cambridge University Press, Cambridge
 86. Varga F. (2021). Dalmatian pyrethrum (*Tanacetum cinerariifolium* /Trevir./ Sch. Bip.) population diversity based on pyrethrin content and microsatellite marker analysis. Zagreb
 87. Vishal S. (2014). Use of Pyrethrin/ Pyrethrum and its Effect on Environment and Human: A Review. *pharmatutor.* 2:52 – 60.
 88. Walker H. G., Anderson, L. D. (1934). Notes on the use of derris and pyrethrum dusts for the control of certain insects attacking cruciferous crops. /. *Econ. Entomol* 27:388 – 392.
 89. Wandahwa P., Van Ranst E., Van Damme P., (1996). Pyrethrum (*Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis.) cultivation in West Kenya: Origin, ecological conditions and management. *Ind. Crops Prod.* 5:307 – 322.
 90. Wang Y., Lv L., Yu Y., Yang G., Xu Z., Wang Q., & Cai L. (2017). Single and joint toxic effects of five selected pesticides on the early life stages of zebrafish (*Deniorenio* *Chemosphere.* 170. 61 67.

91. Wanjala B.W.K. (1989). Evaluation of promising herbicides for control of weeds in pyrethrum fields in Kenya. *Pyrethrum Post*, 17(2): 60 – 65.
92. WHO. World health organisation 2020. (URL <https://www.who.int/home>)
93. World Health Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2000). Pesticide residues in food—2000. Evaluations Part 1—Residues. FAO Plant Production and Protection Paper 165. str. 700.
94. Xu H, Li W., Schillmiller A. L. (2019). Pyrethric acid of natural pyrethrin insecticide: complete pathway elucidation and reconstitution in *Nicotiana benthamiana*. *New Phytol* 223:751 – 765.
95. Yang T., Gao L., Hu H. (2014). Chrysanthemyl diphosphate synthase operates in planta as a bifunctional enzyme with chrysanthemol synthase activity. *J Biol Chem* 289:36325 – 36335.
96. Yothers M. A., Carlson F. W., Cassil, C. C. (1942). Sprays to kill overwintering codling moth larvae. /. *Econ. Entomol* 35:450 – 451.

7. Izvori slika

1. <https://www.lovethegarden.com/au-en/product/defenderpyrethrum-insect-spray-750ml-ready-use-trigger-spray-bottle>
2. <https://www.gardenersdream.co.uk/pyrethrum-5ec-natural-organic-insect-pest-spray-p193>
3. <https://www.researchgate.net/figure/Larva-of-corn-earworm>
4. <https://entomology.ca.uky.edu/ef300>
5. <https://farmbizafrika.com/profit-boosters/2298-government-to-provide-60-million-pyrethrum-seedlings-to-farmers-to-boost-the-crop-production>
6. <https://www.plantea.com.hr/sitnocvjetna-konica/>
7. <https://www.researchgate.net/figure/Bidens-pilosa-from-its-natural-habitats-in-Osmaniye-Figures-taken-by-M-Celik>
8. https://en.wikipedia.org/wiki/Tetranychus_urticae
9. <https://www.ipmimages.org/browse/subthumb.cfm?sub=13006>

8. Životopis

Kim Klarin rođena je 11.08.1997. godine u Zagrebu. Pohađala je Poljoprivrednu srednju školu u Zagrebu. Tijekom školovanja sudjelovala je u mnogim natjecanjima, događanjima, te je sudjelovala dvije godine za redom na Erasmus + programu s kojim je provela dva tjedna u Italiji obavljajući stručnu praksu. Nakon četverogodišnjeg školovanja upisala je Agronomski Fakultet u Zagrebu, smjer Agroekologija. Završetkom preddiplomskog studija, upisuje diplomski studij na istome fakultetu, smjer Ekološka poljoprivreda i agroturizam. Tijekom svih pet godina studiranja sudjelovala je u mnogim izvannastavnim aktivnostima, ali i u aktivnostima kojima je promovirala sami fakultet. Samo neke od aktivnosti su sudjelovanje u Botaničkoj grupi, student tutor, student demonstrator. Također vrlo je bitno spomenuti da je također dobila i titulu studenta edukatora i to po prvi put u povijesti fakulteta. Tijekom absolventske godine koje je upisala nakon pete godine, sudjelovala je u mnogim edukacijskim radionicama u organizacija fakulteta. Vrlo dobro se služi računalom i programima (excel, word..). U slobodno vrijeme voli čitati knjige, brinuti se o svojim kunićima, družiti se s prijateljima i raditi u vrtu.