

Zaštita bilja

Vol. 61 (4), № 274, 283-299, 2010, Beograd

UDK: 582.998.16(497.16)

ID: 182668044

Naučni rad

ISPITIVANJE OSOBINA BUHAČA (*CHRYSANTHEMUM CINERARIAEFOLIUM* VIS.) SA PRIRODNIH STANIŠTA CRNE GORE

DRAGANA MARISAVLJEVIĆ

Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd
e-mail: marisavljevicd@yahoo.com

Buhač (*Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis.) je endemična biljka rasprostranjena u Crnoj Gori, Hrvatskoj i Albaniji. Iz cvasti buhača se ekstrahuju insekticidna jedinjenja piretrini (piretrin I i II). U našoj zemlji ispitivanja buhača su bila veoma oskudna i zato je cilj ovog rada bio dobijanje podataka o biološkim osobinama samoniklog buhača prikupljenog sa različitih staništa Crne Gore kao i mogućnost njegove introdukcije u uslove centralne Srbije.

Ispitivani su sledeći morfološki i produktivni parametri: širina i visina bokora, broj izdanaka i cvetonosnih stabala, broj glavica cvasti, sveža i suva masa korena, stabla, listova i cvasti. Ispitivana je i klijavost semena buhača i određivan je procenat ukupnih piretrina.

Dobijeni rezultati pokazuju da najpovoljnije osobine od svih ispitivanih populacije imaju biljke sa lokaliteta Trsteno. Procenat piretrina u cvastima buhača sa ispitivanih lokacija je oko 0,7 %, a takođe, može se zaključiti da se gajenjem u ekološkim uslovima Srbije procenat piretrina nije značajno smanjio.

Ključne reči: buhač, piretrini, Crna Gora, superkritična ekstrakcija, tečna hromatografija visokog pritiska, HPLC.

UVOD

Buhač raste na kamenitim obroncima naročito u Dalmaciji - otud naziv dalmatinski buhač. Prirodno raste na obali Jadranskog mora od Italije do severa Albanije, kao i u planinskom delu Hercegovine i Crne Gore (Culberston cit. po Casida i Qustad, 1995; Contant, 1976, Parlevlit i sar., 1979). Na Crnogorskom primorju raste do ušća reke Bojane. Zajedno sa *Brachypodium ramosum* R.S.,

Andropogon ischaemum L., *Euphorbia spinosa* L. rasprostranjen je na brdovitom kršu u Crnoj Gori i do 1000 m. Naročito je rasprostranjen u zajednicama degradiranih gariga na kojima se formira asocijacija suvih pašnjaka kao što je *Brachypodieto — Trifolietum stellati* H-ic, takođe učestvuje u izgrađivanju specifične vegetacije nepristupačnih strmih stena i litica sveze *Centaureo - Campanulion* H-ic (Matković, 1959). Po Ožaniću (1930) kao samonikla biljka raste isključivo po južnim padinama bregova i brežuljaka Crne Gore.

Samonikli buhač je višegodišnja biljka koja se razvija u pravi žbunić širok više od 50 cm i visok i do 80 cm. Ima snažan korenov sistem čiji se veći deo nalazi u sloju zemljišta do 10 cm dubine (i u prečniku 30-35 cm), ali u zavisnosti od staništa kod pojedinih biljaka prodire i do 3 m dubine. Prizemno lišće je veće (20 cm dužine), sa lisnom drškom dužine do 16 cm. Donjim delom peteljka je gola, a na gornjem delu je liska koja je više ili manje perasto izdeljena. Pri osnovi cvetne stabljike listići imaju peteljku a pri vrhu su listići bez peteljke. Iz pazuha ovih listića razvijaju se cvetne drške nejednake dužine (do 25 cm). Na svakoj drški je samo po jedna glavičasta cvast, a jedno cvetonosno stablo može imati 1-6 cvasti. Za vreme cvetanja, istovremeno se nalaze pupoljci, glavice koje su tek počele da se otvaraju, zatim otvorene glavice kod kojih se žuti cvetovi počinju otvarati, i glavice kod kojih su svi žuti cvetovi već otvoreni. Posle otvaranja svih žutih cvetova glavica naglo precvetava. Cvasti su loptastog oblika. Imaju kratku osovinu cvasti, čiju donju površinu pokrivaju cevasti cvetovi koji su hermafroditni. Plod je ahenija (Ozanic, 1930; Gandinger, 1945; Tucakov, 1956; Ivanić, 1970, Chandler, 1951; Casida i Quistrad, 1995). Pepeljastim svilastim dlačicama prekrivena je cela biljka, pa Gligić (1953) navodi da je u latinskom nazivu buhača izraz *cineriaefolium* po latinskoj reci *cinis* – pepeo, po biljci *Cineraria maritimus* koja ima slične dlačice na naličju lista.

Najveća količina insekticidnih sastojaka nalazi se u cvetnim glavicama. Kao droga (biljna insekticidna sirovina) koristi se *Chrysanthemi insecticidi flos* (*Insectorum flos, Pyrethri dalmatini flos*) koji je oficijelan po Ph. Jug. II, 1951. Prvobitno su se samlevene cvasti upotrebljavale u obliku praška, a kasnije kao sirovina za ekstrakciju insekticidnih sastojaka. Od ukupne količine piretrina 90% se nalazi u plodnicima cevastih cvetova (Gnadinger i Gorl, cit. po Ivaniću, 1970). Najveći sadržaj droge je kada su cvasti u „fazi plitkog tanjira”, tj. kada je jedna trećina cvetića otvorena (Maciver, cit. po Casida i Quistrad, 1995). Izvestan ali znatno manji procenat piretrina nalazi se i u ostalim delovima biljke buhača (Head, 1966). Insekticidni sastojci buhača su estarska jedinjenja: piretrini, cinerarini i jasmolini u ukupnoj količini od 0,4 % do 2%. Sastoje se od 6 piretrinskih estara poznatih kao «piretrini»: piretrin I \approx 38,0 %, cinerin I \approx 7,3 %, jasmolin I \approx 4,0 %, piretrin II \approx 35%, Cinerin II \approx 11,7% i jasmolin II \approx 4,0 %. Piretrin I i II su dominantne materije sa najjačim insekticidnim delovanjem (Casida, 1973; Moore,

1966). Piretrinski ekstrakt je mešavina tri prirodno prisutna insekticidna estra hrizantemske kiseline (piretrin I) i tri bliska estra piretrinske kiseline (piretrin II). U mešavini se nalazi 20-25% (w/w) izoparafina. Može takođe, sadržati 3-5 % butil hidroksitoulena kao antioksidanta koji sadrži trigliceride, terpenoide i karotenoide. Nema drugih dodatih supstanci (Head, 1966; Anonimus, 1992, cit. po Cassida i Qustad, 1995). Odnos piretrina I i II je veoma bitan za insekticidno delovanje buhača i po njemu se određuje kvalitet piretrinskog ekstrakta (Bhat, cit. po Casida i Quistrad, 1995; Winney i sar., 1969).

Prema ruskoj farmakopeji insekticidno delovanje buhača se proverava eksperimentima na muvama. Princip se sastoji u tome da se 10 mg cvetnih glavica samelju u fini prah (sito promera 0,18 mm) i stave u tikvicu zapremine 1000 ml sa 25 kućnih muva, zatim se zatvori i protrese snažno dva puta, kako bi se prašak ravnomerno rasporedio. Posle 10-15 minuta izbroje se uginule i paralizovane muve. Droga treba da izazove smrt ili paralizu svih muva posle 15 minuta (Gosudarstvenaja farmakopeja SSSR IX, 1961). Buhač brzo deluje na insekte izazivajući paralizu ("knock down" efekat), ali ne obavezno i smrt. Zato se on često kombinuje sa sintetičkim insekticidima koji imaju produženo delovanje (Ivanić, 1970).

Danas se buhaču i preparatima na bazi piretrina dodaju sinergisti uglavnom antioksidansi, koja produžavaju njegovu insekticidnu aktivnost a smanjuju nepostojanost koja nastaje dužim čuvanjem. Svih 6 estara lako oksidišu pa je čuvanje veoma teško. Tako, toplota indukuje transformaciju piretrina u manje aktivne izopiretrine. Piperonil butoksid je prirodna supstanca koja se ekstrahuje iz brazilskog drveta i koristi se kao standardni piretrinski sinergist. Uništavanjem brazilskih šuma koje se koriste za proizvodnju piperonil butoksida, pojavio se problem koji se poslednjih 20-tak godina pokušava resiti ispitivanjem drugih supstanci koje mogu zameniti piperonil butoksid i istraživanja u ovoj oblasti su veoma aktuelna i obimna (Parmar, 1974, Sing i sar., 1976; Bhaskar i sar., 1977; Amos i sar., 1978).

Istraživanja prirodnih piretrina (sinteza hrizantemum-monokarbonske kiseline i ciklopetonolonskog prstena tipa cinerolona) izazvala su i otkriće i razvoj sintetičkih piretroida. Oni su stabilnija jedinjenja i dobro deluju na veliki broj vrsta insekata. Njihova proizvodnja je mnogo jeftinija i po podacima iz 1990. godine koriste se na 25% poljoprivrednih površina i predmet su mnogih istraživanja (Elliot, cit. po Cassida, 1995; Jacson, 1989; Brigs i sar., 1974). Piretroidi ipak nisu u potpunosti uspeli da zamene prirodne piretrine u delovanju prema određenim vrstama insekata i nemaju tako visok stepen sinergizma kao prirodni piretrini (Ivanić, 1970). Takođe, značajna prednost piretrina je i njihova izuzetno niska toksičnost i brza degradacija UV zracima, pa praktično nema karence, tj. može se koristiti neposredno pred žetvu (Bullivan i sar., 1976). Zbog dugotrajne upotrebe

piretrina došlo je do pojave rezistentnosti kod pojedinih vrsta insekata, naročito kod bubašvaba (*Blatella germanica* (Cochran, 1994); (Georghiou, cit. po Casida i Qustad, 1995) navodi da je 15 vrsta insekata rezistentno, što je međutim, samo oko 3% ukupnog broja svih rezistentnih insekata. Određivanje količine piretrina u ekstraktu cvetova buhača predstavlja jedan od najkomplikovanijih zadataka u proizvodnji buhača. U periodu 60-tih godina najčešća metoda za određivanje piretrina bila je acidometrijska metoda koja je i danas zvanična metoda A.O.A.C. Sedamdesetih godina 20.-tog veka usavršeno je nekoliko metoda za određivanje korišćenjem spektrofotometrije i kolorimetrije (Baba i sar. cit. po Casi Bhavnagary i Ahmed, 1973; DePrins, 1973; Donegan i sar., 1973, Marshall, 1971). Ove dve metode korišćene su za gruba i masovna određivanja piretrina u cvastima. Pored ovih metoda primenjivana je i tankoslojna hromatografija (Jork i sar., cit. po Casida i Qustad, 1995; Volkov i sar., 1970). U poslednjoj deceniji u kvantitativnom i kvalitativnom određivanju piretrina koriste se tečna hromatografija visokog pritiska (HPLC), metod superkritične ekstrakcije i magnetna rezonanca. Prednosti ovih metoda u odnosu na ranije korišćene su: manje uzorka i rastvarača za ekstrakciju i skraćeno vreme za analizu (Class, 1992; Carls, 1995, Nieass i sa., 1984; Rogen, 1990, 1992; Seda, 1983; Sims, 1982; Stal, 1988, 1989).

MATERIJAL I METODE

Terenska istraživanja

Terenska ispitivanja započeta su 1994. godine obilaskom područja na kojima su po literaturi staništa buhača tj. lokaliteta na kojima buhač raste u značajnijoj meri. Veličinu lokaliteta je teško precizno odrediti zbog neravnomernog pojavljivanja i nepristupačnog terena. Odabrani su lokaliteti u područjima: Skadarskog jezera, u okolini Petrovca i Budve, na području planine Orijen i u okolini Cetinja. Lokaliteti su izabrani na osnovu nadmorske visine da bi se obuhvatile sve nadmorske visine do oko 1000 m nm (podnožje planine Rumija kao najniži lokalitet - 65 m nm i okolina Cetinja kao najviši - 1000 m) jer je po Matkoviću (1959), 1000 m nm, gornja granica njegovog rasprostranjenja.

Na osnovu tako izabranih lokaliteta pokušali smo da utvrdimo kako se menjaju osobine biljaka i od čega zavise i koja od populacija ima najbolje osobine. Sa navedenih lokaliteta ispitivano je po 20 reprezentativnih biljaka koje su praćene u fazi punog cvetanja i ispitivana je: visina bokora; širina bokora; broj izdanaka; broj cvetonosnih stabala; broj glavica cvasti; sveža masa korena; suva masa korena; sveža masa listova; suva masa listova; sveža masa cvetonosnog stabla; suva masa cvetonosnog stabla; ukupna sveža masa cvasti; ukupna suva masa cvasti i prosečna sveža masa cvasti.

Sveža masa navedenih biljnih delova je merena na licu mesta. Cvetne glavi- ce su sušene u laboratoriji na vazduhu, u tamnim uslovima. Posle sušenja čuvane su u tamnim bocama u inertnoj atmosferi azota, na temperaturi - 4 °C, do ek- strakcije.

Ispitivanja sadržaja piretrina

Cvasti buhača sa lokacije Trsteno su brane sredinom juna meseca, u fazi pune zrelosti cveta - kada su cvasti bile oblika plitkog tanjira tj. kada su beli jezičasti cvetići u vodoravnom položaju, a u sredini glavice cvasti ima tri do četiri reda otvorenih žutih cvetića. Cvetne glavice su sušene na vazduhu i čuvane u tamnim bocama u inertnoj atmosferi azota na temperaturi - 4°C. Na terenu, sadržaj vlage u biljnom materijalu je iznosio 7,68 %. Uzorci su sušeni do konstantne mase, a zatim je obračunat procentualni sastav. U toku maja i juna 1995. godine vršena je sukcesivna berba. Biljke koje su gajene u Srbiji, donešene u toku februara iz Crne Gore i odgajene u toploj leji, u Centru za pesticide i zaštitu životne sredine. Cvasti su brane takođe u fazi pune zrelosti i pripremane na isti način kao i cvasti donešene iz Crne Gore. Sadržaj vlage je iznosio 7,55 %. Uzorci su sušeni na 105 °C do konstantne mase. Za određivanje sadržaja piretrina kod oba uzorka korišćena je sledeća procedura:

Ekstrakcija piretrina

Za kvantitativnu ekstrakciju piretrina korišćen je superkritični ekstraktor Hewlett Packard 7680A, model koji je 1992. godine povezan sa HP Vectra *QS* kompjuterom koji upravlja sistemom za ekstrakciju.

Uslovi superkritične fluidne ekstrakcije:

- Punjenje posude za ekstrakciju izvršeno je “sendvič postupkom” (0,5 g kvarcnog peska + 0,1 g samlevenog cveta buhača + 0,5 g kvarcnog peska);
- Temperatura posude za ekstrakciju sa uzorkom 45° C;
- Temperatura isparivača za trap 45°C;
- Temperatura trapa za ekstrakciju piretrina 15° C;
- Pritisak CO₂ za ekstrakciju 240 bar;
- Gustina CO₂ za ekstrakciju 0,85 g/mm;
- Protok CO₂ kroz sistem za vreme dinamičke ekstrakcije 1 cm³/min;
- Za eluiranje piretrina sa apsorbcione kolone upotrebljen je acetonitril HPLC čistoće, u zapremini 1,3 mm, pri protoku od 0,5 mm, na temperaturi kolone od 60° C. Uzorci su sakupljeni u posebnim hermetički zatvorenim posudicama 2 ml), i odmah upotrebljeni za kvantitativnu analizu.

HPLC analiza piretrina

Za određivanje sadržaja piretrina u dobijenim frakcijama korišćen je Diode Arey UV detektor, koji je bio u sklopu tečnog hromatografa HP 1090. Kolona (dužine 200 x 2,1 mm) je bila napunjena Hipersil-om ODS 5 mm. Kao eluent je korišćena smeša acetonitril: voda (70:30). Protok rastvarača je bio 0,5 ml/min na temperaturi kolone 30° C. Vreme trajanja analize iznosilo je 30 minuta, a detekcija jedinjenja je na talasnoj dužini 240 nm.

REZULTATI

Od ukupno 13 ispitivanih lokaliteta, na 5 nalazimo zemljišta koja pripadaju tipu litosola na krečnjaku, na 3 zemljišta koja pripadaju tipu crvenica, na 4 zemljišta koja pripadaju tipu crnice na krečnjaku, i na zemljišta koja pripadaju deposola. Sva ova zemljišta su dobro propusna za vodu i dobro obezbeđena kalcijumom. Ovo potvrđuje zaključak Stepanovića (1983) i Šilića (1984) da su najpovoljnija zemljišta za gajenje buhača ona koja su dobro propusna za vodu i koja su dobro obezbeđena kalcijumom, dakle zemljišta na krečnjačkoj podlozi, kakva su i zemljišta njegovih prirodnih staništa.

U pogledu klime lokaliteti Skadar II, Trsteno, Buljarica, Skadar I, Buljarica maslinjak Perazića Do, Rjeka Crnojevica, Petrovac III i Skadar III imaju prosečno veće mesečne temperature i izrazito manju sumu padavina nego lokaliteti Borići, Orijen i Cetinje. Takođe, lokaliteti Trsteno, Buljarica i Perazića Do su neposredno pored mora (i pod njegovim uticajem) i na južnim ekspozicijama (što ima velikog uticaja na osunčanost). Lokaliteti Skadar I, Skadar II, Skadar III i Rijeka Crnojevića su pod klimatskim uticajem Skadarskog jezera i sa severnom i severo - za padnom ekspozicijom (izuzev lokaliteta Rjeka Crnojevica koji ima južnu ekspoziciju).

Daljim razmatranjem morfoloških i produktivnih osobina biljaka, za svaku osobinu pojedinačno, pokušano je da se utvrdi veza sa zemljišnim i klimatskim osobinama svakog lokaliteta.

U praćenju morfoloških osobina biljaka radi lakše orijentacije o lokalitetima oni su poređani po rastućim nadmorskim visinama, a i za svaku pojedinačnu osobinu urađena je linija trenda u odnosu na nadmorsku visinu da bi se utvrdilo kakav je uticaj nadmorske visine.

Sve ispitivane vrednosti morfoloških i produktivnih osobina su ispitivane upoređivanjem srednjih vrednosti po jednoj biljci, koje su dobijene kao prosek od 20 reprezentativnih biljaka sa svakog lokaliteta.

Da bi došli do zaključaka o odnosima između ispitivanih morfoloških i produktivnih osobina urađene su njihove proste fenotipske korelacije. Ako se broj glavica cvasti i sveža masa cvasti uzmu kao najvažnije osobine za gajenje buhača i posmatraju korelacione zavisnosti između njih i ostalih osobina dolazimo do sledećih zaključaka:

- najveći stepen korelacija dobijen je kada se poredi broj glavica cvasti sa ukupnom svežom masom cvasti ($r = 0,9679$). Nešto slabija korelativna zavisnost dobijena je kada se broj glavica cvasti poredi sa: brojem izdanaka ($r = 0,73149$); svežom masom korena ($r = 0,77370$); svežom masom stabla ($r = 0,94033$); a zatim sveža masa cvasti u odnosu na: širinu bokora ($r = 0,68319$); broj izdanaka ($r = 0,72714$); svežu masu korena ($r = 0,87058$) i svežu masu stabla ($r = 0,95666$).

- iz navedenih korelacija se može zaključiti da treba birati biljke bujnijeg habitusa tj. sa što većim brojem izdanaka, većom širinom bokora, većom svežom masom korena i stabla. Između pojedinih osobina se javljaju i slabe negativne korelacije, kao što je na primer korelacija između visine bokora i sveže mase listova ($r = -0,125955$).

Ovakva i slična ispitivanja međusobnih odnosa između različitih važnih svojstava buhača i sadržaja piretrina su dosta rađena, jer se utvrđivanjem takvih odnosa olakšava selekcija genotipova, koji se razlikuju u sadržaju piretrina i bez korišćenja hemijskih analiza. Takođe, u mnogim radovima je prikazano da sadržaj piretrina nije u korelaciji sa svim morfološkim osobinama buhača. Tako su Pandita i Bath (1984 i 1986) pokazali da prečnik tanjira (odnosno broj cvetića u njima) u određenom stepenu korelira sa sadržajem piretrina u cvasti ($r = 0,416$) ali ne i sa sadržajem piretrina u celoj cvasti. Druge korelacije od interesa za gajenje i selekciju pokazuju da broj glavica cvasti po biljci ima veću vrednost koeficijenta korelacije prema ukupnom prinosu suvih cvasti, nego ako se korelira sa masom pojedinačnih cvasti. Prema ovim autorima postoji pozitivna korelacija prečnika busena sa visinom biljaka i brojem cvasti po biljci. U našim ispitivanjima to nije potvrđeno jer je dobijena vrednost koeficijenta korelacije između širine tj. prečnika bokora i visine, niska ($r = 0,32269$), a između širine bokora i broja glavica cvasti nešto viša ($r = 0,59021$). Nasuprot tome, nije dobijena korelativna zavisnost između visine bokora i broja cvetonosnih stabala ($r = 0,10149$). Parlevliet (1974) je pokazao ispitujući 42 klonova, da sadržaj piretrina nije u nikakvoj korelaciji s masom cvasti i prinosom.

Kompjuterski vodena ekstrakcija omogućuje potpunu kontrolu uslova ekstrakcije i elucije, višestruko smanjenje vremena ekstrakcije u odnosu na do sada korišćene postupke, vođenje zapisa o postupku i toku ekstrakcije svakog uzorka (GPL). Primenom superkritične ekstrakcije u kombinaciji sa tačnom hromatografijom visokog pritiska utvrđeno je da cvetovi buhača sa lokacije Trsteno sadrže 0,78% piretrina. Drugi ispitivani uzorak buhača od cvasti branih toku maja

i juna 1995. godine u Centru za pesticide i zaštitu životne sredine sadrži 0,70 % piretrina. I jedan i drugi uzorak imaju približno iste vrednosti sadržaja piretrina. Pošto se radi o istoj populaciji, jer su i biljke odgajene u toploj leji takođe sa lokacije Trsteno, a dobijeni rezultati pokazuju da postoje neznatne razlike u sadržaju piretrina može se zaključiti da se presađivanjem u uslove Srbije nije značajno smanjio procent piretrina u cvastima buhača. Takođe na osnovu ovih vrednosti može se zaključiti da su dobijene vrednosti u skladu sa rezultatima Ivanića (1970) i Parlevlleta i sar. (1979) na donjoj granici koju propisuje EPA (1986).

Prirodna staništa buhača mogu se na osnovu terenskih ispitivanja odabranih lokaliteta okarakterisati kao heterogena, imajući u vidu heterogenost klimatskih uslova, zemljišta i orografskih prilika. Ova staništa izložena su uticaju mediteranske i submediteranske klime koju karakterišu suva i topla leta i blage zime sa povećanom količinom padavina. Klimatski uslovi pojedinih lokaliteta značajno su modifikovani pod uticajem izraženog reljefa sa kraškim odlikama .

Ispitivani lokaliteti se nalaze na različitim nadmorskim visinama (od 65m nm do 1000 m nm), sa izraženim nagibom, često većim od 40° i u većini sa južnom, jugo-zapadnom i jugo-istočnom ekspozicijom. Zemljišta na odabranim lokalitetima mogu se svrstati u sledeće tipove: tip kamenjara (litosola), tip krečnjacko-dolomitnih crnica (kalkomelanosola), tip crvenica (*terra rossa*) i tip zemljišta deponija (deposola).

Ispitivanjem morfoloških i produktivnih osobina buhača može se zaključiti da iste veoma variraju u zavisnosti od uslova staništa. Vrednosti ispitivanih osobina se kreću: visine bokora od 44,7 cm na lokalitetu Perazića Do, do 64,9 cm na lokalitetu Trsteno; širine bokora od 5,1cm na lokalitetu Borići do 14,4cm na lokalitetu Skadar II; broja izdanaka od 2,0 na lokalitetu Borići do 12,4 na lokalitetu Petrovac III; broja cvetonosnih stabala od 3,5 na lokalitetu Borići do 31,0 na lokalitetu Trsteno; broja glavica cvasti od 3,5 na lokalitetu Borići do 31 g na lokalitetu Trsteno; sveže mase korena od 2,04 g na lokalitetu Borići do 31 na lokalitetu Trsteno; suve mase korena od 1,08 g na lokalitetu Borići do 15,3 g na lokalitetu Trsteno; sveže mase listova od 3,19 g na lokalitetu Borići do 13,8 g na lokalitetu Orijen; suve mase listova od 1,88 g na lokalitetu Borići do 6,82 g na lokalitetu Skadar I; sveže mase cvetonosnog stabla od 2,51 g na lokalitetu Borići do 18,05 g na lokalitetu Trsteno; suve mase cvetonosnog stabla od 0,7 g na lokalitetu Borići do 8,8 g na lokalitetu Trsteno; ukupne sveže mase cvasti od 1,14 g na lokalitetu Borići do 12,32 g na lokalitetu Trsteno; odnosa sveže i suve mase cvasti od 5,64 na lokalitetima Skadar I i Perazića Dodo 1,72 na lokalitetu Trsteno i prosečne sveže mase cvasti od 0,05 g na lokalitetu Rjeka Crnojevića do 0,23 g na lokalitetu Trsteno. Navedene osobine su najvažnije u gajenju buhača. Ispitujući njihove vrednosti (i statističku značajnost razlika između njih) zaključujemo da biljke sa lokaliteta Trsteno imaju najpovoljnije vrednosti ispitivanih osobina, i za

dalje gajenje u uslovima Srbije treba introdukovati ovu populaciju. Ispitivanjem korelativnih veza između morfoloških i produktivnih osobina uočeno je da postoji jaka korelaciona zavisnost između broja glavica cvasti i sledećih osobina: sveže mase cvasti ($r = 0,9679$), sveže mase stabla ($r = 0,94033$), sveže mase korena ($r = 0,77370$) i broja izdanaka ($r = 0,73149$). Takođe, značajna korelaciona zavisnost postoji i između sveže mase cvasti i sveže mase stabla ($r = 0,95666$), sveže mase korena ($r = 0,87058$), broja izdanaka ($r = 0,72714$) i širine bokora ($r = 0,68319$). Jedina negativna korelacija postoji između visine bokora i sveže mase listova ($r = -0,125955$). Iz navedenih odnosa morfoloških i produktivnih osobina zaključujemo da je za dobijanje većeg prinosa cvasti potrebno birati biljke bujnijeg habitusa tj. sa što većim brojem izdanaka, većom širinom bokora i većom svežom masom korena. Prisustvo piretrina (I i II) u cvastima buhača je osobina zbog koje se sakuplja i gaji buhač. U našim istraživanjima procenat ukupnih piretrina (I i II) iznosi 0,78% u cvastima biljaka sa lokaliteta Trsteno i 0,70 % u cvastima biljaka koje su sa lokaliteta Trsteno prenete (i odgajene) u ekološkim uslovima Srbije (u Zemunu). Dobijeni rezultati pokazuju da postoje neznatne razlike u sadržaju i može se zaključiti da se gajenjem u ekološkim uslovima Srbije procenat piretrina nije značajno smanjio. Obe vrednosti su na granici koja je propisana za *Pyrethri flos* (koji prema Ph. Jug. II treba da sadrži najmanje 0,8 % piretrina I i II).

DISKUSIJA

Buhač ima veoma male zahteve prema zemljištu, tako da se može gajiti na degradiranim drugim zemljištima na kojima se ne može organizovati intenzivna biljna proizvodnja (Ivanić, 1970; Muturi i sar., 1969; Stepanović, 1969). Takvih zemljišta u našoj zemlji ima dosta i na njima postoji ekonomski interes za gajenje buhača. Trenutno u našoj zemlji nema površina pod gajenim buhačem. Na osnovu ispitivanja heritabilnosti različitih osobina buhača (Casida i Quistad, 1995) zaključeno je da na osobine buhača mnogo više utiče lokalitet, tako da ispitivanje osobina populacija sa različitih lokaliteta smernica u odabiranju najbolje populacije za dalje gajenje i selekciju. Buhač može uspevati u klimatskim uslovima Srbije i njegove osobine se ne razlikuju mnogo od osobina biljaka koje autohtono rastu na jadranskoj obali. Međutim, ova istraživanja (Ivanić, 1970; Stepanović, 1969) su se odnosila samo na gajenje buhača iz gajene, a ne na samonikle populacije. Cilj ovog istraživanja je bio da se dobije što više podataka o osobinama samoniklog buhača sa prirodnih staništa Crne Gore. Buhač kao jedna od endemičnih biljaka naše flore zaslužuje ispitivanja i sa tog aspekta. To podrazumeva pre svega da se odrede lokaliteti na kojima buhač raste, jer u literaturi nema karata rasprostranjenja buhača u Crnoj Gori. Takođe, cilj je bio da se

ispitaju ekološki uslovi na pojedinim lokalitetima i uporede sa osobinama biljaka. Ova istraživanja bi dala polazne informacije o tome koja populacija ima najbolje osobine i o mogućnosti njenog razmnožavanja i gajenja.

Rad na selekciji buhača u svetu je doveo do stvaranja klonova sa izuzetnim proizvodnim osobinama: visok prinos, veliki procenat piretrina, idealan odnos piretrina I i II, ujednačene osobine stabla i istovremeno cvetanje, otpornost na poleganje, tolerantnost-otpornost na bolesti i štetočine i uslove spoljne sredine (Bhat cit. po Casida i Quistad, 1995). Cilj je da se što više ispituju lokaliteti buhača iz Crne Gore i mogućnost njihovog gajenja u Srbiji gde bi se vršila dalja selekcija ako se to pokaže opravdanim. Parlevliet i sar. (1979) su slično istraživanje uradili sa 21 populacijom buhača iz Dalmacije 1971. godine i zatim ih preneli u Keniju da bi se na njima nastavio rad na selekciji buhača.

U literaturi nema podataka o morfološkim osobinama biljaka buhača iz Crne Gore. Pošto je ovo istraživanje imalo za cilj da se izabere najbolja populacija koja bi se zatim gajila u uslovima Srbije u komercijalnim zasadima, kao osnova u izboru parametara korišćena su istraživanja autora koji su ispitivali mor jenog buhača. U istraživanju Ivanića (1970) mereni su sledeći morfološki pokazatelji razvijenost (%), visina (cm), broj cvetonosnih stabljika, broj glavica cvasti i prinos. Stepanović (1969) je pratio prosečan broj cvasti po biljci. Parlevliet (1969) je pratio veličinu cvetova i odnos suve i sveže mase. Ispitivanja koje su vršili Parlevliet and Contant (1970), Singh and Rajeswara Rao (1985), Bhat and Menary (1986) i Sing et. al. (1987), (cit. po Casida i Quistad, 1995), odnosila su se na količinu piretrina, prinos cvasti, broj cvasti po biljci, težinu cvasti (težina 100 cvasti), visinu biljaka, dužinu izdanaka, prečnik bokora, otpornost na poleganje, dužinu korena i suhu težinu korena. Ovi autori su pokazali da je vrednost heritabilnosti u širem smislu za ispitivane parametare veoma visoka. Izrazito je visoka vrednost za količinu piretrina, ali i za druge parametre, izuzev za suhu težinu korena. Na osnovu ovih vrednosti može se zaključiti da na ove osobine mnogo više utiče genotip, nego spoljašnji uslovi (lokalitet).

Mnogi autori su se bavili istraživanjima koliko na osobine buhača utiču uslovi staništa. Ispitivanja Muturi i sar., (1969) su pokazala da na prinos i procent piretrina najviše utiču padavine i temperatura. Koeficijent korelacije između sadržaja piretrina i padavina je bio 0,70, a između sadržaja piretrina višestruka korelacija sva tri parametra daje $r = 0,98$, što znači da 98% variranja sadržaja piretrina može da se objasni variranjima u padavinama i temperaturi. Takođe, pokazano je da se u predelima sa velikom oblačnošću procent piretrina jako smanjuje. Parlevliet sar., (1969) su pokazali da nadmorska visina takođe utiče sadržaj piretrina i prinos, ispitujući 25 klonova na nadmorskim visinama od 7000 do 9100 stopa u Keniji. Oni su dokazali da na promenu nadmorske visine ne reaguju svi klonovi podjednako. Din i Paltoo (1976) su u toku 1973-1975. godine,

u Kašmiru (Indija) ispitivali uticaj NPK đubrenja na bokorenje, formiranje pupoljaka i prinos cvasti. Pokazali su da 60 kg N po hektaru izaziva povećanje broja izdanaka od 12-33 %, broja pupoljaka 18-68 % a prinosa od 18-125 %. Đubrenje sa P i K nije pokazalo značajne efekte. Slične rezultate dobio je i Peneva (1971). Martin i Tattersfield (cit. po Ivaniću, 1970) su proučavajući uticaj temperature vazduha u toku zime i leta i uticaj osvetljavanja, došli do zaključka da je zimsko mirovanje sa dovoljno niskim temperaturama potrebno buhaču za normalno razvijanje i cvetanje, kao i da nedovoljan broj sunčanih dana loše utiče, bez obzira na temperaturu.

Danas su u selekcionom programu u Australiji, Keniji i SAD dobiveni klo-novi sa više od 3 % ukupnog piretrina. Podaci saradnika Instituta za proučavanje lekovitog bilja "Dr Josif Pančić" (Stepanović, 1969) pokazuju da je procent ukupnog piretrina u domaćim populacijama varirao od 0,5 - 1,8 %. U toku 1961-1963. godine vršena su najobimnija istraživanja buhača kod nas (Ivanić, 1970) i odnosila su se na mogućnosti gajenja buhača u uslovima Srbije. Iz semena od jedne populacija gajenih u Segetu kraj Splita su odgajene mlade biljčice i rasadene na 8 mesta u Srbiji i Vojvodini. Zemljišta su bila slabo produktivna a dobiveni rezultati su pokazali da je procenat piretrina varirao od 0,8 % do 1,1 %. Po standardima Svetske organizacije za zaštitu životne sredine (EPA) sadržaj piretrina varira u granicama 0,8-2,8 % (EPA, 1986). Ispitivanja Parlevlieta i sar., (1979), koji su u toku leta 1971. godine prikupili 20 divljih populacija iz Dalmacije i preneli ih na dve lokacije u Keniji pokazuju da su samonikli varijeteti imali prosečno 0.89 % ukupnog piretrina (0,75-1,04 %).

Jedna od najsavremenjih metoda ekstrakcije piretrina je metod superkritične ekstrakcije. Pomoću CO₂ kao rastvarača izbegava se izlaganje ekstrakta toploti kao u standardnoj proceduri, a omogućena je kontinuiranost, smanjen je broj operacija, relativno je brzo dobijanje najpovoljnijih uslova za ekstrakciju, manji gubici, visoka reproduktivnost i velika pouzdanost (100% "recovery").

LITERATURA

- Amos, T.G., Evans, P. W.C. (1978): Use of synergised pyrethrin processed sultanas from insect attac, *Pyrethrum post*, 14: 76-78.
- Anonimus (1977): Pyrethrum its safety sells it. *International Trade Forum April-June*, 37: 15-16.
- Anonimus (1992): Pyrethrum extract. *Pharm. Rev.*, 18: 3046.
- Baba, N., Kirihata, M., Ohno, M. and Takano, T. (1972): Orthophosphoric acid method for the pyrethrum assay. *Bochu-Kagaku*, 37: 155.
- Baba, N., Kirihata, M., Takano, T. and Ohno, M. (1972): Color reaction of pyretrins and eugenol with ortophosphoric, sulfuric, and hacids, *Buull. Inst. Chem. Res. Kyoto Univ.* 50: 150-159.
- Bhaskar, P. Saxena, Opender Koul, S.C. Gupta (1977): Synergist for pyrethrum: II. Derivates of dihydro dillapiole, *Pyrethrum post*, 44: 41-44.
- Bhavnagaiy, H.M., Ahmed, S.M. (1973): Spectrophotometric method for the microdetermination in the presence of pyrethrins. *Analyst (London)*, 98: 792-796.
- Bhavnagaiy, H.M., Ahmed, S.M. and Gupta, M.R. (1973): New colorimetric method for the microdetermination of pyrethrins. *Res. Ind.*, 18: 21-23.
- Briggs, G.G., Elliot, M., Farnham, A. W., Janes, N. F. (1974): Structural aspectsof the the knockdown of pyrethroids, *Pestic. Sci.*, 5: 643-649.
- Brown, A.F. (1965): A pirethrum improvment programme, *Pyrethrum post*, 8: 8-10.
- Bullivant, M.J., Pattenden, G. (1976): Photodecomposition of natural pyrethrins and related compounds, *Pest. Sci.*, 7: 231-235.
- Casida, J.E., Gary, b. Quistrad (1995): "Pyretrum Flowers – production, chemistry, toxicology, and uses". Oxford University Press, Oxford.
- Casida, J.E. (ed.) (1973): "Pyrethrumm, The Natural Insekticide". Academic Press, New York, and London.
- Carls, R. Knipe and Jenifer, V., Smith, (1995): Hewlett - Pacard Coo Avondale Division, Application note: 228-132.
- Chandler, S.E. (1951): Botanic aspect of pyrethrum. General considerations: the seat of active principles, *Pyrethrum post*, 2: 1-9.
- Class, T.J. , and Frensinius , J. (1992): Gc and m.s. studies on pyrethroid photo-and bio-transformation. *Anal. Chem.*, 342: 805-808.

- Cochran, D.G. (1994): Resistance to pyrethrins in the German cockroach: inheritance and gene frequency estimates in field - collected (Dyctioptera: Blattellidae), J. Econ. Entomol., 87: 280-284.
- Cupac, S. (2000): Karakteristike zemljišta prirodnih staništa buhača (*Tanacetum cinerariaefolium* Trev.) na području Crne Gore. Magistarska teza. Poljoprivredni fakultet, Zemun.
- DePrins, H.C. (1973): Colorimetric estimation of pyrethrins in pyrethrum flowers. Pyrethrum post, 12: 22-33.
- Donegan, L., Morrison, J.N. and Webley, D.J. (1971): Rapid field assay for pyrethrum flowers, Pyrethrum post, 11: 36-40.
- Đuretić, G. (1993): Potencijal i kvalitet zemljišta Crne Gore. Zbornik radova Savjetovanja - Predpostavke i potencijali realizacije ideje „Ekološka država Crna Gora“.
- Farmakopeja FNRJ (1951): (Pharmacopoea jugoslavica edition secunda, Ph.Jug II), „Medicinska knjiga“, Beograd, 1951.
- Ganadinger, C.B (1945): Pyrethrum flowers. Second Edition, Minneapolis, 1936, Supplement: 1936-1945.
- Georghiou, G.P. (1990): Overview of insecticide resistance. In Managing Resistance to Agrochemicals” (M.B. Green, H.M. LeBarorMoberg, eds.), pp. 18-4 LACS Symp. Ser., 421, American Chemical Society, Washington, DC.
- Gligić, V. (1953): Etimološki botanički rečnik, Beograd.
- Glyne Jones, G.D. and Sylvester, N.K. (1966): Pyrethrum as an Insect Repellent. Part I Literature Review, Pyrethrum post, 8: 38-42.
- Gosudarstvenaja farmakopeja SSSR, IX (1961): Medgiz, Moskva.
- Head, S.W. (1966): A study of the Insecticidal Constituents in *Chrysanthemum cinerariaefolium* (1) Their Development in the Flower Head distribution in plant Pyrethrum post, 8: 32-37.
- Hogenbrik, J.C., Wein, R.W. (1992): Temperature Effects on Seedling Emergence from Boreal Wetland soils - Implications and Change, Aquatic Botany, 42: 361-373.
- Ivanić, R. (1970): Mogućnosti gajenja buhača u uslovima SR Srbije. Naučna knjiga, Beograd.
- Jackson G.J. (1989): The pyrethroid insecticides: a scientific advance for human welfare? Pestic. Sci., 27: 335-467.
- Karki, A. and Rajbhandry, S.B. (1984): Clonal propagation of *Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis. (pyrethrum) through Pyrethrum post, 15: 118-121.

- Kojić, M., Popović, R., Karadžić, B. (1998): Sintaksonomski pregled vegetacije Srbije, IBSS, Beograd.
- Kovačević, Vesna, Vinterhalter, Branka, Vinterhalter, D., Jovanović, Lj., Marisavljević, Dragana (1998): In vitro razmnožavanje buhača *Pyrethrum cinerariaefolium* Trev., Acta Herbologica, 7: 109-116.
- Levy, L.W. (1981): A large - scale application of tissue culture: The masspropagation of pyrethrum 'clones in Ecuador. *Envr. Exper. Botany*, 21: 389-395.
- Lockhart, A.J. (1964): Physiological studies on light sensitive stem growth *Planta*, 62: 97-115.
- MacDonald, W. (1994): *Pyrethrum flowers: production, chemistry and uses*, Oxford University Press: 49-54.
- Marshall, R.A.G. (1997): Colorimetric method for determination of iron in pyrethrum extrat *Analyst (London)*, 98: 792-796.
- Marre E., (1979): Fusicoccin: a tool in plant physiology, *Ann. Physiol.* 30: 273-288.
- Matković, P. (1959): *Vegetacija Marjana*. Znanstvena biblioteka, pododbor matice Hrvatske, Split.
- Morre, J.B. (1966): Chemistry and biochemistry of pyrethrins, *Pyrethrum post*, 8: 27-31.
- Morre J.B. and Levey L.W. (1975): *Pyrethrum sources and uses*. Part. I. Commercial sources of pyrethrum. In "Pyrethrum Flowers" (R.H. Nelson ed.), McLaughlin Gromley King Co., Mineapolis, Minesota: 1-9.
- Mutiiri, S.N., Parlevliet, J.E., and Brewer, J.G. (1969): Ecological Requirements of Requirements of Pyrethrum I. A. General Review, *Pyrethrum post*, 10: 24-28.
- Ngugi, C.J.V. and Ikahu, J.M.K. (1990): The effect of drying temperatures on pyrethrins content in some pyrethrum clones, *Pyrethrum Post*, 18: 18- 21.
- Nieass, C.S., Wainwright, M.S. and Chaplin, R.P. (1984): Applications of a technique for the HPLC analysis of liquid carbon dioxide solutions. *J.Liquid Chromatogr.*, 7: 493-508.
- Ožanić, S. (1930): *Buhač*. Izdanje Ministarstva poljoprivrede br. 24, Beograd.
- Pal, A. and Dhar, K. (1985): Callus and organ development of pyrethrum (*Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis.) and analysis of their cytological status. *Pyrethrum post*, 16: 3-11.
- Parlevliet, J.E. (1974): The genetic variability of the yield components in the Kenyan pyrethrum population. *Euphytica*, 23: 377-389.

- Parlevliet, J.E., Brewer, J.G. and Ottaro, W.G.M. (1979): Collecting pyrethrum, *Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis. in Yugoslavia for Kenya. Proc. Conf. Broadening Genet. Base Crops, Wageningen 1978., pp. 91-96.
- Parlevliet, J.E, Muturi, S.N., and Brewer J.G. (1969): Ecological Requirements of Pyrethrum II. Regional Adaptation of Pyrethrum post, 10: 28-29.
- Parmar, B.S. (1974): Some studies using mixed synergist with, Pyrethrum post, 12: 121-122.
- Pattenden, G. (1970): Biosynthesis of pyrethrins. Pyrethrum post, 1.
- Peneva, P. (1971): Effect of mineral fertilization on the level of active substances in pyrethrum (*Chrysanthemum cinerariaefolium*) and *Artemisia maritima* var. *Salina*. Farmatsiya, Sofia, 21-38.
- Phipers, R.F. u redakciji Peach K., Tracey, M.V. (1955): Modern Methods of Plant Analysis, II, 43, Berlin.
- Radojičić, B. (1999): Klima Crne Gore. Zbornik radova sa savetovanja - Pretpostavke i potencijali realizacije ideje "Ekoloska države Crne Gore". Ministarstvo zaštite životne sredine RCG, Univerzitet Crne Gore, Podgorica, 1-15.
- Roest, S. and Bokelmann, G.S. (1973): Vegetative propagation of *Chrysanthemum cinerariaefolium* in vitro, Scientia Horticu., 1: 120-122.
- Roger. L Firor, Hewlett - Packard Co., (1990): Avondale Division Evaluation Of Agricultural - Soil Extracts Containing Es-Triazines and Alachlor Using the Electron Capture Detector and on-Colum Insection, Hewlett- Packard Application note: 228-112.
- Roger, L. Firor, Hewlett-Packard Co., (1992): Avondale Division Electron Capture Dector Evaluation of Soil Extracts Containing 2,4,5 - trichlorophenoxyacetic acid Hewlett- Packard Application note: 121-129.
- Seda, L., Tominelly, G., and Sartorel, B. (1983): Gas analysis of pyrethrum extracts using glass capillary columns. Riv. Ital. Sostanze: 133-137.
- Sims, M. (1982): Process uses liquid carbon dioxide for botanical extracts, Chem. Eng. (New York), 89: 50-51.
- Singh, R.P., Tomar, S.S., Attri, B.S., Farmer, B.S., Mahesh, Mukerjee, S.K. (1976): Search for new pyrethrum synergists in some botanicals, Pyrethrum post, 13: 91-93.
- Stepanović, B. (1969): Prilog proučavanju mogućnosti širenja buhača *Pyrethrum cinerariaefolium* Trev. Interni izveštaj Instituta za proučavanje lekovitog bilja "Dr Josif Pančić".

- Sthal, E. and Schuetz, E. (1980): Extraction of natural compounds with supercritical gases. 3 Pyrethrum extracts with liquefied and supercritical: carbon dioxide. *Planta Medica*, 40: 12-21.
- Taj-ud-Din, H. and Paltoo, R. (1976): Effect of NPK fertilization on tillering flower bud formation, and fresh flower yield of pyrethrum crop. *Pyrethrum post*, 13: 89-90.
- Černjavski, P., Gevbensčikov, O., Pavlović, Z. (1949): O vegetaciji i flori skadarskog područja. *Glasnik prirodjačkog muzeja srpske zemlje, serija B - biološke nauke - knjiga 1 i 2. Naučna knjiga, Beograd*, 5-91.
- Veresbaranji, I., Šovljanski, R., Pucarević, M., Kastori, R., (1993): Zagađenost zemljišta Vojvodine pesticidima i njihovim metabolitima, Teški metali i pesticidi u zemljištu. *Poljoprivredni fakultet, Institut za ratarstvo i povrtarstvo*: 223-258.
- Volkov, Y.P., and Starkov, A.V. (1970): Detection of the components of pyrethrins in pyrethrum extracts using thin-layer chromatography their 2,4-dinitrophenyl hydrazones. *Tr. Tsent. Nauch.- Issled, Dezinfek. Inst.*, 19: 257-259.
- Wambugu, F.M. and Rangan, T.S. (1981): In vitro clonal multiplication of pyrethrum (*Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis.) by micropropagation *Plant Sci. Lett.*, 22: 219-226.
- Winney, R. Webley, D. J. (1969): The biological activity of mosquito coils of different "pyrethrins" composition, *Pyrethrum post*, 10: 44-48.
- Wing, K.D., Hammock, B.D. and Wustner, D.A. (1978): Development of an S-bioallethrin specific antibody. *J. Agric. Food Chem.*, 26: 1328-1333.
- Wieboldt, R.C., and Smith, J.A. (1988): Supercritical fluid chromatography with Fourier transform infra-red detection. In "Supercritical Fluid Extraction Chromatography" *ACS Sump. Ser.*, 336, pp. 229-232.
- Wieboldt, R.C., Kempert, K.D., Later, D.W., and Kampebell, E.R. (1989): Analysis for pyrethrins using capillary supercritical fluid chromatography and capillary g.c. with Fourier transform infra-red detection. *J. High Resol. Chromatogr.*, 12: 106-111.

(Priljeno: 10.03.2011.)

(Prihvaćeno: 15.03.2011.)

INVESTIGATION OF PROPERTIES OF PYRETHRUM IN NATURAL HABITATS OF MONTENEGRO

DRAGANA MARISAVLJEVIĆ

Institute for Plant Protection and Environment, Belgrade, Serbia

e-mail: marisavljevicd@yahoo.com

SUMMARY

Pyrethrum (*Chrysanthemum cinerarifolium* Vis.) is endemic plant to Montenegro, Croatia and Albania. Insecticidal pyrethrin compounds (pyrethrin I i II) extracted from pyrethrum flowers. As pyrethrum research has been scarce in this country so far our primary objective was to provide data on the morphology and type of habitats of wild pyrethrum in various parts of Montenegro and data on its introduction into climatic conditions of central Serbia.

The following morphological and productivity parameters were investigated: Cluster width, cluster height, number of shoots and flower – bearing stems, number of flower-heads, fresh and dry weight of roots, stem, leaves and flowers. Determined and seed germination and pyrethrum content.

The results show the pyrethrin mean in the flower be around 0,7% while most favourable properties were found in plant of the Trsteno locality. Percent of pyrethrin was similar in the plants grown in ecological conditions of central Serbia.

Key words: pyrethrum, Montenegro, supercritical extraction, liquid chromatography, HPLC.

(Received: 10.03.2011.)

(Accepted: 15.03.2011.)