

UNIVERZA NA PRIMORSKEM  
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN  
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

ZAKLJUČNA NALOGA  
VZPOSTAVITEV RASTLINSKE TKIVNE KULTURE IZ  
MLADIH POGANJKOV ARTIČOKE  
(*Cynara cardunculus* L.)

PETRA GABROVŠEK

UNIVERZA NA PRIMORSKEM  
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN  
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

Zaključna naloga

**Vzpostavitev rastlinske tkivne kulture iz mladih poganjkov  
artičoke (*Cynara cardunculus* L.)**

(Establishment of plant tissue culture from young shoots of artichoke  
(*Cynara cardunculus* L.))

Ime in priimek: Petra Gabrovšek  
Študijski program: Biodiverziteta  
Mentor: doc. dr. Matjaž Hladnik

Koper, september 2019

## Ključna dokumentacijska informacija

Ime in PRIIMEK: Petra GABROVŠEK

Naslov zaključne naloge: Vzpostavitev rastlinske tkivne kulture iz mladih poganjkov artičoke (*Cynara cardunculus* L.)

Kraj: Koper

Leto: 2019

Število listov: 45

Število slik: 5

Število tabel: 11

Število referenc: 40

Mentor: doc. dr. Matjaž Hladnik

Ključne besede: *Cynara cardunculus* L., rastlinska tkivna kultura, mladi poganjki, sterilizacija, tidiazuron, subkultiviranje

Izvleček:

*Cynara cardunculus* L. je rastlina iz družine nebinovk (Asteraceae), ki uspeva na območju sredozemskega bazena in se jo uporablja za prehrano, v medicini in farmaciji. Naš namen je bil vzpostaviti rastlinsko tkivno kulturo iz mladih poganjkov artičoke ter nato opazovati razvoj vršičkov poganjkov, število novo nastalih poganjkov ter primernost poganjkov za subkultivacijo. Inokulacijo izsečkov smo izvedli v dveh poskusih, ki sta se razlikovala v načinu sterilizacije (v prvem poskusu smo sterilizirali s 70 % etanolom in 10 % raztopino natrijevega hipoklorita, v drugem poskusu pa s 70 % etanolom in 1,67 % raztopino dikloroizocianurne kisline). Izsečke smo pripravili tako, da smo mladim poganjkom odrezali tkivo tik nad mestom, kjer izraščajo listi in spodaj tako, da smo ohranili manjši del koreninskega sistema - in jih nanegli na tri različna gojišča (osnovno gojišče brez hormonov; z dodanim tidiazuronom ter z dodanim tidiazuronom in dodatnimi hranili). Iz prvega poskusa smo uspeli pridobiti kulturo poganjkov v petih nekontaminiranih kozarčkih in jih uporabili za nadaljnji dve subkultivaciji na osnovnem gojišču. Iz drugega poskusa nismo uspeli pridobiti nekontaminirane tkivne kulture. Ob subkultiviranju se je iz izsečkov - izvorno iz gojišča brez hormona razvilo manj poganjkov, kakor tistih, ki so bili predhodno na gojišču s hormonom. Pri nekaterih izsečkih na gojišču s hormonom se je tvoril kalus. Tekom poskusa smo imeli veliko težav s kontaminacijo kljub sterilizaciji (v tkivu prisotni patogeni). Potrebno bi bilo razviti metodo, ki omogoča uspešnejšo sterilizacijo in posledično več novih sadik.

### Key words documentation

Name and SURNAME: Petra GABROVŠEK

Title of the final project paper: Establishment of plant tissue culture from young shoots of artichoke (*Cynara cardunculus* L.)

Place: Koper

Year: 2019

Number of pages: 45

Number of figures: 5

Number of tables: 11

Number of references: 40

Mentor: Assist. Prof. Matjaž Hladnik, PhD

Keywords: *Cynara cardunculus* L., plant tissue culture, young shoots, sterilisation, thidiazuron, subcultivation

Abstract:

*Cynara cardunculus* L. is a plant, belonging to family Asteraceae, which grows in the area of the Mediterranean Basin. It is used as a food source, in medicine and pharmacy. Our aim was to establish plant tissue culture from young shoots of artichoke, observe development and number of shoots and their suitability for subculturing. We sterilized young shoots in two different experiments, that differed in sterilization agent (in first experiment we sterilized with 10 % solution of sodium hypochlorite, and in the second experiment with 1,67 % solution of dichloroisocyanuric acid). Explants were trimmed by cutting of tissue above the stem where leaves grew and below, so that we preserved small part of root system and placed them onto three different media (basic medium without hormone; with added thidiazuron, and with added thidiazuron and extra nutrients). From the first experiment we got 5 uncontaminated glasses with cultures, and used them for two continued subcultivations on basic medium. In the second experiment we were not able to acquire a non contaminated tissue culture. At subculturing less shoots were formed from explants, originally grown on basic medium, than those grown on medium with added growth hormone. For some explants, initiated on a medium with added thidiazuron, we noticed production of callus. During the experiment we had a lot of problems with contamination despite sterilization (in tissue present pathogens). It would be necessary to develop better sterilization method and consequently more new plantlets.

## **ZAHVALA**

Zahvaljujem se mentorju doc. dr. Matjažu Hladniku, za vso pomoč pri nabiranju rastlinskega materiala in delu v laboratoriju ter strokovno pomoč in svetovanje pri izdelavi diplomske naloge.

Zahvaljujem se g. Silvanu Knezu za mlade poganjke artičoke, s katerimi smo vzpostavili rastlinsko tkivno kulturo.

## KAZALO VSEBINE

1	UVOD.....	1
1.1	Namen dela.....	1
1.2	Delovne hipoteze .....	1
1.3	Artičoka.....	2
1.3.1	Klasifikacija.....	2
1.3.2	Domestikacija.....	3
1.3.3	Zgradba in razvojni cikel .....	3
1.3.4	Razmnoževanje.....	4
1.3.5	Okoljske zahteve.....	6
1.4	Rastlinske tkivne kulture (RTK).....	6
1.4.1	Osnovni princip .....	6
1.4.2	Uporaba rastlinskih tkivnih kultur .....	7
1.4.3	Ohranjanje genskega materiala.....	8
1.4.4	Brezvirusni material.....	9
1.4.5	Mikropropagacija.....	9
1.4.6	Sinteza človeku pomembnih spojin .....	10
2	METODE DELA .....	12
2.1	Material .....	12
2.1.1	Kemikalije .....	12
2.1.2	Laboratorijska oprema .....	12
2.1.3	Droben laboratorijski material.....	13
2.1.4	Gojišča .....	13
2.1.5	Rastlinski material .....	15
2.2	Metode .....	15
2.2.1	Priprava gojišč za iniciacijo in subkultiviranje .....	15
2.2.2	Sterilizacija in nanos na gojišča .....	17
2.2.3	Subkultiviranje - prenos rastlinskega materiala .....	20
3	REZULTATI Z DISKUSIJO.....	22
3.1	Sterilizacija in iniciacija kulture artičoke.....	22
3.2	Prvo subkultiviranje .....	27
3.3	Drugo subkultiviranje .....	28
3.4	Pomen rastnih regulatorjev pri indukciji kalusa artičoke.....	29
3.5	Multiplikacijski faktor pri artičoki in pomen različnih dejavnikov .....	30
4	ZAKLJUČEK .....	32
5	LITERATURA IN VIRI.....	33

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Uporabljene kemikalije, njihova kemijska formula in proizvajalec. ....	12
Preglednica 2: Sestava iniciacijskega gojišča I. ....	14
Preglednica 3: Sestava iniciacijskega gojišča II. ....	14
Preglednica 4: Sestava iniciacijskega gojišča III. ....	14
Preglednica 5: Sestava gojišča za subkultiviranje. ....	14
Preglednica 6: Število kontaminiranih in nekontaminiranih kozarčkov z izsečki na iniciacijskem gojišču, po 1. in 2. poskusu nanosov. ....	22
Preglednica 7: Opis nekontaminiranih poganjkov 3 tedne po prvem poskusu iniciacije. ...	26
Preglednica 8: Število kontaminiranih in nekontaminiranih kozarčkov s poganjki po 1. subkultiviranju. ....	27
Preglednica 9: Opis nekontaminiranih poganjkov po 1. subkultiviranju. ....	28
Preglednica 10: Število kontaminiranih in nekontaminiranih poganjkov po 2. subkultiviranju. ....	29
Preglednica 11: Opis nekontaminiranih poganjkov po 2. subkultiviranju. ....	29

## KAZALO SLIK

Slika 1: Poganjek, ki je odgnal izpod materine rastline artičoke (Foto: Petra Gabrovšek). 15	15
Slika 2: Izseček mladega poganjka - postavljen na gojišče (Foto: Petra Gabrovšek). .....18	18
Slika 3: Kozarčki z izsečki na gojiščih, v rastni komori (Foto: Petra Gabrovšek). .....20	20
Slika 4: Dobro razvit, nekontaminiran poganjek na papirnatem krožničku (Foto: Petra Gabrovšek). .....21	21
Slika 5: Tri različne kolonije mikroorganizmov, ki so kontaminirale izsečke (Foto: Petra Gabrovšek). .....23	23



## SEZNAM KRATIC

BAP	6-benzilaminopurin
cm	centimeter
g	gram
GA3	giberelinska kislina
IAA	indol-3-ocetna kislina
IBA	indol-3-maslina kislina
KIN	kinetin
l	liter
mg	miligram
ml	mililiter
MS	Murishage in Skoog gojišče
NAA	naftalen očetna kislina
ppm	število delcev na milijon
RTK	rastlinska/e tkivna/e kultura/e
TDZ	tidiazuron
var.	različica, varieteta
w/v	masno-volumski delež
$\mu$ M	mikromolarna

## 1 UVOD

Artičoka je rastlina, ki uspeva v območju sredozemskega bazena. Ima dve kultivirani varieteti. Prva je artičoka - *Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* (L.) Fiori, ki se jo goji zaradi mesnatega kapituluma. Druga pa je kardij - *C. cardunculus* L. var. *atilis* DC, ki se jo goji zaradi mladih sočnih listov. V komercialne namene se v večini goji varieteto *scolymus* (L.) Fiori z velikim številom sort, vendar so tudi druge varietete in njihove sorte cenjene med pridelovalci (Rottenberg in Zohary 1996).

Zaradi velikega povpraševanja po sadikah različnih sort, so začeli razmnoževati sadike tudi z uporabo tehnik rastlinskih tkivnih kultur. Ker gre za vegetativni način razmnoževanja, rastline ohranijo lastnosti starševskih rastlin. Dobre lastnosti razmnoževanja artičok z rastlinskimi tkivnimi kulturami so, da je mogoče v krajšem času pridobiti večje število sadik na manjši površini in iz manjše količine rastlinskega materiala, v primerjavi z drugimi metodami vegetativnega razmnoževanja. Poleg tega je s tehnikami rastlinskih tkivnih kultur (t.j. termoterapija, kemoterapija) mogoče vzgojiti brezvirusne sadike (Acquadro in sod. 2010; Wang in sod. 2018). Manjša je možnost širjenja drugih patogenih organizmov, v primerjavi s pridelavo sadik na prostem. Razmnoževanje z uporabo rastlinskih tkivnih kultur lahko poteka celo leto, tudi izven rastne dobe. Težave pri tovrstnem načinu razmnoževanja lahko predstavlja prisotnost patogenov v rastlinskem tkivu tudi po sterilizacijskih postopkih ter težave s koreninjenjem sadik (López-Pérez in Martínez 2015). Še en pomemben vidik uporabe artičoke v tkivnih kulturah pa je produkcija najrazličnejših, za človeka pomembnih spojin, na primer pridobivanje kofeoilkinske kisline iz kulture kalusa artičoke, za uporabo v farmaciji (Menin in sod. 2013).

### 1.1 Namen dela

Namen naloge je bil proučiti, kako se inokulirani poganjki artičoke odzovejo na gojiščih z različno sestavo in tako ugotoviti, katero gojišče je najprimernejše za iniciacijo oziroma vzpostavitev kulture. Po inokulaciji smo spremljali odzivnost izsečkov: kakšno tkivo se je razvilo, koliko poganjkov, razvitost poganjkov ter primernost le-teh za nadaljnje razmnoževanje s subkultiviranjem.

### 1.2 Delovne hipoteze

Hipoteze so:

1. Pričakujemo, da bomo z uporabo tehnik rastlinskih tkivnih kultur uspeli vzpostaviti kulturo artičoke.

2. Pričakujemo, da se bodo izsečki po inokulaciji na različna gojišča različno odzvali.
3. Pričakujemo, da bodo poganjki prestavljeni iz iniciacijskega gojišča z dodanim hormonom, na gojišču brez dodanega hormona, razvili večje število novih poganjkov, v primerjavi s poganjki, iz iniciacijskega gojišča brez hormona (kontrola).
4. Pričakujemo, da bodo poganjki po zaključeni fazi iniciacije primerni za nadaljnjo subkultivacijo.

### 1.3 Artičoka

Artičoka z znanstvenim imenom *Cynara cardunculus* L. je diploidna rastlina, za katero je značilno večinoma navzkrižno opraševanje (Rottenberg in Zohary 1996).

Artičoka je zelnata trajnica, ki je pomembna z vidika:

- prehranske vrednosti, saj se jo uporablja v širokem naboru jedi. Pomembna je zaradi hranilne vrednosti, saj vsebuje cinarin, lutein, železo, vitamin C in K, folate in druge snovi (Bianco 2005),
- mlečne industrije, saj njene proteaze omogočajo strjevanje mleka, zato se ponekod še vedno uporablja v tradicionalni pridelavi sira (Figueiredo in sod. 1987) in
- vsebnosti antioksidantnih spojin, kot so fenoli, cinarin, lutein ter vsebnosti inulina v koreninah, ki se ga uporablja tako v prehrani, kot medicini predvsem z vidika sladkorne bolezni (Sonnante in sod. 2007b).

#### 1.3.1 Klasifikacija

Rod *Cynara* L. uvrščamo v naslednje taksonomske skupine, kot je navedeno v spletni bazi podatkov Integrated Taxonomic Information System:

Deblo: Spermatophyta (semenke)

Razred: Magnoliopsida (dvokaličnice)

Nadred: Asteranae

Red: Asterales (košarnice)

Družina: Asteraceae (nebinovke)

Rod: *Cynara* L.

Rod *Cynara* L. obsega osem vrst, ki so bile vanj uvrščene na osnovi analize zaporedja notranjega prepisanega vmesnika (angl. Internal Transcribed Spacer, ITS). Te vrste so *Cynara algarbiensis* Cosson, *Cynara baetica* Pau, *Cynara cardunculus* L., *Cynara cornigera* Lindley, *Cynara cyrenaica* Maire & Weiller, *Cynara humilis* L., *Cynara syriaca* Boiss in *Cynara tournefortii* Boiss (Robba in sod. 2005).

Vrsta *Cynara cardunculus* L. ima tri varietete - var. *sylvestris* (divji kardij), var. *scolymus* (artičoka) in var. *altilis* (kardij), kar podpirajo tudi rezultati analize notranjega prepisanega vmesnika (angl. Internal Transcribed Spacer, ITS) in zunanjega prepisanega vmesnika (angl. External Transcribed Spacer, ETS) (Sonnante in sod. 2007a).

### 1.3.2 Domestikacija

Domestikacija artičoke še ni popolnoma pojasnjena, poleg tega prihaja do razhajanja mnenj različnih raziskovalcev (Pignone in Sonnante 2004; Sonnante in sod. 2007a; Wright 2009).

Prvo možno pot domestikacije in gojenja divje vrste *Cynara cardunculus* L. var. *sylvestris* (Lamk) Fiori predstavljajo Arabci v času srednjega veka (5.–15. stoletje). V tistem obdobju so naseljevali predvsem južni del Sredozemlja. Najverjetneje so vnesli divjo artičoko na območje Sicilije, kjer naj bi se začela domestikacija var. *sylvestris* (Lamk) Fiori, iz katere je človek s selekcijo ustvaril var. *scolymus* (L.) Fiori (Wright 2009).

Rezultati analize sekvenc ribosomske deoksiribonukleinske kisline (rDNK), s katero so Sonnante in sod. (2007a) proučevali evolucijsko zgodovino *Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* (L.) Fiori in var. *altilis* DC in njune povezanosti z drugimi vrstami iz rodu *Cynara* L. nakazujejo na to, da je celoten rod dokaj recenten ter da se je domestikacija artičoke (var. *scolymus*) in kardija (var. *altilis*) zgodila neodvisno ena od druge.

Z vnosom v območje današnje Italije so začele nastajati različne sorte, ki so dobile v veliki večini ime po območju gojenja. Na primer: na območju Italije je sorta 'Terom' imenovana po mestu Teramo, 'Violetto di Toscana' zaradi Toskane, sorta 'Chiusure' po majhni vasi z istim imenom ter sorta 'Empolese' po mestu Empoli (Bedini in sod. 2012).

Predvsem v Italiji je v 15. stoletju artičoka postala pomemben del prehrane. V današnjem času pa je Italija tudi največja pridelovalka artičoke. Sledijo ji Španija, Francija, Egipt ter druge države na obrobju Sredozemskega morja. Francija je največja uvoznica, Španija pa največja izvoznica artičoke (Bianco 2005).

### 1.3.3 Zgradba in razvojni cikel

Pri razmnoževanju s semenom rastline razvijejo koreninski sistem z glavno korenino in nekaj stranskimi koreninami. Pri vegetativnem razmnoževanju pa rastlina razvije nadomestni oziroma adventivni koreninski sistem. Z rastjo se razrašča tudi pritalna listna rozeta, ki izrašča iz zbitega stebela. Na bazi stebela se razvijejo lateralni poganjki - rizomi. Vsak lateralni poganjek ob koncu rastne dobe razvije adventivne korenine. Ob koncu zime se na vrhu zbitega stebela razvije apikalni brst iz katerega zraste cvetno steblo. Pod ugodnimi temperaturnimi razmerami in fotoperiodo se razvije cvetno steblo, ki je cilindrične oblike. Drugi popki se razvijejo na razvejanih cvetnih steblih, ki se ločijo od

listne osi glavnega stebila. Listi so razporejeni v spiralo, so zelenkasto-sive barve s pretežno globokimi zarezi. Nekateri sorte imajo liste s trni, druge pa liste brez trnov. Cvetno glavo gradijo cvetovi v košku - mesnato glavičasto socvetje, ki ga obdaja več vrst braktej (ovršni listi). Barva cvetne glave je odvisna od sorte. Sicer pa sorte uporabljene za prehrano na braktejah nimajo trnov, druge sorte pa jih imajo. Cvetne glave so hermafroditne, torej se v istem cvetu razvijajo prašniki in pestič. Samoopraševanje je preprečeno s protandrijo, kar pomeni, da se moški cvetovi odprejo in dozori pred ženskimi cvetovi (Ciancolini 2012). Glavni opraševalci v območju sredozemskega bazena so *Apis mellifera* (domača čebela), solitarne čebele in čmrlji (Basnizki in Zohary 1994).

Razvojni cikel se v splošnem začne s kalitvijo semen v septembru-oktobru, sledi tvorba zimske listne rozete v novembru, rast cvetnega stebila v aprilu-maju, cvetenje v juniju, dozorevanje plodov v juliju in v avgustu nastanek suhe nadtalne biomase (Raccuia in Melilli 2007).

Čas žetve pridelka artičoke, z namenom pridobivanja semen, je v septembru ali oktobru, (odvisno tudi od ekoloških razmer posameznega območja gojenja). Vendar, ker se sadike šele spomladi, je juvenilno obdobje tako dolgo, da ne ustvari pridelka še v istem letu temveč šele v naslednjem letu. Torej je potrebno dvoletno obdobje od setve semen do pridobitve novega semena. Zaradi dvoletnega obdobja od setve do pridobitve semen se je težko prilagajati potrebam trga, počasnejše je žlahtnjenje novih sort, poleg tega pa se s semenom prenašajo tudi patogene glive in virusi. Z namenom hitrejšega razvoja novih sort žlahtnitelji dolgo juvenilno obdobje obidejo s tehniko reševanja zarodkov oziroma embrijev (Cravero in Cointry 2007). Tehnika omogoča odvzem embrija iz rastoče rastline, ki nadaljuje svoj razvoj s pomočjo rastlinskih tkivnih kultur (RTK). Raziskovalci so želeli preveriti optimalno starost embrija, ki se bo nato najuspešneje razvil v *in vitro* kultiviranju. Tako so preizkusili odziv embrijev odvzetih 5, 10, 15, 20, 30 in 40 dni po opraševanju rastlin *Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* (L.) Fiori. Ugotovili so, da so 20 dni stari embriji najbolj primerni za reševanje embrijev. Sadike, vzgojene iz teh embrijev so po 30-45-ih dneh *in vitro* kultiviranja in 30-ih dneh aklimatizacije, primerne za sajenje na polja, kar je 5 mesecev prej kakor bi to bilo mogoče v naravnem razvojnem ciklu (Cravero in Cointry 2007).

### 1.3.4 Razmnoževanje

Artičoke se lahko razmnožuje generativno in vegetativno. Vegetativno razmnoževanje je mogoče z ovoli ali pa z ločevanjem poganjkov od matične rastline. Ovoli so dormantni ali na pol dormantni zalistni (aksilarni) brsti, dolgi med 2,5 in 15 cm ter široki med 2 in 2,5 cm. Razvijajo se še posebej po sušnem obdobju, na kratkih olesenelih predelih stebila (Iapichino 1996). Ovole nabirajo poleti, vse od konca julija do avgusta, od materinih rastlin, ki imajo že posušeno nadtalno maso. Nato jih postavijo v plasti slame, kjer začnejo

poganjati, pod toplimi in vlažnimi razmerami, tako da so po enem tednu že pripravljene za presaditev na polje (Ciancolini 2012). Razmnoževanje s poganjki je pogosto uporabljena metoda za vzgojo novih sadik artičoke. Poganjki izraščajo iz podzemnih brstov na rastlinskem rizomu. Poganjke se nabira vse od jeseni do pomladi, vendar pa je za tak način razmnoževanja značilen precejšen izpad sadik (Ciancolini 2012). Ker omenjena načina vegetativnega razmnoževanja ne zahtevata večjih finančnih vložkov ter sta relativno lahko izvedljiva, se ju poskuša optimizirati. Raziskovalci so s tem namenom preverili, kakšne sadike nastanejo iz ovolov in iz dveh tipov poganjkov. Uporabili so poletne ovole (oznaka T0), spomladanske poganjke, pri katerih so s prenehanjem namakanja zavrla rast (T1) in poganjke, ki niso bili prisiljeni v dormanco (T2) (Riahi in sod. 2017). Preverili so, kakšen izplen in kvalitativne značilnosti imajo poganjki tipa T0, T1 in T2. Ugotovili so, da imajo sadike vzgojene s T1 načinom za pridelavo najboljše značilnosti - predvsem zaradi mase primarnega socvetja, ki ga razvijejo. Socvetje je za 7 % in 23 % težje kakor pri T2 in T0. Najvišja vsebnost inulina in antioksidantov pa je bila določena v T0 in T1. Zaključili so, da T1 (spomladanski poganjki) predstavljajo primerno metodo pridobivanja novih sadik. Rastlinske tkivne kulture predstavljajo še en način vegetativnega razmnoževanja artičok. Tehnika je opisana v poglavju 1.4 s pripadajočimi podpoglavji. Prednost vegetativnega razmnoževanja je, da sadike ohranijo lastnosti starševske rastline, medtem ko se pri generativnem razmnoževanju lahko izrazijo nezaželene lastnosti (na primer bodičaste brakteje, namesto brez bodic).

Generativno razmnoževanje s semeni omogoča (Basnizki in Zohary 1994):

- strojno setev, ki omogoča manj delovnega napora in je tako cenejše,
- kljub temu, da se lahko določeni virusi in patogeni prenašajo tudi s semenom, je s tovrstnim razmnoževanje vseeno mogoče pridobiti več brezvirusnih sadik in zmanjšati prenos patogenov, ki izvirajo iz tal, kakor bi bilo to ob sadikah nastalih iz stranskih poganjkov in ovolov ter
- uvajanje sort vzgojenih iz semen v nova območja, zaradi vedno večjega povpraševanja po le-teh.

V primeru razmnoževanja s semeni težavo predstavljata virusa (za katera je značilno, da se prenašata s semeni in s pelodom) - to sta italijanski latentni virus artičoke oziroma AILV (angl. Artichoke Italian latent virus) in latentni virus artičoke oziroma ArLV (angl. Artichoke latent virus) (Ciancolini 2012). Torej, če razmnožujemo artičoko s semeni, in ne preverimo ali vsebuje viruse in druge patogene, se lahko le-ti s semenskim materialom širijo. Prednost rastlinskih tkivnih kultur v tem primeru je, da se pri vzgoji s postopki sterilizacije odstrani patogeni organizmi in se jih zato ne širi z vzgojo sadilnega materiala (Acquadro in sod. 2010).

### 1.3.5 Okoljske zahteve

Artičoka potrebuje odcedna, rahla, z organsko snovjo in hranili bogata tla. Tolerantna je na visoko temperaturo - tudi čez 30 °C, optimalna dnevna temperatura je med 20 °C in 22 °C, nočna pa med 12 °C in 14 °C. V hladnejših mesecih hitro prihaja do poškodb, če temperatura pade pod -5 °C. Takrat se priporoča zastiranje s slamo, preventiven ukrep predstavlja še krajšanje rastlin pred prihodom zime. V poletnem času, ko prihaja do suš, pa se priporoča redno namakanje, saj suš ne prenaša najbolje. Rastlina lahko zraste tudi do 1,5 m v višino (Ciancolini 2012; Bolčič 2018).

Glede na agronomske lastnosti se lahko sorte artičoke deli na jesenske (pozne) in spomladanske (zgodnje). Pozne sorte imajo v *in vitro* tehnikah večji potencial za ukoreninjenje, kakor zgodnje sorte (Bedini in sod. 2012). To pa zato, ker imajo zgodnje sorte nižjo multiplikacijsko stopnjo kakor pozne ter ukoreninjenje je boljše pri poznih sortah, medtem ko je pri zgodnjih slabše (López-Pérez in Martínez 2015). To je pomemben podatek zaradi nadaljnjih načinov tretiranja poganjkov z različnimi pripravki.

## 1.4 Rastlinske tkivne kulture (RTK)

Rastlinska tkivna kultura je izraz, s katerim pojmuje rast rastlinskih celic, tkiv in organov na umetnem gojišču v sterilnem oziroma aseptičnem okolju z nadzorovanimi kemijskimi in fizikalnimi dejavniki (Bohanec 1992).

Prvi znanstvenik, ki se je začel ukvarjati z RTK je Gottlieb Haberlandt, ki mu pravimo tudi 'oče tkivnih kultur'. Njegovi eksperimenti so se začeli z izoliranimi fotosintetskimi listnimi celicami in drugimi funkcionalnimi diferenciranimi celicami, vendar je bil neuspešen. Ne glede na neuspeh je predpostavil domneve o tem, da bo možno uspešno kultivirati embrije iz vegetativnih celic in uveljavil koncept o totipotenci. Prvo pravo RTK je vzpostavil Roger Jean Gautheret iz kambijskega tkiva *Acer pseudoplatanus* (beli javor), nato pa še iz nekaterih drugih vrst (Thorpe 2007).

### 1.4.1 Osnovni princip

Preden začnemo vzpostavljati RTK, moramo najprej proučiti lastnosti vrste in pregledati dosedanje raziskave, da preverimo, kakšna gojišča in razmere za rast kulture so bile najbolj uspešne. Torej, ko pregledamo literaturo in zastavljamo poskus, moramo biti pozorni na to, kakšen rastlinski material smo nabrali (listi, vršički poganjkov, semena, itn.), kdaj smo ga nabrali, metodo sterilizacije, metodo nanosa izsečka na gojišče, sestavo gojišča, pH gojišča ter temperaturo in fotoperiodo v rastni komori.

Pri pripravi gojišča je potrebno upoštevati, da lahko vsebuje (Bohanec, 1992):

- makroelemente: dušik, fosfor, kalij, kalcij, magnezij, žveplo, klorid,

- mikroelemente: bor, mangan, železo, cink, baker, molibden, kobalt,
- vir ogljikovih hidratov: saharoza, glukoza, fruktoza, sorbitol, manitol, maltoza,
- vitamine: tiamin, niacin, piridoksin, mio-inozitol,
- ostale vitamine: folna kislina, biotin, riboflavin, askorbinska kislina,
- aminokisliline: L-glicin, L-glutamin, L-asparagin, L-serin, L-prolin,
- kompleksne organske sestavine: kokosovo mleko, paradižnikov sok, kvasni ekstrakt, aktivno oglje, poliamini in
- sredstvo za strjevanje gojišča: agar, agaroza, gellan-gum, žitni škrobi, itn.

Pomembna komponenta gojišča so rastlinski rastni hormoni oziroma regulatorji, s katerimi je mogoče že v majhnih koncentracijah vplivati na rast in razvoj kulture. Nekateri izmed rastnih hormonov so (Bohanec 1992):

- avksini: indol-3-octna kislina, indol-3-maslena kislina, 2,4-diklorofenoksiocetna kislina, naftalen oetna kislina,
- citokinini: kinetin, 6-benzilaminopurin, izopentiladenin, zeatin,
- giberelini: giberelinska kislina,
- abscizinska kislina,
- salicilna kislina in
- etilen.

Upoštevati je potrebno tudi pH, ki se navadno uravna v vrednosti med 5,0 in 6,5, preden se gojišču doda agar. Po avtoklaviranju se vrednost pH gojišča, zaradi reakcij (oksidacije, hidrolize, kondenzacije, ipd.) spojin pod visokim tlakom in visoko temperaturo, zniža za 0,3 do 0,5 (Bohanec 1992).

Natančno sestavo gojišča je potrebno prilagoditi vsaki sorti posebej. Odvisno tudi od tega, kakšen odziv rastlinske tkivne kulture želimo doseči, npr. ustvariti kulturo kalusa, ukoreniniti poganjke, spodbuditi rast novih poganjkov, spodbuditi somatsko embriogenezo, kalitev semen, itd.

#### **1.4.2 Uporaba rastlinskih tkivnih kultur**

Metode rastlinskih tkivnih kultur, ki se uporabljajo na artičoki so razdeljene na dve področji - metode za vzpostavitev kulture, ki se jih uporablja za pridobivanje v artičoki prisotnih spojin, ali pa za pridobivanje sadilnega materiala. Razlike med njimi so predvsem v tem, katero tkivo se uporabi, kakšne koncentracije rastnih hormonov in v samih metodah, potrebnih za pridobitev zelenega končnega produkta. V nadaljevanju sta predstavljena dva primera, pri katerih se vidi jasne razlike v metodah za pridobivanje spojin ter sadilnega materiala.

V primeru uporabe RTK za pridobivanje na primer kofeoilkinske kisline, so raziskovalci vzpostavili kulturo kalusa. Uporabili so izsečke listov, ki so jih sterilizirali in nato postavili na gojišče z dodatkom 1 mg/L BAP in 3 mg/ l NAA ter jih inkubirali v konstantni temi.



Tako so pridobili največ kofeoilkinske kisline in s tem tudi določili metodo za pridobivanje kofeoilkinske kisline iz kulture kalusa artičoke (Menin in sod. 2013).

V primeru uporabe RTK za pridobivanje sadilnega materiala pa so raziskovalci uporabili mlade poganjke materine rastline, ki so jih postavili na gojišče z nižjimi koncentracijami rastnih hormonov, kakor bi te bile, če bi vzpostavljali kulturo kalusa. Sterilizirane poganjke so najprej postavili na iniciacijsko gojišče z dodatkom 0,8 mg/l BAP in 0,2 mg/L IBA. V fazi razmnoževanja oz. rasti novih poganjkov so poganjke predstavili na gojišče z nižjimi koncentracijami rastnih hormonov - 0,03 mg/L BAP in 0,05 mg/L GA<sub>3</sub>. Sledila je še faza koreninjenja. Poganjki na gojiščih so bili postavljeni v rastne komore s fotoperiodo 16 ur osvetlitve in 8 ur teme. Sledila je še faza aklimatizacije, po kateri zdravi poganjki predstavljajo sadilni material (Bedini in sod. 2012).

### 1.4.3 Ohranjanje genskega materiala

Poznamo dva načina shranjevanja in s tem ohranjanja genskega materiala, in sicer *ex situ* in *in situ* način. V primeru *in situ* ohranjanja je genski material v naravnem habitatu. V primeru *ex situ* ohranjanja pa je genski material shranjen izven naravnega habitata, kot so genske banke, kolekcijski nasadi in botanični vrtovi. Genske banke so institucije, v katerih se hrani genski material v različnih oblikah in v razmerah, ki so prilagojene posamezni vrsti, sorti oziroma kulturi. S tem se omogoča hramba različnih sort, ki bi se sicer lahko izgubile, obenem pa je genetsko raznolik material - zbran v genskih bankah - na voljo tudi za razvoj novih sort (Kameswara Rao 2004).

V primeru vrste *Cynara cardunculus* L. so najbolj razširjeni kolekcijski nasadi v raznih državah pridelave, najbolj znani so v Italiji, Franciji in Španiji. V nasadih se tako hranijo različne sorte iz različnih območij. To ima poseben pomen zaradi tega, ker se določenih sort ne uporablja več v tako velikem merilu. S kolekcijskimi nasadi pa se omogoči ohranjanje teh, sedaj manj uporabljenih sort, ki bodo lahko v prihodnosti ponovno v porastu (Pagnotta in sod. 2017).

Rastlinske tkivne kulture so pomembne tudi zaradi možnosti shranjevanja z zamrzovanjem (krioprezervacija) ali z metodo upočasnjene rasti pri nižji temperaturi. Krioprezervacija je postopek, pri katerem je rastlinski material - v obliki celic, protoplastov, poganjkov, semen, embrijev - shranjen pri ekstremno nizki temperaturi v tekočem dušiku pri -196 °C. Prednost tega postopka je, da je zanj potreben majhen prostor, omogoča manjšo možnost za kontaminacijo, potrebuje zelo malo vzdrževanja ter predstavlja cenovno učinkovito možnost shranjevanja genskega materiala (Kameswara Rao 2004).

Upočasnjena rast pri nižji temperaturi predstavlja metodo, pri kateri je omogočeno vzdrževanje klonskega materinega materiala za daljše obdobje (več let). To je mogoče z vzdrževanjem kulture pod nižjo temperaturo v kombinaciji z nižjo intenziteto svetlobe, kar

omejuje rast. Sorte zmerne pasu so tako postavljene na temperaturo okoli 4 °C, sorte tropskega pasu pa na temperaturo med 10 °C in 15 °C (Keller in sod. 2006).

#### **1.4.4 Brezvirusni material**

Za potrebe pridobivanja neokuženega sadilnega materiala se vzpostavlja kulture iz meristemskih tkiv ter semen. S pridobivanjem semen želimo skrajšati naravni čas nastanka novih poganjkov (Cravero in Cointry 2007). Poleg tega lahko pri tem zagotovimo brez virusno tkivo s pomočjo različnih kurativnih postopkov, kot je termoterapija (Acquadro in sod. 2010).

Termoterapija je postopek tretiranja rastlinskega tkiva s toploto, z namenom očiščenja tkiva škodljivih organizmov. Lahko se jo izvede *in vitro* ali pa *in vivo*. Pri *in vitro* termoterapiji se odstrani meristemski vršiček, iz katerega se vzpostavi kulturo, ki se je nato razmnožuje. Poganjke iz prve subkulture se izpostavi termoterapiji za 15 dni, na 38 °C, čemur sledi prenos meristemskega vršička na novo gojišče, ter po treh subkultivacijah koreninjenje in aklimatizacija. Pri *in vivo* termoterapiji pa se takoj aklimatizira poganjke na 28-30 °C, ki se jih nato za 150 dni izpostavi termoterapiji, na 38 °C, in šele nato odstrani meristemski vršiček, iz katerega se vzpostavi kulturo. Nastalo kulturo se multiplicira in trikrat subkultivira, čemur sledi faza koreninjenja in aklimatizacije (Acquadro in sod. 2010).

Oba postopka sta lahko učinkovita, vendar imata poleg določenih prednosti tudi slabosti. Prednost je v ceni, času in prostoru potrebnem za izvedbo termoterapije. Slabost pa je v tem, da se ob vsakem novem kultiviranju meristemskega vršička lahko zgodi, da bo kultura zaradi somatskih mutacij začela izražati druge, nezaželene lastnosti. Pri 150 dnevni izpostavljenosti višjim temperaturam pa lahko število dovolj viabilnih, zdravih, močnih rastlin po termoterapiji upade. Vendar je termoterapija perspektivna metoda za uspešno vzgojo brezvirusnih rastlin (Acquadro in sod. 2010). Z vzpostavitvijo zdrave tkivne kulture poganjkov lahko zagotovimo dober sadilni material, ki ga lahko nato s postopkom mikropropagacije naprej razmnožujemo.

#### **1.4.5 Mikropropagacija**

Mikropropagacija je postopek hitrega razmnoževanja rastlin. Faze mikropropagacije so: priprava materinih rastlin, iniciacija kulture, razmnoževanje poganjkov, koreninjenje in na koncu aklimatizacija (Bohanec 1992). Zaradi nizke stopnje multiplikacije pri klasičnih vegetativnih načinih razmnoževanja in večje možnosti širjenja patogenih mikroorganizmov s sadilnim materialom, se je tudi pri artičoki začelo razvijati razmnoževanje s tehnikami rastlinskih tkivnih kultur. Z vedno večjo izbiro gojišč, rastnih hormonov in mikoriznega inokuluma, so El Boullani in sod. (2012) razvili cenovno ugodno in učinkovito metodo za

mikropropagacijo artičoke. Vendar pa so pri razvoju metod za *in vitro* razmnoževanje artičok ugotovili, da se pri določenih fazah mikropropagacije lahko pojavijo težave.

Raziskovalci poročajo, da imajo poganjki artičoke velikokrat težavo ravno v fazi koreninjenja in pa v fazi aklimatizacije (Fortunato in sod. 2005; López-Pérez in Martínez 2015). Zato se metode stalno izboljšujejo.

López-Pérez in Martínez (2015) so poskusili izboljšati koreninjenje z dodatkom različnih koncentracij NAA in IBA ter posebej spremljali tudi tvorbo korenin na poganjkih inkubiranih v temi za različno dolgo časovno obdobje. Uporabili so *Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* (L.) Fiori. Ugotovili so, da je bila nizka koncentracija kinetina (1,4  $\mu\text{M}$ ) najprimernejša za indukcijo poganjkov in razmnoževanje uporabljenega rastlinskega materiala. Na gojišču z MS solmi in vitamini, 3 % saharoze, 0,6 % agarja in 29,5  $\mu\text{M}$  indol-3-maslene kisline, so se najbolje koreninili poganjki, ki so bili za 5 dni postavljeni v temo. Po aklimatizaciji je preživel 75-83 % sadik, ki so imele razvite korenine. Poskus nakazuje na to, da sta nizka koncentracija kinetina in tema ključna dejavnika pri metodah razmnoževanja artičok .

Fortunato in sod. (2005) pa so dodali kulturi mikorizne glive, ki so znane po tem, da vzpostavijo simbiotski odnos z rastlinami. Takšna kultura je zmožna boljše rasti in lažjega premagovanja različnih okoljskih razmer, saj ji simbioza z mikoriznimi glivami omogoča bolj učinkovit sprejem hranil in vode, če so v primanjkljaju. V raziskavi so najprej subkultivirali kulturo *Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* (L.) Fiori, na gojišču z dodatkom 6-benzilaminopurina. Gojišče z dodatkom 10 mg/l indol-3-ocetne kisline (IAA) je omogočilo uspešen razvoj korenin največjemu številu poganjkov. Sledila je inokulacija sadik z 10 g seva A6 mikorizne glive *Glomus viscosum*, ko so bili ti prestavljeni v lončke. Pri fazi aklimatizacije je bilo ugotovljeno, da je bil delež preživelih sadik višji pri rastlinah z dodanimi mikoriznimi glivami oziroma natančneje, preživel 90-95 % ukoreninjenih in 60 % neukoreninjenih sadik. Delež preživelih sadik, ki niso imele dodanih mikoriznih gliv, pa je bil mnogo nižji, in sicer za ukoreninjene sadike 30-35 %, neukoreninjene pa niso preživele (Fortunato in sod. 2005).

#### **1.4.6 Sinteza človeku pomembnih spojin**

Izhodiščna kultura za pridobivanje spojin je običajno kultura kalusa, ki se ga najlažje pridobi iz nemeristemskega tkiva. Kultura kalusa je neorganizirana rast celic. Zaradi te lastnosti lahko pridobimo večjo biomaso celic, iz katerih nato pridobimo spojine. Primeri spojin, ki se jih pridobiva s pomočjo vzpostavitve kalusa so proteaze, fenoli, inulin in druge (Figueiredo in sod. 1987; Sonnante in sod. 2007b).

Na Portugalskem so raziskovalci vzpostavili kulturo kalusa in celično suspenzijo (koščki kalusa, ki razpadejo na posamezne celice na stresalniku v tekočem gojišču) iz *Cynara cardunculus* L. z namenom pridobitve proteinaz, ki jih na nekaterih območjih uporabljajo v

tradicionalni pridelavi sira. Proteinaze omogočajo strjevanje mleka in s tem pridelavo sira. Kulturo so vzpostavili iz hipokotilov in listov mladih poganjkov, ki so jih postavili na Gamborg B5 gojišče z dodatkom dveh rastnih hormonov - 1 mg/l 2,4-D in 0,1 mg/l BAP. Nastale celice v kulturi kalusa in suspenziji so pokazale relativno konstantno velikost in obliko v času gojenja in so tako primeren vir za pridobivanje rastlinskih proteaz za uporabo v sirarstvu (Figueiredo in sod. 1987).

## 2 METODE DELA

Rastlinske tkivne kulture so področje, pri katerem morajo biti določene tehnike izvedene v sterilnih razmerah. Inokulacijo izsečkov in njihovo subkultiviranje mora zaradi možnosti okužbe z mikroorganizmi potekati v brezprašni komori. Delo je zato potekalo v laboratoriju Univerze na Primorskem-UP FAMNIT.

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Kemikalije

Pri delu v laboratoriju smo uporabili kemikalije navedene v preglednici 1.

**Preglednica 1:** Uporabljene kemikalije, njihova kemijska formula in proizvajalec.

Kemikalija	Formula	Proizvajalec
Adenin-hemisulfat	$C_5H_5N_5^{*1}/2H_2SO_4$	Sigma-Aldrich
Agar	$C_{14}H_{24}O_9$	Duchefa Biochemie
Askorbinska kislina	$C_6H_8O_6$	Sigma-Aldrich
Citronska kislina	$C_6H_8O_7$	Sigma-Aldrich
Etanol (70 % in 96 %)	$C_2H_5OH$	Merck
Glicin	$C_2H_5NO_2$	Sigma-Aldrich
Klorovodikova (VI) kislina	HCl	Sigma-Aldrich
Mio-inozitol	$C_6H_{12}O_6$	Duchefa Biochemie
Natrijev dihidrogen fosfat monohidrat	$H_2NaO_4P^*H_2O$	Sigma-Aldrich
Natrijev dikloro-isocianurat dihidrat	$C_3Cl_2N_3NaO_3 * 2H_2O$	Sigma-Aldrich
Natrijev hidroksid	NaOH	Sigma-Aldrich
10 % raztopina natrijevega hipoklorita	NaClO	Sigma-Aldrich
Saharoza	$C_{12}H_{22}O_{11}$	Kemika
Tidiazuron	$C_9H_8N_4OS$	Duchefa Biochemie
Tween 20	$C_{26}H_{50}O_{10}$	Sigma-Aldrich

#### 2.1.2 Laboratorijska oprema

Uporabili smo slednjo laboratorijsko opremo:

- analitsko tehniko,
- avtoklav,
- brezprašno komoro,

- magnetno mešalo (+ magnet za v čašo),
- mikrovalovno pečico,
- pH meter,
- avtomatske pipete in
- rastno komoro (POL-EKO ST500 PREM TOP + (tip osvetlitve 840)).

### 2.1.3 Droben laboratorijski material

Uporabili smo spodaj naveden droben laboratorijski material:

- alkoholni flomaster,
- aluminijasto folijo,
- avtoklavirane pincete,
- avtoklavirane steklene kozarčke (200 ml; VO633, Merck) + plastične zamaške za kozarčke (B8648, Magenta<sup>TM</sup>B-cap, Merck),
- sterilno držalo s skalpelom,
- sterilno brizgalko (10 ml) z nastavkom za sterilno filtracijo (ML-SLGS033SS, Millex),
- plinski gorilnik,
- kapalko,
- kovinsko žličko za tehtanje,
- merilni valj,
- nastavke za polavtomatsko pipeto,
- plastična posoda,
- puhalko z destilirano vodo,
- stekleno palčko,
- steklene čaše (500 ml),
- steklene merilne bučke (100 ml),
- steklene steklenice s pokrovčkom (1 l),
- stekleni lij,
- škarje,
- tehtalne posodice in
- vakuumsko zaprte pakete papirnatih krožničkov.

### 2.1.4 Gojišča

V preglednicah od 2 do 5 je navedena sestava gojišč, ki smo jih uporabili za iniciacijo in subkultiviranje poganjkov. Za fazo iniciacije smo določili tri različna gojišča - prvo vsebuje osnovno MS gojišče z dodatkom mio-inozitola, saharozo ter agar (kontrola oz. gojišče I.). Drugo je enako po sestavi prvemu, le da ima dodan še tidiazuron (gojišče II.).

Tretje pa je enako po sestavi drugemu vendar ima dodana še dodatna hranila (glicin, natrijev dihidrogen fosfat monohidrat in adenin-hemisulfat) (gojišče III.).

Spojine si sledijo v zaporedju, kakor smo jih dodajali v posamezno gojišče.

Ker je rastni hormon tidiazuron (TDZ) termolabilen, smo ga dodali po avtoklaviranju, z brizgalko z nastavkom za sterilno filtracijo, v brezprašni komori.

**Preglednica 2:** Sestava iniciacijskega gojišča I.

Spojina	Količina za 100 ml gojišča	Založna raztopina
Murishage in Skoog gojišče	0,43 g	/
Mio-inozitol	10 mg	1 g/100 ml
Saharoza	4 g	/
Agar	0,7 g	/

**Preglednica 3:** Sestava iniciacijskega gojišča II.

Spojina	Količina za 100 ml gojišča	Založna raztopina
Murishage in Skoog gojišče	0,43 g	/
Mio-inozitol	10 mg	1 g/100 ml
Saharoza	4 g	/
Agar	0,7 g	/
Tidiazuron	0,05 mg	20 mg/100 ml

**Preglednica 4:** Sestava iniciacijskega gojišča III.

Spojina	Količina za 100 ml gojišča	Založna raztopina
Murishage in Skoog gojišče	0,43 g	/
Mio-inozitol	10 mg	1 g/100 ml
Glicin	0,2 mg	200 mg/100 ml
Natrijev dihidrogen fosfat monohidrat	5 mg	500 mg/100 ml
Adenin-hemisulfat	4 mg	200 mg/100 ml
Saharoza	4 g	/
Agar	0,7 g	/
Tidiazuron	0,05 mg	20 mg/100 ml

**Preglednica 5:** Sestava gojišča za subkultiviranje.

Spojina	Količina za 100 ml gojišča	Založna raztopina
Murishage in Skoog gojišče	0,43 g	/
Mio-inozitol	10 mg	1 g/100 ml
Saharoza	4 g	/
Agar	0,7 g	/

### 2.1.5 Rastlinski material

Uporabili smo poganjke tradicionalne sorte, ki jo goji manjše število lokalnih pridelovalcev. Sorta sicer še nima pravega imena, pogosto ji rečejo strunjanska artičoka. Poganjke smo pridobili od g. Silvana Kneza.

Prvič smo poganjke nabrali iz matičnih rastlin 20. marca 2019 (za prvi nanos na gojišče), drugič pa 3. aprila 2019 (za drugi nanos na gojišče). Eden izmed večjih poganjkov, ki smo jih s pomočjo noža ločili od matere rastline, je prikazan na sliki 1.



**Slika 1:** Poganjek, ki je odgnal izpod matere rastline artičoke (Foto: Petra Gabrovšek).

## 2.2 Metode

Založne raztopine in gojišča so bila pred avtoklaviranjem pripravljena na laboratorijskih pultih, ki smo jih pred in po končanem delu razkužili s 70 % etanolom.

Zadnjo fazo sterilizacije, t.j. spiranje rastlinskega materiala z destilirano vodo ter raztopino askorbinske in citronske kisline in prenos rastlinskega materiala na gojišče, smo opravili v brezprašni komori. Pred začetkom dela se je komora razkužilo s 70 % etanolom. Med samo sterilizacijo in nadaljnjim nanosom smo si večkrat razkužili rokavice s 70 % etanolom.

### 2.2.1 Priprava gojišč za iniciacijo in subkultiviranje

Najprej smo pripravili založne raztopine, po naslednjem postopku:

- *Adenin-hemisulfat*: na analitski tehtnici smo zatehtali 200 mg, ga raztopili v nekaj kapljicah 1M klorovodikove kisline ter raztopino s pomočjo merilne bučke razredčili do končnega volumna 100 ml.



- *Glicin*: na analitski tehtnici smo zatehtali 200 mg, ga raztopili v nekaj kapljicah 1M natrijevega hidroksida ter raztopino s pomočjo merilne bučke razredčili do končnega volumna 100 ml.
- *Mio-inozitol*: na analitski tehtnici smo zatehtali 1 g, ga raztopili v nekaj kapljicah destilirane vode ter raztopino s pomočjo merilne bučke razredčili do končnega volumna 100 ml.
- *Natrijev dihidrogen fosfat monohidrat*: na analitski tehtnici smo zatehtali 500 mg, ga raztopili v nekaj kapljicah destilirane vode ter raztopino s pomočjo merilne bučke razredčili do končnega volumna 100 ml.
- *Tidiazuron*: na analitski tehtnici smo zatehtali 20 mg, ga raztopili v nekaj kapljicah 95 % etanola ter raztopino s pomočjo merilne bučke razredčili do končnega volumna 100 ml. Nadalje smo raztopino razredčili do delovne koncentracije 0,05 mg/ml TDZ (5 ml TDZ (iz založne raztopine) + 15 ml destilirane vode).

Gojišča smo pripravili po enakem postopku, le sestava posameznega gojišča je bila drugačna. Količina gojišča je bila prilagojena glede na predvideno število uporabljenih kozarčkov.

Postopek priprave gojišč za iniciacijo je potekal po naslednjih korakih:

- Priprava gojišč I., II., in III. (količina spojina za 100 ml gojišča):
  1. Na analitski tehtnici smo zatehtali zahtevane količine spojina oziroma jih odpipetirali iz založnih raztopin. Glede na sestavo posameznega obravnavanja smo v tri čaše dodali naslednje spojine:
    - 1. čaša (gojišče I.): 0,43 g MS, 1 ml mio-inozitola, 4 g saharoze.
    - 2. čaša (gojišče II.): 0,43 g MS, 1 ml mio-inozitola, 4 g saharoze.
    - 3. čaša (gojišče III.): 0,43 g MS, 1 ml mio-inozitola, 100 µl glicina, 1 ml natrijevega dihidrogen fosfat monohidrata, 2 ml adenin-hemisulfata, 4 g saharoze.
  2. V vsako čašo smo dodali skoraj do končnega volumna destilirane vode in s pH metrom uravnali pH na 5,8. Če je bil pH previsok, smo dodali 1M HCl, če je bil prenizek pa 1M NaOH.
  3. Gojišča smo prelili v 100 ml merilne bučke in dodali destilirano vodo do končnega volumna ter nato prelili nazaj v čašo.
  4. Vsaki čaši smo dodali po 0,7 g agarja, čašo nato postavili v mikrovalovno pečico in segrevali dokler se agar ni raztopil.
  5. Nato smo posamezno gojišče prelili v 1 l steklenico, jo zatisnili in za en obrat zaradi pritiska, ki se ustvari med avtoklaviranjem odtisnili. Steklenice smo postavili v avtoklav, na 121 °C, na 1 bar, za 20 minut.

6. Po avtoklaviranju smo počakali, da so se gojišča ohladila na približno 50 °C. V gojišče za II. in III. obravnavo smo v brezprašni komori z brizgalko in nastavkom za sterilno filtracijo dodali po 1 ml TDZ.
  7. Nato smo gojišča enakomerno porazdelili v avtoklavirane steklene kozarčke in jih označili s številko gojišča (I., II., III.), jih zaprli in pustili, da so se ohladili.
- Priprava gojišča za subkultiviranje (količina spojin za 100 ml gojišča):
    1. Na analitski tehtnici smo zatehtali zahtevane količine spojin oziroma jih odpipetirali iz založnih raztopin. V čašo smo dodali 0,43 g MS, 1 ml mio-inozitola in 4 g saharoze.
    2. V čašo smo dodali nekoliko destilirane vode in umerili pH do 5,8.
    3. Gojišča smo prelili v 100 ml merilne bučke in dodali destilirano vodo do končnega volumna ter nato prelili nazaj v čašo ter dodali 0,7 g agarja.
    4. Čašo smo postavili v mikrovalovno pečico in segrevali dokler se agar ni raztopil.
    5. Gojišče smo prelili v 1 l steklenico in jo zatisnili in za en obrat zaradi pritiska, ki se ustvari med avtoklaviranjem odtisnili. Steklenico smo postavili v avtoklav na 121 °C, na 1 bar, za 20 minut.
    6. Po avtoklaviranju smo počakali, da se je gojišče nekoliko ohladilo, nato pa ga enakomerno razporedili v steklene kozarčke in jih označili z alkoholnim flomastrom.

## 2.2.2 Sterilizacija in nanos na gojišča

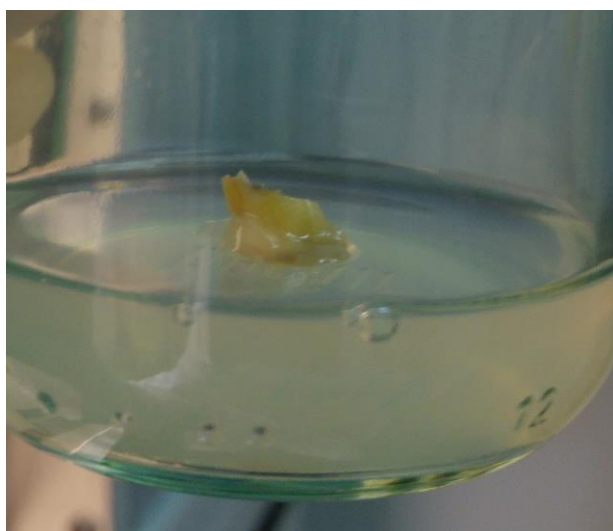
Rastlinski material, ki smo ga nabrali 20. marca 2019, smo sterilizirali s 70 % etanolom in 10 % raztopino natrijevega hipoklorita, medtem ko smo za sterilizacijo rastlinskega materiala, ki smo ga nabrali 3. aprila 2019, uporabili 70 % etanol in 1,67 % raztopino dikloroizocianurne kisline.

### 2.2.2.1 Prvi poskus sterilizacije in prenosa rastlinskega materiala na gojišče

Prvi poskus sterilizacije in prenosa rastlinskega materiala na gojišča je potekal po naslednjih korakih:

1. Mlade poganjke smo sprali pod tekočo vodo. Pazili smo, da so bile korenine stalno v vodi, v plastični posodi.
2. Na analitski tehtnici smo zatehtali 5 g askorbinske in 7,5 g citronske kisline, ki smo ju dodali v steklenico, v katero smo z merilnim valjem dolili 1 l avtoklavirane vode (priprava raztopine po Pacifici in sod. 2007).
3. Poganjke smo 15 minut namakali v 0,5 % raztopini askorbinske in 0,75 % raztopini citronske kisline.

4. Poganjke smo prestavili v večjo čašo, in jih za 30 sekund namakali v 70 % etanolu.
5. Sledilo je namakanje poganjkov v 10 % raztopini NaClO s petimi kapljicami omočila Tween 20, za 15 minut. Čašo smo postavili na magnetno mešalo ter v čašo dodali magnet.
6. V brezprašni komori smo pripravili raztopino askorbinske in citronske kisline. Za to smo 5 g askorbinske in 7,5 g citronske kisline, natehtane na analitski tehtnici, dodali v avtoklavirano vodo preko brizgalke z nastavkom za filtracijo.
7. Čaše s poganjki smo po 15 min prestavili v brezprašno komoro in poganjke 5x spirali (pri zadnjem spiranju je bila voda v čaši čista) z avtoklavirano vodo, pri čemer je vsako spiranje trajalo 3 min.
8. Po zadnjem spiranju smo poganjke prestavili v čaše s sterilno raztopino askorbinske in citronske kisline.
9. V brezprašni komori smo prižgali plinski gorilnik, pripravili rezilo in pincete ter vakuumsko zaprte, sterilne papirnate krožničke, katerih ovoj smo odprli z ožgano pinceto in rezilom.
10. Na papirnatem krožničku smo z ožganim rezilom in pinceto poganjkom odrezali tkivo tik nad mestom, kjer izraščajo listi in spodaj tako, da smo ohranili manjši del koreninskega sistema (v primeru večje korenine smo odstranili tudi stranske dele izsečka). Končna velikost izsečkov je bila med 7 in 10 milimetri.
11. Izseček z novo ožgano pinceto prenesli v kozarček z gojiščem (slika 2). V vsak kozarček smo nanegli samo en izseček.
12. Kozarčke z izsečki smo postavili v rastno komoro, na  $25\pm 2$  °C, s fotoperiodo 16 ur svetlobe: 8 ur teme. Prva dva dni so bili kozarčki pokriti v aluminijasto folijo, ki smo jo nato odstranili. Omenjen postopek so uporabili tudi Bedini in sod. (2012) z namenom zmanjšanja oksidacije zaradi svetlobe in s tem porjavitve izsečka.



**Slika 2:** Izseček mladega poganjka - postavljen na gojišče (Foto: Petra Gabrovšek).

### 2.2.2.2 Drugi poskus sterilizacije in prenosa rastlinskega materiala na gojišče

Drugi poskus sterilizacije in prenosa rastlinskega materiala na gojišče je potekal po naslednjih korakih:

1. Nabrane mlade poganjke smo namakali v vodi za več kot 15 minut, v plastični posodi. Nato smo jih spirali pod tekočo vodo.
2. Na analitski tehtnici smo zatehtali 5 g askorbinske in 7,5 g citronske kisline, ki smo ju dodali v stekleno steklenico, v katero smo z merilnim valjem dolili 1 l avtoklavirane vode (priprava raztopine po Pacifici in sod. 2007).
3. V raztopini askorbinske in citronske kisline smo poganjke za 15 minut namakali, postavljene na magnetno mešalo.
4. Poganjke smo prestavili v čašo, in jih za 30 sekund namakali v 70 % etanolu.
5. Sledilo je namakanje poganjkov v 1 l 1,67 % raztopini dikloroizocianurne kisline z dodanimi 5-imi kapljicami omočila Tween 20, za 10 minut, čašo smo postavili na magnetno mešalo.
6. V brezprašni komori smo pripravili raztopino askorbinske in citronske kisline. Za to smo 5 g askorbinske in 7,5 g citronske kisline, natehtane na analitski tehtnici, dodali v avtoklavirano vodo preko brizgalke z nastavkom za sterilno filtracijo.
7. Čašo s poganjki smo prestavili v brezprašno komoro in poganjke 3x spirali z avtoklavirano vodo (pri zadnjem spiranju je bila voda v čaši čista).
8. Sprane poganjke smo prestavili v čaše z raztopino askorbinske in citronske kisline.
9. V brezprašni komori smo prižgali plinski gorilnik, pripravili pincete, rezilo in vakuumsko zaprt paket sterilnih papirnatih krožničkov, katerega smo odprli z ožganim rezilom in pinceto.
10. Poganjek smo postavili na papirnati krožnik, in mu z ožganim rezilom odrezali tkivo tik nad mestom, kjer izraščajo listi in spodaj tako, da je ostal manjši del koreninskega sistema. Končna velikost izsečkov je bila med 7 in 10 milimetri. Izsečkom stranskega tkiva nismo prirezali.
11. Izseček smo z novo ožgano pinceto prenesli v kozarček z gojiščem. Izsečke smo razporedili posamično v kozarčke.
12. Kozarčke z izsečki smo postavili v rastno komoro (slika 3), na  $25 \pm 2$  °C, s fotoperiodo 16 ur svetlobe: 8 ur teme.



**Slika 3:** Kozarčki z izsečki na gojiščih, v rastni komori (Foto: Petra Gabrovšek).

### **2.2.3 Subkultiviranje - prenos rastlinskega materiala**

Pri prvem subkultiviranju 24. aprila 2019, smo uporabili razvite, nekontaminirane poganjke iz prvega poskusa. Pri drugem subkultiviranju 21. maj 2019, smo uporabili najbolj razvite, nekontaminirane poganjke, ki so se razvili po 1. subkultiviranju.

Postopek prenosa nastalih poganjkov za subkultiviranje je potekal po naslednjih korakih:

1. V brezprašni komori smo s pomočjo plinskega gorilnika sterilizirali pincete (pred uporabo smo jih sterilizirali z avtoklaviranjem) in rezilo ter odprli z ožganim priborom vakuumsko zaprt paket sterilnih papirnatih krožničkov.
2. Na papirnat krožniček smo z ožgano pinceto prenesli uspešno razvite, zdrave, nekontaminirane poganjke (slika 4). Z na novo ožgano pinceto in rezilom smo prikrajšali predolge liste in spodnji del koreninskega sistema (le delček smo pustili). Glede na razvitost kulture poganjkov, smo pripravili 2 do 4 nove izsečke, slabo razvite pa smo le prestavili na novo gojišče.
3. Vsak izseček smo vedno z na novo ožgano pinceto prestavili v lasten kozarček z gojiščem za subkultivacijo.
4. Kozarčke z izsečki smo postavili v rastno komoro, na  $25 \pm 2$  °C, s fotoperiodo 16 ur svetlobe: 8 ur teme. Dovolj razvite poganjke smo čez 3 tedne prenesli na novo gojišče za ponovno subkultivacijo.



**Slika 4:** Dobro razvit, nekontaminiran poganjek na papirnatem krožničku (Foto: Petra Gabrovšek).

### 3 REZULTATI Z DISKUSIJO

V okviru zaključne naloge smo želeli ugotoviti, ali je mogoče vzpostaviti rastlinsko tkivno kulturo iz mladih poganjkov artičoke. Opazovali smo odziv inokuliranih poganjkov na gojiščih z različno sestavo in po inokulaciji spremljali odzivnost izsečkov.

#### 3.1 Sterilizacija in iniciacija kulture artičoke

Rezultati obeh poskusov nanosov izsečkov na iniciacijska gojišča in dveh subkultiviranj so prikazani v preglednicah od 6 do 11.

**Preglednica 6:** Število kontaminiranih in nekontaminiranih kozarčkov z izsečki na iniciacijskem gojišču, po 1. in 2. poskusu nanosov.

Poskus	Iniciacijsko gojišče	Nekontaminirani kozarčki z izsečki	Kontaminirani kozarčki z izsečki
1. <sup>1</sup> (20. 03. 2019)	I. obravnavanje	3	8
	II. obravnavanje	2	10
	III. obravnavanje	0	12
2. <sup>2</sup> (03. 04. 2019)	I. obravnavanje	0	21
	II. obravnavanje	0	21
	III. obravnavanje	0	21

<sup>1</sup> sterilizacija opravljena s 70 % etanolom in 10 % raztopino natrijevega hipoklorita

<sup>2</sup> sterilizacija opravljena s 70 % etanolom in 1,67 % raztopino dikloroizocianurne kisline

Pri 1. nanosu izsečkov na iniciacijska gojišča I., II. in III., so se razvili in bili nekontaminirani poganjki le na I. in II. gojišču, na III. so bili vsi izsečki kontaminirani. Na gojišču III. smo kljub vidni kontaminaciji opazili, da so se poganjki razvili. Gojišča smo pripravili en teden pred nanosom, in v obdobju pred nanosom smo v enem kozarčku opazili razvoj mikroorganizmov, zato smo tega odstranili. Od skupno 35-ih kozarčkov z izsečki smo jih pridobili le 5 z razvitimi poganjki in brez vidnih okužb. Preostalih 30 je bilo kontaminiranih, pri nekaterih smo že opazili razvoj poganjkov, pri nekaterih pa je bil nanesen izseček popolnoma prekrit s kolonijami mikroorganizmov (slika 5).



**Slika 5:** Tri različne kolonije mikroorganizmov, ki so kontaminirale izsečke (Foto: Petra Gabrovšek).

Zaradi velikega števila kontaminiranih izsečkov smo se odločili, da bomo izvedli še 2. nanos, vendar z drugim razkužilom. Pri sterilizaciji smo tako namesto 10 % raztopine natrijevega hipoklorita uporabili 1,67 % raztopino dikloroizocianurne kisline. Skrajšali smo tudi čas sterilizacije in nekoliko je bil spremenjen tudi način priprave izsečkov. Poganjke smo v 10 % raztopini natrijevega hipoklorita namakali 15 min, medtem ko smo čas namakanja v 1,67 % raztopini dikloroizocianurne kisline skrajšali na 10 min. Za to smo se odločili, ker smo po pregledu literature ugotovili, da je potreben krajši čas sterilizacije, kar bi lahko zmanjšalo možnost propada izsečkov zaradi predolgega namakanja v razkužilnem sredstvu (možna razlaga za propad izsečkov v prvem poskusu). Pri samem poteku sterilizacije smo opazili, da je bila voda pri spiranju poganjkov po sterilizaciji manj motna, zato smo spiranje ponovili le trikrat, v primerjavi s prvim poskusom, ko smo spirali petkrat. Po le petih dneh v rastni komori po 2. nanosu, smo opazili kontaminacijo v vseh kozarčkih. Med metodama 1. in 2. nanosa, je bila razlika tudi v tem, kako smo oblikovali izsečke pred nanosom na gojišča. Pri prvem nanosu smo izsečke prirezali iz vseh strani, medtem ko pri drugem postavljanju izsečkov nismo prirezovali pri strani, zato da bi zaradi manjše površine ran zmanjšali oksidacijo izsečkov. Zato predvidevamo, da je h kontaminaciji izsečkov lahko prispeval tako način sterilizacije, kot tudi način priprave izsečka.

O neuspehu pri sterilizaciji tkiva *Cynara cardunculus* L. poročajo tudi drugi raziskovalci, ki preizkušajo različne metode za izboljšanje sterilizacije.

Tako so že Ancora in sod. (1981), kljub sterilizaciji, med kultiviranjem opazili kontaminacijo polovice materiala. Pri sterilizaciji so poganjkom odstranili liste in uporabili 2 cm vrh poganjka in 1,5 cm stebela z aksilarnimi brsti. Te so potopili v 70 % alkohol za 5 sekund in jih nato takoj namočili v raztopino natrijevega hipoklorita (1,5 % aktivnega klora) za 20 minut. Nato pa jih trikrat spirali s sterilno raztopino askorbinske kisline (100 mg/l). Navajajo tudi, da so občasno lahko pridobili sterilno kulturo, če so izolirali vršiček poganjka, dolg manj kot 2 milimetra v brezprašni komori - brez sterilizacije.

Podobno sterilizacijsko metodo, kot smo jo uporabili mi, so uporabili tudi Bedini in sod. (2012), ko so vzpostavili rastlinske tkivne kulture štirih toskanskih kultivarjev. Vršičke poganjkov dolge 2 cm, so najprej namakali v vodni raztopini askorbinske (0,1 g/l) in



citronske (0,5 g/l) kisline. Nato so jih površinsko sterilizirali v vodni raztopini živosrebrovega klorida (5 g/l) za 3 minute in nato trikrat spirali s sterilno vodo. Sledilo je 15-minutno namakanje v 20 % vodni raztopini natrijevega hipoklorita (8 % aktivnega klora) in nato trikratno spiranje s sterilno vodo. Med fazo iniciacije je bilo 54 % izsečkov kultivarja Empolese kontaminiranih. Pri preostalih treh kultivarjih je bilo kontaminacij manj - Chiusure 30,5 %, Violetto di Toscana 10,5 % in Terom 14 %. Kontaminacijo razlagajo z endogenimi boleznimi, ki se prenašajo preko starševskih rastlin.

Primerjavo učinkovitosti sterilizacije z uporabo različnih koncentracij raztopine natrijevega hipoklorita (NaClO) so izvedli Dawa in sod. (2012). Poganjke, dolge med 10 in 15 cm, so najprej 30 minut čistili z milnico pod tekočo vodo. Nato so poganjke prenesli v brezprašno komoro in jih prikrajšali. Prikrajšane poganjke so najprej potopili za 5-10 sekund v 70 % etanol, sledilo je 2-minutno namakanje v 0,1 % vodni raztopini živosrebrovega klorita in nato spiranje pod sterilno destilirano vodo. Nato so uporabili za 20-minutno namakanje 0, 1, 2 in 3 % raztopino natrijevega hipoklorita skupaj z nekaj kapljicami omočila Tween 20. Temu je sledilo spiranje s sterilno destilirano vodo. Izsečke so nato postavili v raztopino askorbinske in citronske kisline (obeh po 150 ppm). Nato so odstranili 1-2 mm meristemske vršičke in jih kultivirali. Ugotovili so, da je bila najučinkovitejša 3 % raztopina NaClO, z le 15 % kontaminacijo, sledi 2 % raztopina NaClO s 25 % kontaminacijo, 1 % raztopina NaClO z 68 % kontaminacijo in kontrola s 100 % kontaminacijo.

Poleg same metode sterilizacije in njene učinkovitosti različni avtorji navajajo, da kontaminacije povzročajo različni patogeni organizmi (Peñalver in sod. 1994; Acquadro in sod. 2010; Bedini in sod. 2012; Navacchi in sod. 2013), ki so prisotni v starševskem rastlinskem materialu. Za *C. cardunculus* L. je sicer znano, da večina izmed 24-ih virusov, ki jo okužujejo, slabijo njeno količino pridelka in razvoj v drevesnicah (Acquadro in sod. 2010). Peñalver in sod. (1994) so izolirali bakterije iz poganjkov artičok, ki niso kazale vidnih znakov okužbe. Navacchi in sod. (2013) pa so preverili, kateri mikroorganizmi okužujejo kulture in njihovo prisotnost v gojiščih za kultiviranje.

Tako so Peñalver in sod. (1994) primerjali patogenost med inokuliranimi rastlinami *in vitro* in na poljih. Poskus so izvedli zato, da so ugotovili katere latentne bakterije, ki se pokažejo že po nekaj mesecih, se nahajajo v poganjkih *Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* (L.) Fiori. Uporabili so poganjke, iz kolekcijskega nasada, ki niso imeli vidnih simptomov okužbe. Kolonije mikroorganizmov, ki so jih pridobili iz homogeniziranega poganjka, z različno morfologijo so izolirali, karakterizirali ter identificirali. Preostale poganjke so uporabili za razvoj *in vitro* rastlin in jih subkultivirali dokler niso imeli dovoljšnega števila rastlin za inokulacijo. Poganjke so inokulirali z zarezo pri bazi poganjka, rezilo je bilo potopljeno v posamezno izolirano bakterijsko suspenzijo, nekatere so zarezali z rezilom potopljenim v vodo (kontrola) in nekatere inokulirali z drugimi bakterijami, ki jih niso prvotno izolirali iz tkiva poganjkov. Dnevno so opazovali mesto

zareze in po 12-30 dneh re-izolirali bakterije iz razvitih zgornjih listov. Tako so ugotovili, ali so se razvile le bakterije s katerimi so inokulirali oziroma če so bile prisotne nove. Rastlinam na polju pa so inokulirali liste z bakterijskimi suspenzijami in gledali njihov odziv, prav tako so izolirali bakterije in ugotavljali prisotnost inokuliranih ter novih bakterij. Tako so izolirali 17 različnih bakterijskih tipov, najpogostejši iz rodu *Pseudomonas*, in ugotovili, da se na enem poganjku nahajajo po en, dva ali trije bakterijski sevi. Rastline na polju so na mestih inokulacije kazale nekrotične cone. Rezultati kažejo, da lahko na videz zdrave rastline gostijo številne mikroorganizme, ki so lahko patogeni ali saprofitski. Rastni pogoji *in vitro* rastlinskih kultur omogočajo ugodne pogoje za razvoj bakterij. Zato je tudi težko razlikovati med kontaminacijo zaradi prisotnosti mikroorganizmov v tkivu ali pa v samem gojišču.

Navacchi in sod. (2013) pa so ravno s tem namenom preverili, katero je najprimernejše gojišče za hitrejšo zaznavo kontaminacije pri mikropropagaciji *C. cardunculus* L. var. *scolymus* (L.) Fiori, identificirali bakterije in proučevali njihov izvor. Tako so dodali gojišču za iniciacijo različne kombinacije snovi, ki stimulirajo rast bakterij. Prisotnost bakterij v gojiščih so preverili z ekstrakcijo genetskega materiala, verižno reakcijo s polimerazo in njihovo identifikacijo. Prisotne bakterijske kolonije so pripadale rodu *Bacillus*. Rast poganjkov na sedmih različnih gojiščih je omogočila zadovoljiv razvoj poganjkov ob skoraj popolni odsotnosti rumenkastih obarvanj (znak razvoja kolonije). Tako so prišli do zaključka, da so nekateri mikroorganizmi prisotni tudi v gojiščih - kljub sterilizacijskim postopkom, ter da dodatek snovi, ki spodbuja rast mikroorganizmov omogoča hitrejšo zaznavo kontaminacije, vendar ne vpliva na sam razvoj izsečka. Uporabo takšnih gojišč priporočajo predvsem v začetnih fazah mikropropagacije, z namenom da se pred končnimi fazami odstrani kontaminirane kulture.

Na podlagi prebranega in dobljenih rezultatov poskusa lahko sklepamo, da je bila tako visoka stopnja kontaminacije posledica že v rastlinskem tkivu prisotnih mikroorganizmov, mikroorganizmov v gojišču kljub avtoklaviranju in/ali samega načina oblikovanja izsečkov.

**Preglednica 7:** Opis nekontaminiranih poganjkov 3 tedne po prvem poskusu iniciacije.

<b>Lastnost kulture poganjkov na iniciacijskem gojišču I.</b>		
Kozarček:	1	Razviti 3 poganjki: - 2 poganjka dolga 5 cm in - 1 poganjek krajši od 1 cm.
	2	Razvit 1 poganjek dolg 3 cm in je porjavel.
	3	Razviti 3 poganjki dolgi 2 cm.
<b>Lastnost kulture poganjkov na iniciacijskem gojišču II.</b>		
Kozarček:	1	Razvit 1 poganjek dolg 2 cm.
	2	Razviti 3 poganjki: - 2 poganjka krajša od 1 cm in - 1 poganjek dolg 3 cm. + pri dnu izsečka večja količina kalusa.

V fazi iniciacije se je uspešno razvilo pet nekontaminiranih izsečkov s poganjki. Trije izmed teh so se razvili na gojišču brez dodanega rastnega hormona (TDZ), dva pa na gojišču z dodanim TDZ. Število razvitih poganjkov na obeh gojiščih je bilo podobno in sicer, v posameznem kozarčku se je razvil eden ozirom do trije poganjki. Večina poganjkov je merila v višino od 1 do 3 centimetre in so bili obarvani z za artičoko značilno zeleno barvo. Le en poganjek je porjavel, vendar je bila osnova poganjka še vedno vitalna. Dva poganjka pa sta dosegala dolžino skoraj 5-ih centimetrov, razvila sta se na gojišču I., torej brez hormona. To pomeni, da se lahko poganjki razvijejo tudi iz izsečkov, ki so postavljeni na gojišče brez dodanega hormona. Rastne hormone se dodaja v gojišča v različnih fazah in v različnih koncentracijah, specifično za vsako sorto, saj lahko vplivajo na rastlinski material že v zelo majhnih koncentracijah.

V našem poskusu smo dodali v fazi iniciacije tidiazuron. Zanj smo se odločili na podlagi raziskave Dawa in sod. (2012), v kateri so ga uporabili za spodbuditev rasti aksilarnih poganjkov pri nižjih koncentracijah (do 1 mg TDZ/l) ali pa pri višjih koncentracijah (nad 1 mg TDZ/l) za spodbuditev tvorbe kalusa ter somatske embriogeneze (Thomas 2003; Osman in sod. 2010; Kumar in Srivastava 2015). Dawa in sod. (2012) so pri koncentraciji tidiazurona 0,05 mg/l opazili razvoj največjega števila poganjkov in listov v primerjavi z drugimi koncentracijami, vendar pa so bili ti nekoliko krajši v primerjavi s poganjki na gojišču s koncentracijo 1 mg/l. Ker je bil naš namen spodbuditi rast poganjkov in ne kalusa, smo tudi mi uporabili koncentracijo tidiazurona, ki je bila v raziskavi Dawa in sod. (2012) ugotovljena kot najprimernejša. Tidiazuron je sintetični citokinin, ki spodbuja rast aksilarnih poganjkov, zavira organogenezo korenin in ob višjih koncentracijah spodbuja oblikovanje kalusa (Chin-Yi 1992; Huetteman in Preece 1993). V naših kozarčkih je bilo le pri enem opaziti, da je poganjek pri dnu razvil večji skupek kalusnih celic poleg treh poganjkov. Tidiazuron so raziskovalci zaradi njegovega delovanja uporabili tudi za spodbuditev organogeneze hipokotilov in kotiledonov brokolija in opazili, da se je po dveh

tednih začel tvoriti kalus (Kumar in Srivastava 2015). Uporabili so ga tudi za indukcijo poganjkov in regeneracijo rastlin iz izsečkov kotiledonov murve, kjer pa niso opazili nastanka kalusa (Thomas 2003). Tidiiazuron so Osman in sod. (2010) uporabili posamično ali pa v kombinaciji z drugimi rastnimi hormoni, z namenom indukcije kalusa iz izsečkov kotiledonov in spodbuditve organogeneze paradižnika iz pridobljene kulture kalusa. Organogenezo so opazili po 8-ih tednih kultiviranja le pri izsečkih na gojiščih z dodatkom različnih koncentracij TDZ ali pa v kombinaciji z BAP. Najvišje povprečno število poganjkov - 6 - iz kulture kalusa kotiledonov, so pridobili na MS gojišču z dodatkom 3 mg/l TDZ, z 72,2 % rastjo poganjkov. Najboljšo - 93 % - rast poganjkov pa so dosegli, na MS gojišču z dodatkom 0,5 mg/l TDZ in 0,5 mg/l BAP, vendar pa je bilo povprečno število poganjkov 3,3. Organogeneza iz kalusa je pomembna metoda pri genetski transformaciji in induciranju somaklonske variabilnosti.

### 3.2 Prvo subkultiviranje

Iz petih kozarčkov z razvitimi poganjki iz 1. nanosa, smo po prvem subkultiviranju dobili 14 kozarčkov z izsečki (preglednica 8). S kontaminacijami smo imeli težave tudi po subkultiviranju. Iz gojišča I. smo pridobili tri nekontaminirane in dva kontaminirana kozarčka, iz gojišča II. pa smo dobili 4 nekontaminirane in 5 kontaminiranih kozarčkov s poganjki. Razvoj poganjkov smo opazovali le pri nekontaminiranih kulturah (preglednica 9). V treh kozarčkih (poganjki preneseni iz gojišča I.) smo opazili sledeče: v enem kozarčku se je razvil le en 3 cm dolg poganjek. V drugem kozarčku sta se razvila dva poganjka krajša od 1 cm. V tretjem kozarčku pa so se razvili trije poganjki, prav tako krajši od 1 cm. V štirih kozarčkih (z izsečki iz gojišča II.) pa smo opazili naslednje: v enem kozarčku so se razvili štirje poganjki, od katerih so bili trije krajši od 1 cm, eden pa je meril v dolžino 4 cm. V drugem kozarčku so se razvili tudi štirje poganjki, od katerih sta bila dva dolga 2 cm, en 3 cm in en 4 cm. V tretjem kozarčku sta se razvila dva poganjka, dolga 3 cm. V četrtem kozarčku pa se je razvil le en poganjek krajši od 1 cm. V kozarčkih smo le pri izsečkih, prenesenih iz gojišča II. (gojišče z dodanim TDZ) opazili, da se je v dveh, sicer kontaminiranih kozarčkih, tvoril kalus.

**Preglednica 8:** Število kontaminiranih in nekontaminiranih kozarčkov s poganjki po 1. subkultiviranju.

1. subkultiviranje	Izvirno iniciacijsko gojišče	Nekontaminirani kozarčki s poganjki	Kontaminirani kozarčki s poganjki
	I. obravnavanje	1 (+2)	2
	II. obravnavanje	3 (+1)	5

**Preglednica 9:** Opis nekontaminiranih poganjkov po 1. subkultiviranju.

<b>Lastnosti kulture poganjkov izvirno iz iniciacijskega gojišča I. po 1. subkultiviranju</b>		
Kozarček:	1	Razvit 1 poganjek dolg 3 cm.
	2	Razvita 2 poganjka krajša od 1 cm.
	3	Razviti 3 poganjki krajši od 1 cm.
<b>Lastnosti kulture poganjkov izvirno iz iniciacijskega gojišča II. po 1. subkultiviranju</b>		
Kozarček:	1	Razviti 4 poganjki: - 3 poganjki krajši od 1 cm in - 1 poganjek dolg 4 cm.
	2	Razviti 4 poganjki: - 2 poganjka dolga 2 cm, - 1 poganjek krajši od 3 cm in - 1 poganjek krajši od 4 cm.
	3	Razvita 2 poganjka dolga 3 cm.
	4	Razvit 1 poganjek krajši od 1 cm.

### 3.3 Drugo subkultiviranje

Tri tedne po 1. subkultiviranju smo od 7-ih kozarčkov brez kontaminacije, za 2. subkultiviranje uporabili poganjke le iz štirih kozarčkov (v enem kozarčku je bila kultura poganjkov iz iniciacijskega gojišča I., ki smo jo predstavili samo na novo gojišče (brez multiplikacije), v preostalih treh pa iz gojišča II.). V treh kozarčkih kultura iz prvega subkultiviranja še ni bila dovolj razvita za ponovno subkultiviranje (kultura poganjkov za drugo subkultiviranje iz teh kozarčkov je bila primerna za drugo subkultiviranje šele po šestih tednih).

Iz štirih uporabljenih kozarčkov s poganjki smo po 2. subkultiviranju pridobili osem kozarčkov z izsečki (preglednica 10). Eden je pripadal kulturi iz gojišča I. in po treh tednih se je v tem kozarčku razvil en poganjek, krajši od 1 cm. Izmed preostalih sedmih kozarčkov smo pri treh opazili kontaminacijo, v preostalih štirih pa je bil razvoj poganjkov 3 tedne po 2. subkultiviranju sledeč: v prvem kozarčku sta se razvila dva poganjka, od katerih je bil en dolg 3 cm, drugi pa krajši od 1 cm. V drugem kozarčku so se tvorili trije poganjki, od katerih sta bila dva krajša od 1 cm, drugi pa je meril 2 cm. V tretjem kozarčku so se razvili štirje poganjki, krajši od 1 cm. V četrtem kozarčku pa sta se tvorila dva poganjka, en dolg 3 cm in drugi krajši od 1 cm (preglednica 11).

**Preglednica 10:** Število kontaminiranih in nekontaminiranih poganjkov po 2. subkultiviranju.

2. subkultiviranje	Izvorno iniciacijsko gojišče	Nekontaminirani kozarčki s poganjki	Kontaminirani kozarčki s poganjki
	I. obravnavanje	1	0
	II. obravnavanje	4	3

**Preglednica 11:** Opis nekontaminiranih poganjkov po 2. subkultiviranju.

Lastnosti kulture poganjkov izvorno iz iniciacijskega gojišča I. po 2. subkultiviranju		
Kozarček:	1	Razvit 1 poganjek dolg 2 cm.
Lastnosti kulture poganjkov izvorno iz iniciacijskega gojišča II. po 2. subkultiviranju		
Kozarček:	1	Razvita 2 poganjka: - 1 poganjek dolg 3 cm in - 1 poganjek krajši od 1 cm.
	2	Razviti 3 poganjki: - 1 poganjek dolg 2 cm in - 2 poganjka krajša od 1 cm.
	3	Razviti 4 poganjki krajši od 1 cm.
	4	Razvita 2 poganjka: - 1 poganjek dolg 3 cm in - 1 poganjek krajši od 1 cm.

### 3.4 Pomen rastnih regulatorjev pri indukciji kalusa artičoke

V kozarčkih po 2. subkultiviranju nismo opazili, da bi se tvoril kalus, kakor se je to zgodilo pri prvem subkultiviranju ter pri iniciaciji kulture. Kalus se je tako tvoril le pri izsečkih, ki so imeli v gojišče dodan rastni hormon, tudi če so bili nato v subkultiviranju postavljeni na gojišče brez hormona. Znano je, da rastni hormoni spodbudijo tvorbo kalusa zaradi vpliva na celični metabolizem, pri različnih koncentracijah pri različnih vrstah, vendar lahko to vodi tudi v somaklonsko variabilnost, ki pa pri mikropropagaciji ni zaželena (Chin-Yi 1992; Huetteman in Preece 1993; Shan in sod. 2016). Raziskovalci, ki so v poskusih uporabljali tidiazuron, niso zabeležili, da bi pri artičoki nastajal kalus, npr. Dawa in sod. (2012). Vendar pa so v različnih poskusih raziskovalci vzpostavljali kulturo kalusa iz artičoke s pomočjo drugih citokinov (sem spada tudi tidiazuron), avksinov ali pa v kombinaciji le-teh. Pri artičoki so Menin in sod. (2013) namensko inducirali kalus zaradi vsebovanih spojin ali samega proučevanja kalusa, s pomočjo BAP (citokin) in NAA (avksin), Reza Shan in sod. (2016) s pomočjo 2,4-D (2,4-diklorofenoksiocetna kislina; avksin) ter Figueiredo in sod. (1987) s pomočjo BAP (citokin) in 2,4-D (avksin).

Artičoka je pomemben vir različnih človeku uporabnih spojin, na primer kofeoilkinske kisline, ki pa se jo lahko v večji količini pridobi ravno, če se vzgoji kulturo kalusa. Zato so Menin in sod. (2013) raziskali, kateri pogoji bi bili najbolj optimalni za pridobitev čim

večje količine kofeoilkinske kisline iz tkiva *Cynara cardunculus* L. var *scolymus* (L.) Fiori. Tako so skupno testirali 108 kombinacij načina osvetlitve, sestave gojišča ter sorte artičoke. Poskus je pokazal, da inkubacija tkivne kulture v temi zmanjša rjavenje kalusa in izboljša njegovo rast. Navajajo tudi, da je prisotnost BAP v gojišču pomemben dejavnik, za indukcijo kalusa artičoke. Poskus pa je pokazal, da je tudi NAA močno prispeval k uspešnosti indukcije kalusa. Tako so ugotovili, da optimalne pogoje za indukcijo kalusa predstavlja dodatek 1 mg/l BAP skupaj s 3 mg/l NAA ter konstantna tema. Pod temi pogoji se je kalus tvoril po enem tednu kultiviranja, pri vseh sortah artičoke. Kalus je bil svetlo zelene barve in imel vodnato teksturo.

Shan in sod. (2016) pa so preverili razvoj kalusa ne le na različnih gojiščih z dodatkom različnih koncentracij hormonov temveč tudi vpliv različnih delov artičoke. Indukcija kalusa je potekala v temni rastni sobi pri  $23 \pm 2$  °C. Na gojišču brez dodanih hormonov niso opazili, da bi se tvoril kalus. Poleg tega sta se suha masa kalusa in sama formacija kalusa razlikovali glede na različna gojišča (B5 gojišče, Murishage in Skoog gojišče, Schenk in Hildebrandt gojišče). Več kalusa se je razvilo na MS in B5 gojiščih, kakor na SH gojišču. Poskus je pokazal, da lahko kultura, ki v gojišču vsebuje le en tip hormona - v tem primeru 2,4-D (2,4-diklorofenoksiocetna kislina) - kalusira, pri koncentracijah 0,5 mg/l, 0,75 mg/l in 1 mg/l, vendar pa se kalus ne razvije brez dodatka hormona. Vendar pa v poskusu koncentracija hormona ni vplivala na strukturo kalusa, kar pomeni, da je imela vsebnost vode v kalusu vpliv na suho maso. Ko so primerjali, kateri del artičoke je najbolj primeren za indukcijo kalusa, se je izmed uporabljenega lista, peclja lista (petiola) ter korenine za najboljšega izkazalo listje. Torej je lahko kalusiranje v primeru pridobivanja neke spojine ali pa namerne vzpodbuditve somaklonske variabilnosti zaželeno. V postopkih za pridobitev sadik s tehnikami rastlinskih tkivnih kultur pa kalus ni zaželen, ravno zaradi možnosti somaklonske variabilnosti, ki lahko spremeni stabilnost zelenega genotipa.

### **3.5 Multiplikacijski faktor pri artičoki in pomen različnih dejavnikov**

Pri mikropropagaciji je zelo pomemben tudi multiplikacijski faktor oz. število sadik, ki se jih pridobi pri vsakem nadaljnjem subkultiviranju. V našem poskusu je bil multiplikacijski faktor, v prvem in drugem subkultiviranju, med enim in štirimi poganjki na izseček. Pri prvem subkultiviranju se je v sedmih kozarčkih razvilo 17 poganjkov, pri drugem subkultiviranju pa v petih kozarčkih 12 poganjkov. Na končno število novih poganjkov je pomembno vplivala tudi okužba izsečkov.

Pri prvem poskusu iniciacije smo v povprečju iz izsečkov na gojišču I. dobili 2,33 poganjka, na gojišču II. pa 2 poganjka. Pri 1. subkultiviranju smo povprečju iz kulture poganjkov izvorno iz iniciacijskega gojišča II. dobili 2,75 poganjka, iz gojišča I. pa povprečja nismo mogli izračunati (le en izseček). Pri 2. subkultiviranju smo v povprečju iz

kulture poganjkov izvorno iz iniciacijskega gojišča II. dobili 3,33 poganjka, iz gojišča I. pa povprečja nismo mogli izračunati (le en izseček).

Uspešnosti subkultiviranja statistično ni bilo mogoče določiti, zaradi premajhnega števila uspešnih subkultur. Raziskovalci, ki so razvijali metode za mikropropagacijo artičoke, so pri subkultiviranju pridobili različno multiplikacijsko stopnjo novih poganjkov iz izsečkov vršičkov poganjkov, poganjkov brez vršička, ovolov ter aksilarnih poganjkov (Ancora in sod. 1981; Iapichino 1996; El Boullani 2012).

Tako so Ancora in sod. (1981) z *in vitro* propagacijo vršičkov poganjkov in spodnjih delov poganjkov (brez vršička) po treh tednih dosegli 4,5 multiplikacijsko stopnjo poganjkov. To so dosegli tako, da so najprej izsečke nanesti na iniciacijsko gojišče, ki je vsebovalo MS gojišče, 50 mg/l natrijevega dihidrogen fosfata, 100 mg/l mio-inozitola, 100 mg/l L-tirozina, 40 mg/l adenina, 0,5 mg/l IAA, 10 mg/l kinetina, 4 % saharoze in 0,7 % agarja. Nato so razvite izsečke s poganjki subkultivirali na MS gojišču z zmanjšano koncentracijo kinetina ter brez dodatka natrijevega dihidrogen fosfata. Med poskusom so zabeležili, da so izsečki v roku enega meseca razvili med enim in petimi poganjki. Subkultiviranje je potekalo vsake 3 tedne. Tekom izvedbe poskusa niso zaznali tvorbe kalusa, kar naj bi zagotavljalo genetsko stabilnost in homogenost sadik, pridobljenih z *in vitro* kultiviranjem. Iapichino (1996) je za mikropropagacijo artičoke uporabil ovole. Največjo stopnjo razvitih aksilarnih poganjkov iz izsečkov je dosegel na MS gojišču z dodatkom 1 mg/l BAP. Na vsake tri tedne je bila ugotovljena multiplikacijska stopnja štirih poganjkov.

El Boullani in sod. (2012) so poskusili izboljšati mikropropagacijsko metodo za artičoko. Uporabili so aksilarne poganjke, ki so se razvili na sadikah vzgojenih iz embrijev. Poleg števila novo razvitih poganjkov, so proučevali tudi vpliv števila izsečkov v enem kozarčku na razvoj poganjkov. Poganjki, razviti po šestih tednih iniciacijske faze, so bili prestavljeni na gojišče za razmnoževanje z dodatkom 1 mg/l kinetina in 0,1 mg/l NAA. Ob prestatitvi so poganjkom odstranili apikalne brste, liste in korenine. Na gojišču za razmnoževanje so se aksilarni poganjki razvili v petih tednih, pri čemer so v povprečju pridobili 17 aksilarnih poganjkov na izseček, iz prve subkulture. Pri naslednjih subkultiviranjih poganjkom niso odstranili apikalnih brstov ter listov, vendar so opazili manj razvitih poganjkov - le med dva in devetimi poganjki na izseček. V poskusu so izvedli 12 subkultiviranj, pri katerih je bila povprečna stopnja multiplikacije 7,56 poganjkov na izseček. Tekom poskusa so opazovali/ugotavljali tudi vpliv števila izsečkov na kozarček (3, 4, 6, 7) - na razvoj poganjkov. Ugotovili so, da je zmanjšanje števila izsečkov iz 6-7, na 3-4, na kozarček, povečalo multiplikacijsko stopnjo iz 2,33 na 6,57 poganjkov. Poleg tega so opazili zmanjšanje preživelih izsečkov, ko jih je bilo v enem kozarčku več kot 6.



## 4 ZAKLJUČEK

*Cynara cardunculus* L. je rastlina iz družine nebinovk (Asteraceae), ki uspeva na območju sredozemskega bazena. Uporabna ni le v prehrani temveč tudi v medicini ter farmaciji zaradi različnih spojin, ki jih ima v tkivu. Za namene pridelave so se razvile *in vitro* metode za pridobivanje večjega števila sadik na manjšem prostoru ter iz manjše količine začetnega materiala, čeprav se še vedno uporabljajo tudi klasični načini razmnoževanja rastlinskega materiala - z ovoli, ločevanjem poganjkov od starševskih rastlin in s semeni. V okviru zaključne naloge smo si zadali nalogo, da bomo vzpostavili rastlinsko tkivno kulturo iz mladih poganjkov artičoke ter ugotavljali, kako se bodo odzvali izsečki na gojiščih, koliko novih poganjkov se bo razvilo ter, ali bodo poganjki primerni za nadaljnjo subkultiviranje. Izsečke artičoke smo nanesti na gojišča v dveh poskusih, ki sta se razlikovala v načinu sterilizacije in priprave izsečka. Pri prvem poskusu smo rastlinski material sterilizirali s 70 % etanolom in 10 % raztopino natrijevega hipoklorita, pri drugem poskusu pa s 70 % etanolom in 1,67 % raztopino dikloroizocianurne kisline. Iz izsečkov mladih poganjkov artičoke (strunjanska artičoka), na gojišče nanešenih v prvem poskusu, nam je uspelo vzpostaviti rastlinsko tkivno kulturo na gojišču brez hormona (gojišče I.) in na gojišču s tidiazuronom (gojišče II.). Rast izsečkov smo opazili tudi na gojišču III. (gojišče II z dodatkom dodatnih virov hranil), vendar so bili vsi kozarčki z gojiščem III. kontaminirani. Izsečki iz drugega nanosa pa so bili med kultiviranjem vsi kontaminirani. Število razvitih poganjkov in njihova dolžina, sta bili v fazi iniciacije podobna na I. (osnovno gojišče) in II. (z dodanim tidiazuronom) iniciacijskem gojišču. Vendar so poganjki, ki so bili subkultivirani iz iniciacijskega gojišča z dodanim rastnim hormonom, v fazi subkultiviranja tvorili večje število novih poganjkov, v primerjavi s poganjki, ki so bili v fazi iniciacije naneseni na gojišče brez hormona. Ker je bila rast poganjkov inducirana na gojišču brez dodanega hormona, kot tudi na gojišču z dodanim TDZ, bi lahko v fazi iniciacije izločili rastni hormon, kar bi znižalo strošek in zmanjšalo možnost morebitnih somatskih mutacij. Vendar bi za potrditev tega morali poskus ponoviti z večjim številom tkivnih kultur. Opazili smo, da se je kalus tvoril le pri izsečkih, ki so bili naneseni na gojišču z dodanim tidiazuronom, ki je znan po tem, da spodbuja rast aksilarnih poganjkov in kalusiranje. Tudi pri subkultiviranju smo kalus zaznali le pri izsečkih, ki so bili izvorno iz razvitih poganjkov na gojišču z dodanim rastnim hormonom (tidiazuronom). Sicer pa smo pri prvem in drugem subkultiviranju pridobili od enega do štiri nove poganjke na izseček, in večina jih je bila primernih za nadaljnje subkultiviranje po treh tednih. Tako lahko potrdimo vse štiri hipoteze. Potrebno pa je poudariti, da smo imeli skozi celoten potek poskusa težave s kontaminacijo rastlinskega materiala, kar je močno vplivalo na število uspešno razvitih poganjkov.

## 5 LITERATURA IN VIRI

Acquadro A, Papanice M.A., Lanteri S., Bottalico G., Portis E., Campanale A., Finetti-Sialer M.M., Mascia T., Sumerano P., Gallitelli D. 2010. Production and fingerprinting of virus-free clones in a reflowering globe artichoke. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 100: 329-337.

Ancora G., Belli-Donini M.L., Cuzzo L. 1981. Globe artichoke plants obtained from shoot apices through rapid *in vitro* micropropagation. *Scientia Horticulturae* 14: 207-213.

Basnizki J. in Zohary D. 1994. Breeding of Seed-Planted Artichoke. *Plant Breeding Reviews* 12: 253-269.

Bedini L., Lucchesini M., Bertozzi F., Graifenberg A. 2012. Plant tissue cultures from four Tuscan globe artichoke cultivars. *Central European Journal of Biology* 7(4): 680-689.

Bianco V.V. 2005. Present Situation and Future Potential of Artichoke in the Mediterranean Basin. *Acta Horticulturae* 681: 39-58.

Bohanec B. 1992. Tehnike rastlinskih tkivnih kultur. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta.

Bolčič J. 2018. Kmetijsko gozdarski zavod Nova Gorica. [https://www.kmetijskizavod-ng.si/panoge/poljedelstvo\\_in\\_zelenjadarstvo/2017061911022594/articoka\\_in\\_kardij/](https://www.kmetijskizavod-ng.si/panoge/poljedelstvo_in_zelenjadarstvo/2017061911022594/articoka_in_kardij/)  
(datum dostopa: 17. 12. 2018)

Chin-Yi L. 1992. The use of thidiazuron in tissue culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology* 29: 92-96.

Ciancolini A. 2012. Characterization and selection of globe artichoke and cardoon germplasm for biomass, food and biocompound production. Doktorska disertacija, Università degli Studi della Tuscia.

Cravero V., Cointry E. 2007. Shortening the seed-to-seed cycle in artichoke breeding by embryo culture. *Plant Breeding* 126: 222-224.

Dawa K.K., El-Saady W.M., El-Denary M.E., Abo-Elglagel I.M. 2012. In vitro micropropagation of globe artichoke plant (*Cynara scolymus* L.): 1-effect of sodium hypochlorite concentrations, cytokinins and subcultures number on shoots multiplication rate. *Mansoura Journal of Plant Production* 3(7): 2237-2248.

El Boullani R., Elmoslih A., El Finti A., El Mousadik A., Serghini M.A. 2012. Improved *in Vitro* Micropropagation of Artichoke (*Cynara cardunculus* var. *scolymus* L.). *European Journal of Scientific Research* 80(4): 430-436.

Figueiredo A.C., Fevereiro P., Cabral J.M.S., Novais J. M., Pais M.S.S. 1987. Callus and suspension cultures for biomass production of *Cynara cardunculus* (Compositae). *Biotechnology Letters* 9: 213-218.

Fortunato I.M., Ruta C., Castrignanò A., Saccardo F. 2005. The effect of mycorrhizal symbiosis on the development of micropropagated artichokes. *Scientia Horticulturae* 106: 472-483.

Huetteman C.A., Preece J.E. 1993. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 33: 105-119.

Iapichino G. 1996. Micropropagation of Globe Artichoke (*Cynara scolymus* L.) from Underground Dormant Buds ("Ovoli"). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 32(4): 249-252.

Integrated Taxonomic Information System.

[https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search\\_topic=TSN&search\\_value=37220#null](https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=37220#null) (datum dostopa: 18. 12. 2018)

Kameswara Rao N. 2004. Plant genetic resources: Advancing conservation and use through biotechnology. *African Journal of Biotechnology* 3: 136-145.

Keller E.R.J., Senula A., Leunufna S., Grube M. 2006. Slow growth storage and cryopreservation - tools to facilitate germplasm maintenance of vegetatively propagated crops in living plant collections. *International Journal of Refrigeration* 29: 411-417.

Kumar P., Srivastava D.K. 2015. Effect of potent cytokinin thidiazuron on in vitro morphogenic potential of broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*), an important vegetable crop. *Indian Journal of Plant Physiology*, doi: 10.1007/s40502-015-0179-y.

López-Pérez A.J., Martínez J.A. 2015. *In vitro* root induction improvement by culture in darkness for different globe artichoke cultivars. *In Vitro Cellular and Developmental Biology* 51: 160-165.

Menin B., Moglia A., Comino C., Hakkert J.C., Lanteri S., Beekwilder J. 2013. *In vitro* callus-induction in globe artichoke (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus*) as a system for the production of caffeoylquinic acids. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 88: 537-542.

Navacchi O., Zuccherelli G., Mazzucchi U. 2013. Development of Ambivalent Media to Detect Bacterial Contamination of Globe Artichoke Micropropagation Media. *Acta Horticulturae* 983.

Osman M.G., Elhadi E.A., Khalafalla M.M. 2010. Callus formation and organogenesis of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill, C. V. Omdurman) induced by thidiazuron. *African Journal of Biotechnology* 9(28): 4407-4413.

Pacifici S., Lucchesini M., Curadi M., Graifenberg A. 2007. Influence of medium composition and vessel ventilation during the micropropagation stages of *Cynara scolymus* L. cv. Grato 1. *Advances in Horticultural Science* 21(2): 83-88.

Pagnotta M.A., Fernández J.A., Sonnante G., Egea-Gilabert C. 2017. Genetic diversity and accession structure in European *Cynara cardunculus* collections. *PLoS ONE* 12: e0178770.

Peñalver R., Durán-Vila N., López M.M. 1994. Characterisation and pathogenicity of bacteria from shoot tips of the globe artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Annals of Applied Biology* 125: 501-513.

Pignone D., Sonnante G. 2004. Wild artichokes of south Italy: did the story begin here? *Genetic Resources and Crop Evolution* 51: 577-580.

Raccuia S.A., Melilli M.G. 2007. Biomass and grain oil yields in *Cynara cardunculus* L. genotypes grown in a Mediterranean environment. *Field Crops Research* 101: 187-197.

Reolon-Costa A., Grando M.F., Scheffer-Basso S.M., Guini S.O., Carneiro C.M. 2016. Morphological development of artichoke: focus on the subterranean system. *Acta Horticulturae* 1147: 335-342.

Riahi J., Nicoletto C., Bouzaein G., Sambo P., Kouki Khalfallah K. 2017. Effect of vegetative propagation materials on globe artichoke production in semi-arid developing countries: agronomic, marketable and qualitative traits. *Agronomy* 7(4): 65.

Robba L., Carine M.A., Russell S.J., Raimondo F.M. 2005. The monophyly and evolution of *Cynara* L. (Asteraceae) *sensu lato*: evidence from the Internal Transcribed Spacer region of nrDNA. *Plant Systematics and Evolution* 253: 53-64.

Rottenberg A., Zohary D. 1996. The wild ancestry of the cultivated artichoke. *Genetic Resources and Crop Evolution* 43: 53-58.

Shan P.R., Banisadr Nars M.-H., Malek-Yonan A. 2016. Determination of callus induction of the artichoke and optimization of callus producing culture. *International Journal of Biochemistry and Biotechnology* 5(3): 670-674.

Sonnante G., Carluccio A.V., Vilatersana R., Pignone D. 2007a. On the origin of artichoke and cardoon from the *Cynara* gene pool as revealed by rDNA sequence variation. *Genetic Resources and Crop Evolution* 54: 483-495.

Sonnante G., Pignone D., Hammer K. 2007b. The Domestication of Artichoke and Cardoon: From Roman Times to the Genomic Age. *Annals of Botany* 100: 1095-1100.

Thomas D.T. 2003. Thidiazuron induced multiple shoot induction and plant regeneration from cotyledonary explants of mulberry. *Biologia Plantarum* 46(4): 529-533.

Thorpe T.A. 2007. History of plant tissue culture. *Molecular Biotechnology* 37: 169-180.

Wang M.-R., Cui Z.-H., Li J.-W., Hao X.-Y., Zhao L., Wang Q.-C. 2018. In vitro thermotherapy-based methods for plant virus eradication. *Plant Methods* 14: 87.

Wright C.A. 2009. Did the Ancients Know the Artichoke? *Gastronomica* 9(4): 21-28.