

UNIVERZA NA PRIMORSKEM
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

ZAKLJUČNA NALOGA

OPTIMIZACIJA VZORČENJA LISTOV ARTIČOKE
(*Cynara cardunculus* L.) ZA IZOLACIJO KAKOVOSTNE
DNA

MATJAŽ SAKELŠAK

UNIVERZA NA PRIMORSKEM
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

Zaključna naloga

**Optimizacija vzorčenja listov artičoke (*Cynara cardunculus* L.)
za izolacijo kakovostne DNA**

(Optimization of artichoke (*Cynara cardunculus* L.) leaves sampling for
isolation of quality DNA)

Ime in priimek: Matjaž Sakelšak
Študijski program: Sredozemsko kmetijstvo
Mentor: izr. prof. dr. Dunja Bandelj
Somentor: asist. dr. Alenka Baruca Arbeiter

Koper, december 2018

Ključna dokumentacijska informacija

Ime in PRIIMEK: Matjaž SAKELŠAK

Naslov zaključne naloge: Optimizacija vzorčenja listov artičoke (*Cynara cardunculus* L.) za izolacijo kakovostne DNA

Kraj: Koper

Leto: 2018

Število listov: 30 Število slik: 9 Število tabel: 4

Število referenc: 31

Mentor: izr. prof. dr. Dunja Bandelj

Somentor: asist. dr. Alenka Baruca Arbeiter

Ključne besede: artičoka, sortna struktura, vzorčenje listov, molekulska karakterizacija

Izvleček: Artičoka (*Cynara cardunculus* var. *scolymus* L.) je značilna kultura Sredozemlja in je primerna tudi za gojenje na območju Slovenske Istre. Pri saditvi novih nasadov je pomembno poznavanje in razlikovanje sort artičok. Za razlikovanje različnih sort se poleg morfoloških znakov pogosto uporabljajo molekulski markerji in za molekulsko karakterizacijo sort je potrebna kakovostna DNA. V zaključni nalogi smo v dveh obdobjih vzorčili liste artičok in jih shranili na dva različna načina, spomladi 2016 v PVC-vrečkah in jeseni 2016 v posebej pripravljenem pufru. Izkazalo se je, da je shranjevanje listov artičok v PVC-vrečkah neprimerno, saj so listi na mestu poškodbe hitro oksidirali, kar je onemogočalo izolacijo kakovostne DNA. Na podlagi rezultatov merjenja koncentracije DNA smo ugotovili, da način shranjevanja sicer ni vplival na količino izolirane DNA, vendar pa je bilo testno pomnoževanje izolirane DNA z mikrosatelitskimi markerji uspešno le v primeru, ko smo liste artičok shranili v pufru NaCl-CTAB.

Key words documentation

Name and SURNAME: Matjaž SAKELŠAK

Title of the final project paper: Optimization of artichoke leaves sampling for isolation of quality DNA

Place: Koper

Year: 2018

Number of pages: 30 Number of figures: 9 Number of tables: 4

Number of references: 31

Mentor: Assoc. Prof. Dunja Bandelj, PhD

Co-Mentor: Assist. Alenka Arbeiter Baruca, PhD

Keywords: artichoke, varietal structure, leaf sampling, molecular characterization

Abstract: The artichoke (*Cynara cardunculus* var. *scolymus* L.) is a typical Mediterranean culture, therefore it is suitable for growing in the area of Slovenian Istria. When planning new plantings, it is important to know and distinguish among different varieties. This involves morphological characteristics as well as molecular markers, and for molecular characterization of varieties quality DNA is required. The thesis focuses on collecting samples from artichoke leaves in two periods using two different methods: in spring 2016 using PVC bags and in autumn of the same year in specially prepared buffer. The results show that storage in PVC bags was inappropriate since the leaves oxidized and consequently prevented the isolation of high-quality DNA. Based on the DNA concentration measuring results, it was found that the storage method did not significantly affect the amount of isolated DNA. However, the amplification test of isolated DNA with microsatellite markers was successful only when the artichokes were stored in buffer.

ZAHVALA

Ob zaključku študijske smeri Sredozemsko kmetijstvo bi se želel zahvaliti mentorici izr. prof. dr. Dunji Bandelj in somentorici dr. Alenki Baruca Arbeiter za vso strokovno pomoč ter podporo pri študiju in izdelavi naloge.

Zahvalil bi se tudi vsem profesorjem in asistentom UP FAMNIT za pridobljeno znanje ter izkušnje in sošolkam ter sošolcem Sredozemskega kmetijstva in Biodiverzitete za pomoč ter sodelovanje.

Prav tako bi se rad zahvalil svoji mami Franki Sakelšak in svojemu očetu Danilu Sakelšku, da sta mi omogočila študij, za spodbujanje ter potrpljenje, in bratu Dejanu Sakelšku ter širši družini.

Zahvaljujem se tudi svojemu nekdanjemu profesorju – razredniku na pomorski šoli, Danijelu Germeku, za usmeritev in spodbudo med študijem.

KAZALO VSEBINE

1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	1
2.1 Botanična klasifikacija artičoke	1
2.2 Biološke značilnosti artičoke	2
2.3 Zgodovina in razširjenost artičoke	4
2.4 Načini shranjevanja rastlinskega materiala za uspešno izolacijo DNA	8
2.5 Sekundarni metaboliti	9
2.5.1 Vsebnost sekundarnih metabolitov artičoke	9
2.5.2 Vpliv sekundarnih metabolitov na uspešnost izolacije DNA	9
3 MATERIAL IN METODE	10
3.1 Rastlinski material	10
3.1.1 Vzorčenje rastlinskega materiala	10
3.1.2 Shranjevanje rastlinskega materiala na dva načina	11
3.2 Izolacija celokupne DNA	11
3.3 Merjenje koncentracije DNA in preverjanje uspešnosti pomnoževanja DNA	12
4 REZULTATI IN DISKUSIJA	13
4.1 Optimizacija vzorčenja rastlinskega materiala	14
4.2 Primerjava količine DNA v izoliranih vzorcih in uspešnost pomnoževanja	14
5 ZAKLJUČEK	17
6 VIRI IN LITERATURA	18

KAZALO PREGLEDNIC

Tabela 1: Botanična klasifikacija artičoke.	2
Tabela 2: Delovna imena in oznake vzorcev artičok, lokacije vzorčenja ter koordinate prvega vzorčenja.	10
Tabela 3: Delovna imena in oznake vzorcev artičok, lokacije vzorčenja ter koordinate drugega vzorčenja.	10
Tabela 4: Koncentracije DNA po prvem in drugem načinu vzorčenja	15

KAZALO SLIK

Slika 1: Prečni prerez artičoke	3
Slika 2: Seme artičoke	3
Slika 3: Celotna rastlina in prečni prerez	4
Slika 4: Koreninski sistem artičoke	4
Slika 5: Razširjenost gojenja artičoke danes.....	5
Slika 6: Sorta »Romanesco«	6
Slika 7: Sorta »Tema F1«	7
Slika 8: Sorta, tradicionalna v Slovenski Istri.....	7
Slika 9: Izolacija DNA.....	11

SEZNAM KRATIC

angl. – angleško

DNA – deoksiribonukleinska kislina (angl. Deoxyribonucleic acid)

CTAB – cetil trimetil amonijev bromid

PVP – polivinilpirolidon

PCR – verižna reakcija s polimerazo (angl. Polymerase chain reaction)

TE – Tris EDTA

1 UVOD

Artičoka (*Cynara cardunculus* L.) je ena od kultur, ki jo v Sredozemlju gojijo že tisočletja. Že Grki in Rimljani so uživali artičoke, vendar ni povsem jasno, ali je šlo za divji kardij ali gojene artičoke. Do napredka pri gojenju artičok je najverjetneje prišlo v rimskih časih (Sonnante in sod., 2007). Grki, Egipčani in Rimljani so rastlino zelo cenili tudi zaradi njenih pozitivnih učinkov ter ji pripisovali afrodizično delovanje (Idrisi, 2005). Kasneje je zatonila v pozabo. Šele po 15. stoletju so jo začeli ponovno saditi (Bianco, 2005).

Danes so artičoke zelo priljubljene v kulinariki in zato zanimive za tržišče. Zaradi znanih pozitivnih učinkov je artičoka cenjena tudi v medicini. Listi artičoke so vir antioksidantov, kot je cinarin, ki pospešuje izločanje žolča in uspešno zdravi jetra (Di Venere in sod., 2005). Korenine vsebujejo inulin, ki pozitivno vpliva na črevesno floro človeka (Raccuia in Melilli, 2004). V Italiji iz njih izdelujejo znan grenek aperitiv Cynar. Artičoka zaradi močnih korenin ne trpi suše in zmanjšuje erozijo na terasah, zato je primerna tudi za gojenje v Slovenski Istri. Na območju Slovenske Istre je trenutno malo pridelovalcev, ki gojijo artičoke. Eden večjih nasadov je v Strunjanu, kjer imajo tudi vsako leto praznik artičok.

Artičoka je zagotovo perspektivna za območje Slovenske Istre, kjer so zanjo primerni pogoji za gojenje in bi lahko bila dobra tržna niša. Sorte artičok se med seboj precej razlikujejo: nekatere sorte imajo večje cvetove, druge manjše, lahko so različnih barv in imajo bodice (Basnizki in Zohary, 1994). Pri saditvi novih nasadov je pomembno poznavanje in razlikovanje sort artičok. Iz tega razloga sem tudi sam zasadil nasad različnih sort artičok, ki so mi kasneje služile za pridobivanje vzorcev za laboratorijski del zaključne naloge. Za razlikovanje različnih sort se poleg morfoloških lastnosti pogosto uporabljajo molekularni markerji in za molekularno karakterizacijo sort je potrebna kakovostna DNA. V zaključni nalogi sem si zastavil tri cilje: (1) popisati sorte artičok, ki so najbolj zastopane v Slovenski Istri, (2) določiti najprimernejši način za vzorčenje listov artičok in (3) izolirati DNA artičok ter določiti količino pridobljene DNA.

2 PREGLED OBJAV

2.1 Botanična klasifikacija artičoke

Vrsta *Cynara cardunculus* L. izvira iz sredozemskega bazena in vključuje tri medsebojno popolnoma kompatibilne varietete: artičoka (var. *scolymus*), kardij (var. *altilis*) in divji kardij (var. *sylvestris*). Latinsko ime za artičoko je torej *Cynara cardunculus* var. *scolymus* in spada v rod *Cynara*. Rod *Cynara* pripada družini Nebinovke (Asteraceae) (Preglednica 1) in po botanični klasifikaciji (Wiklund, 1992) poleg artičoke vsebuje še sedem diploidnih ($2n=2x=34$) vrst: *C. syriaca* Boiss., *C. auranitica* Post (po mnenju nekaterih avtorjev

pripada vrsti *C. syriaca*), *C. cornigera* Lindley, *C. algarbiensis* Cosson, *C. baetica* Pau, *C. cyrenaica* in *C. humilis* L. (Maire in Weiller, (Wiklund, 1992).

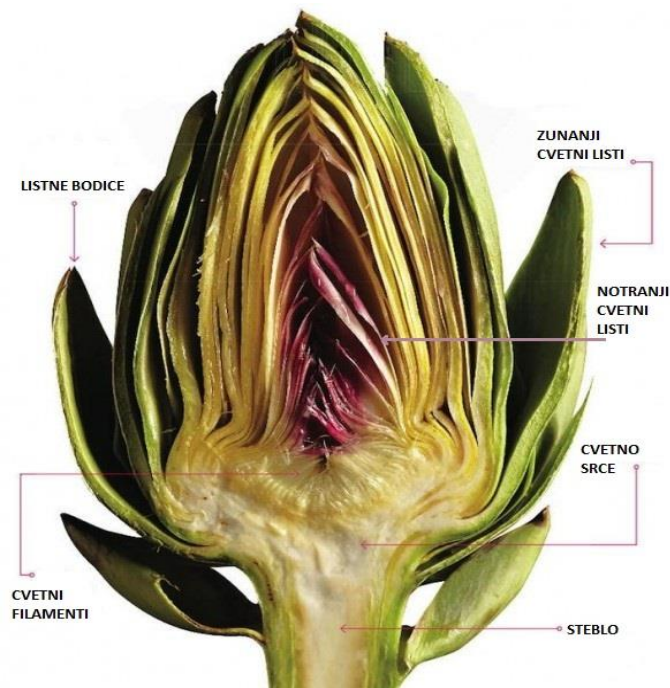
Tabela 1: Botanična klasifikacija artičoke.

Slovensko ime	Latinsko ime
Kraljestvo	Plantae
Deblo	Tracheophyta
Razred	Mangoliopsida
Red	Asterales
Družina	Asteraceae
Rod	<i>Cynara</i>
Vrsta	<i>Cynara cardunculus</i> L.
Varieteta	<i>Cynara cardunculus</i> var. <i>scolymus</i>

2.2 Biološke značilnosti artičoke

Vrste iz rodu *Cynara* so na splošno zelo robustne rastline. Zrastejo lahko do širine 1 m in do 2 m v višino. Barva listov je zelena, z različno intenziteto. Vrsta *C. cornigera* ima nazobčane liste in skoraj spominja na osat (*Silybum marianum*). Za vse vrste je značilen cvet, ki je sestavljen iz majhnih cvetov. Barva cveta je pri večini modro-vijolične barve, lahko pa je tudi bele barve. Vrste iz rodu *Cynara* so značilne za območje Sredozemlja, kjer so podobno zastopane kot oljka (*Olea europea* L.) in črničevje (*Quercus ilex* L.).

Najbolj znana vrsta je artičoka (*C. cardunculus* var. *scolymus*), ki je večinoma na severnem in jugovzhodnem delu Sredozemlja. Cvet artičoke je sestavljen iz zunanjih zelo čvrstih cvetnih listov, na katerih so majhne bodice in iz notranjih cvetnih listov. Na spodnji strani cveta je cvetno srce, ki je glavni del uporabe pri kulinariki, in steblo. V notranjosti cveta so filamenti (Slika 1), ki se kasneje razvijejo v socvetje vijolične barve in se po oploditvi razvijejo v seme (Slika 2), ki se s pomočjo vetra ter puhastih niti razširja naokoli.



Slika 1: Prečni prerez artičoke (<http://www.chatelaine.com/recipes/chatelaine-kitchen/how-to-eat-an-artichoke/?dfix?dfix>).



Slika 2: Seme artičoke (<https://www.dreamstime.com/royalty-free-stock-photos-artichoke-seed-close-view-his-fluffy-flying-instruments-image33398678>).

Steblo lahko zraste tudi do višine 1,5 m in 4–5 cm debeline. Iz stebila izmenično rastejo dolgi srebrno-zeleni listi (Slika 3). Njihova nazobčanost in pojav bodic se razlikujeta med sortami. Listno meso je mehko in krhko. Zgornji del lista prekriva plast kutina, ki v sušnih obdobjih preprečuje odvečno transpiracijo. Njihov koreninski sistem (Slika 4) je zelo globok, dobro razvit in zelo dobro prenaša sušo (Iannotti M., 2018).



Slika 3: Celotna rastlina in prečni prerez (<https://www.healthbenefitstimes.com/artichoke/>).



Slika 4: Koreninski sistem artičoke (Fernández in Curt, 2005).

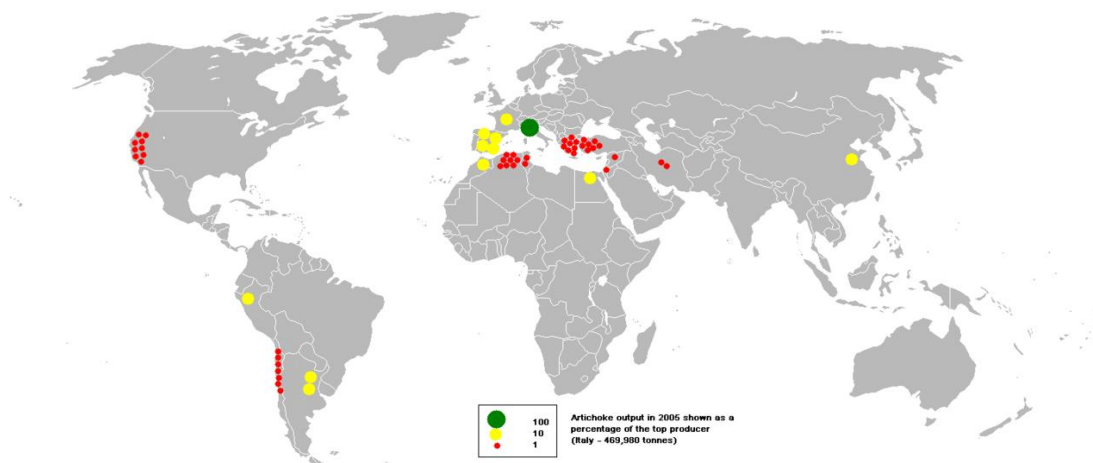
2.3 Zgodovina in razširjenost artičoke

Izvor artičoke se velikokrat povezuje z Arabci, ki so v dobi srednjega veka vladali v Sredozemlju. Imeli so pomembno vlogo pri širjenju različnih semen, kot na primer pri jajčevcih in špinači (Idris, 2005). Že grški in rimski pisatelji so v svojih delih pisali o uporabi te rastline. V antični Grčiji je beseda »scolymos« pomenila »špičast«, kar se nanaša na vrsto *C. cardunculus*.

Po mnenju pisateljev Pliny in Columella (Foury, 1989) se je gojenje artičok začelo okoli prvega stoletja našega štetja in domestikacija artičoke naj bi se začela v 20. stoletju. Poleg tega, da so imeli Arabci veliko vlogo pri širjenju semen, so bili glavni tudi pri poimenovanju artičoke. Ime artičoka izhaja iz arabske besede »al harshuff«, kar se odraža tudi v izrazih za artičoko v italijanščini (»Carciofo«), španščini (»Alcachofa«) in

portugalščini (»Alcachofra«). Zanimivo je, da v angleščini, francoščini, nemščini in vseh severno evropskih jezikih ime rastline izhaja iz stare latinske italijanščine »Alcocalum«, »Articocalus«, »Articiocco« ali »Articoca«. Možno je, da je izvor imena povezan z latinsko besedo »coculum« (= cardoon; Lonitzer, 1551–1555), medtem ko je v grščini rastlina poznana kot »Agginara«. Ta beseda izvira iz stare grške besede »Kyon«, ki pomeni »pes«, kar je lahko povezano z bodicami artičoke, ki spominjajo na zobe psa. To nakazuje, da je bila Italija nekakšen most za razširjanje artičoke po Evropi. Prvi znani zapis o trgovanju z artičokami je napisal Filippo Strozzi na začetku petnajstega stoletja (Bianco, 1990). Stari zapisi z začetka 17. stoletja govorijo o poslikavah listnega artičoka: »Caravaggio's Natura morta con fiori, frutta e verdure« (http://www.wga.hu/art/c/caravagg/12/89d_stil.jpg).

Danes poznajo artičoko po celem svetu. Gojenje se je razširilo vse do severne in južne Amerike ter Kitajske. Glavna izvoznica artičok na svetu je Italija (400.000 ton/leto), na drugem mestu je Egipt (300.000 ton/leto), na tretjem pa Španija (250.000 ton/leto) (FAO, 2018) (Slika 5). Gojenje artičok sega tudi čez Atlantski ocean, in sicer v Kalifornijo, s primernim podnebjem za gojenje artičoke v Ameriki. V Sloveniji imamo veliko območij, kjer bi lahko gojili artičoko, vendar ne prepoznamo potencialne tržne niše te rastline. Zato je Slovenija umeščena na konec lestvice gojiteljic artičok na svetu.



Slika 5: Razširjenost gojenja artičoke danes. Legenda na sliki prikazuje: a) zelena barva – letna pridelava več kot 100 ton; b) rumena barva – letna pridelava več kot 10 ton; c) rdeča barva – letna pridelava več kot 1 tono (<http://www.fao.org/faostat/en/#home>).

Danes po svetu gojijo približno 30 različnih sort artičok. Gojenje artičok se deli na tiste, ki se uporabljajo v prehranske namene in na tiste, ki se uporabljajo v industriji. Artičoke za prehrano se nato delijo na:

- (1) velike zelene, kamor sodijo sorte: »Vert de Laon« (Francija), »Camus de Bretagne« (Francija), »Castel« (Francija), »Green Globe« (ZDA, Južna Afrika);
- (2) zelene srednje velikosti, kot so sorte: »Verde Palermo« (Sicilija), »Blanca de Tudela«

(Španija), »Argentina« (Čile), »Española« (Čile), »Blanc d'Oran« (Alžirija), »Sakiz« (Turčija), »Bayrampasha« (Turčija);

(3) velike vijolične, kot sta sorti: »Romanesco« (Italija) in »C3« (Italija);

(4) vijolične srednje velikosti, kot so sorte: »Violet de Provence« (Francija), »Brindisino« (Sicilija), »Catanese« (Sicilija), »Niscemese« (Sicilija), »Violet d'Algerie« (Alžirija), »Baladi« (Egipt), »Ñato« (Argentinijska), »Violetta di Chioggia« (Italija);

(5) bodičaste, kamor sodita sorti: »Spinoso Sardo e Ingauno« (Sardinia), »Criolla« (Peru).

Zaradi večjih površin nasadov se za industrijsko razmnoževanje uporabljajo semena. Med sortami za uporabo v industrijske namene prevladujejo sorte »Imperial Star«, »Symphony« in »Concerto« (History of vegetables- Artichoke history).

Na slovenskem trgu se kot sadike ali plodovi večinoma pojavljajo naslednje sorte:

1. Sorta »Romanesco« oz. »Chianti« (Slika 6): zanjo je značilna velikost cveta, ki doseže tudi do 14 cm v premeru. Zunanji listi so zelo veliki, mesnati in imajo rjav odtenek. Artičoka »Romanesco« je klasična italijanska sorta. Pri nas se na trgovinskih policah pojavlja že marca.



Slika 6: Sorta »Romanesco« (http://www.ortomio.it/le_piante_da_orto_varieta.php?IDVar=96&IDSpe=21).

2. Sorta »Tema F1« (Slika 7): zanjo je značilno dvakratno cvetenje, spomladi in jeseni. Cvet je zelo močno vijolične barve, okus je manj grenek. Sorta je malo poznana, ampak bi bila zelo dobra tržna niša prav zaradi dvakratnega cvetenja. Na policah semenarn se ta sorta pojavlja komaj pozno poleti do zgodaj jeseni.



Slika 7: Sorta »Tema F1« (http://www.ortomio.it/le_piante_da_orto_varieta.php?IDVar=585&IDSpe=21).

3. Sorta, tradicionalna v Slovenski Istri (Slika 8): cvetovi so manjši in, zelo močne vijolične barve. Rastlina je zelo trpežna. Pojavlja se na obrobjih njiv in sadovnjakov ter na brežinah, ker zelo dobro preprečuje erozijo zemlje. Sadike je najlažje pridobiti z deljenjem matične rastline, saj tako dobimo klon matične rastline. Pridelovalcev sadik te sorte je v Sloveniji zelo malo, zato je tudi ta sorta neizkoriščena tržna niša.



Slika 8: Sorta, tradicionalna v Slovenski Istri (<http://www.rtv slo.si/tureavanture/kulinarika/foto-bi-poskusili-sladoled-iz-articok/309642>).

Za zasaditev novih nasadov v Slovenski Istri je pomembno poznati tako zgodovino artičoke kot njeno genetiko, za katero je pomembno pravilno vzorčenje rastlinskega materiala za izolacijo kakovostne DNA.

2.4 Načini, shranjevanja rastlinskega materiala za uspešno izolacijo DNA

Količina in kakovost izolirane DNA sta v veliki meri odvisni od izhodnega rastlinskega materiala. Za izolacijo DNA iz rastlin je najprimernejše uporabiti mlad in svež material, ki ga je treba nabrati tik pred izolacijo. Težave se lahko pojavijo, kadar rastlinske vrste, ki jih želimo raziskovati, rastejo na oddaljenih območjih in se mora rastlinski material hraniti nekaj dni ali celo tednov, preden pride do laboratorija. Med načine shranjevanja rastlinskega materiala sodijo:

a) Hlajenje, zamrzovanje in liofilizacija

Za sveže tkivo, ki ga je treba shraniti le za kratek čas, se priporoča hlajenje, ni pa ga treba zamrzniti. V primeru daljšega obdobja shranjevanja se lahko rastlinsko tkivo s pomočjo tekočega dušika neposredno zamrzne in nato hrani na -80 °C ali liofilizira (Weising in sod., 2005).

b) Sušenje

Kot povzemajo Weising in sod. (2005), so hitro sušenje rastlinskega materiala s pomočjo izsuševalcev (kot je npr. silikagel) prvič predlagali Liston in sod. (1990) ter Chase in Hills (1991). Pri tem načinu shranjevanja se manjši koščki rastlinskega materiala ali celo celi listi shranijo v plastične vrečke skupaj z določeno količino sušilnega sredstva. Tako shranjen material je primeren tudi za transport. Ta metoda se velikokrat uporablja za shranjevanje rastlinskega materiala na terenu. Za nekatere rastlinske vrste je primerno tudi sušenje na zraku na sobni temperaturi. Težavna, a pogosto uspešna izolacija DNA iz herbarijskih vzorcev dokazuje, da počasno sušenje na zraku ohranja zadostno količino dednega materiala (Weising in sod., 2005).

c) Kemijsko konzerviranje

Številne študije so sprva dokazovale, da so etanol, metanol, glicerol, formaldehid in druga organska topila neprimerni za shranjevanje rastlinskega tkiva. Weising in sod. (2005) so povzeli po avtorjih Doyle in Dickson (1987), da je rezultat tovrstnega shranjevanja lahko degradacija DNA v nekaj dneh. Weising in sod. (2005) povzemajo po Flournoy in sod. (1996), da je lahko metoda shranjevanja rastlinskega materiala uspešna, če se ekstrakcijskemu pufru doda še proteinaze. V raztopini etanola so 11 mesecev hranili liste špinače, brina in brokolija ter jim je kljub temu uspelo izolirati velike količine DNA. Avtorji menijo, da prisotnost etanola povzroči nastanek netopnih kompleksov DNA in denaturiranih beljakovin (zlasti histonov), ki se v klasičnih postopkih izolacije DNA nenamerno zavržejo skupaj z drugimi beljakovinami in celičnimi ostanki. Dodatek proteinaze v ekstrakcijski pufer pa najverjetneje prepreči tvorbo kompleksov DNA-beljakovine in s tem sprosti DNA. Drugi, zelo uspešen način kemijskega shranjevanja rastlinskega materiala, so Weising in sod. (2005) povzeli po delu avtorja Rogstad (1992), ki je opisal shranjevanje majhnih koščkov rastlinskega tkiva v nasičeni, visoko viskozni raztopini NaCl-CTAB.

2.5 Sekundarni metaboliti

Avtorja Thaler in Bajc (2013) sta po Fraenkel (1959) povzela definicijo, da so sekundarni metaboliti vse tiste organske spojine, ki niso neposredno vpletene v rast, razvoj in razmnoževanje organizma ter se pri rastlinah delijo v tri večje skupine glede na kemijsko sestavo: terpenoidi, fenoli in dušik vsebujoče spojine. Pogosto imajo izjemne fiziološke aktivnosti (Keller in sod., 2005), nimajo pa splošno prepoznane neposredne vloge v procesih fotosinteze, dihanja, transporta raztopin, premestitev, sinteze beljakovin, asimilacije hranil, diferenciacije ali izgradnje ogljikovih hidratov in lipidov (Teiz in Zeiger, 2002). V rastlinah so večinoma v vlogi obrambnih (pred rastlinojedi, mikrobi, virusi ali drugimi rastlinami) ali signalnih molekul (za privabljanje opraševalcev in raznašalcev semen). Sekundarni metaboliti so pomembni za preživetje in razmnoževanje rastlin ter tako predstavljajo prilagoditvene značilnosti, ki so bile med evolucijo izpostavljene naravni selekciji (Wink, 2003).

2.5.1 Vsebnost sekundarnih metabolitov artičoke

Znano je, da imajo artičoke veliko pozitivnih učinkov na zdravje ljudi, zato so različne sorte gojili že v starem Egiptu. V 16. stol. je veljala za afrodisiak, v 18. stol. pa so jo uporabljali za zdravljenje zlatenice in žolčnih bolezni. Sodobnejše študije so pokazale, da vsebujejo artičoke veliko polifenolov, med njimi mono- in dikofenolokinske kisline, flavonoidov (Fratanni in sod., 2007; Lattanzio in sod., 2009; Lombardo in sod., 2010; Pandino in sod., 2013; Negro in sod., 2012) ter največ derivatov klorogenske kisline (Lattanzio in sod., 2009). Med flavonoidi naj bi prevladovala apigenin in luteolin ter njuni glikozidi (Lombardo in sod., 2010; Pandino in sod., 2013; Negro in sod., 2012). Vse te spojine imajo močno antioksidativno sposobnost in ščitijo nizko gostotne lipoproteine pred oksidacijo (Lattanzio in sod., 2009). Zaradi vsebnosti različnih sekundarnih metabolitov pripisujejo artičokam anti-rakotvoren učinek, delujejo antibakterijsko, antioksidativno in znižujejo raven holesterola ter uravnavajo nivo krvnega sladkorja (Saénz Rodriguez in sod., 2002; Coinu in sod., 2007; Rondanelli in sod., 2011; Fantini in sod., 2011).

2.5.2 Vpliv sekundarnih metabolitov na uspešnost izolacije DNA

Po avtorju Rossen in sod. (1992) sta Thaler in Bajc (2013) povzela, da so pri delu z DNA prav sekundarni metaboliti tisti, ki lahko povzročajo težave. Sekundarni metaboliti vplivajo na uspešno izolacijo DNA in nadaljnje pomnoževanje nukleinskih kislin v verižni reakciji s polimerazo (PCR, angl. Polymerase Chain Reaction). Po navadi delujejo na eno ali več od treh ključnih točk v postopku od izolacije DNA do reakcije PCR, saj lahko:

- ovirajo lizo celičnih membran, ki je potrebna za sprostitvev nukleinskih kislin,
- povzročajo razpad nukleinskih kislin,
- povzročajo koprecipitacijo nukleinskih kislin in inhibitorjev,
- otežujejo izolacijo,

– ovirajo delovanje polimeraze pri pomnoževanju tarčnih nukleinskih kislin.

Poleg tega Thaler in Bajc (2013) po številnih avtorjih povzemata, da so v rastlinskem tkivu različni polifenoli: tanini (Do in Adams, 1991; Demeke in Adams, 1992; Wilson, 1997), klorogenska kislina (Singh in sod., 1998; Rohn in sod., 2002) in kavna kislina (Rohn in sod., 2002), ki se vežejo na DNA oz. jo lahko razgrajujejo, denaturirajo polimerazo in ovirajo delovanje polimeraze, ker se lahko vežejo na njeno aktivno mesto.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 Rastlinski material

3.1.1 Vzorčenje rastlinskega materiala

Vzorčenje rastlinskega materiala je potekalo na različnih lokacijah v Slovenski Istri. Prvi termin vzorčenja je bil 13. 6. 2016; nabrali smo 26 vzorcev iz različnih rastlin artičok na dveh lokacijah v Sv. Petru (»njiva Kostanjevica« in »Matjaž doma«). Na lokaciji »Matjaž doma« smo vzorčili vzorce z oznako od ADM16 do ADM22 in tudi dve matični rastlini (ASD 25 in 26) ter njune klone (ASD 23 in 24), ki naj bi domnevno pripadale sorti, značilni za Slovensko Istro (Preglednica 2).

Tabela 2: Delovna imena in oznake vzorcev artičok, lokacije vzorčenja ter koordinate prvega vzorčenja.

Delovno ime	Oznaka vzorca	Lokacija	Koordinate
Artičoka »Kostanjevica«	od AK1 do AK15	Sv. Peter	45,463080°–13,669722°
Artičoka »Matjaž doma«	od ADM16 do ADM 22; od ASD23 do ASD26	Sv. Peter	45,462256°–13,674292°

Vzorčenje listov artičok smo ponovili 21. 10. 2016 na drugih lokacijah. Tokrat smo vzorčili na lokacijah: Sv. Peter, Nožed, Šared, Dragonja in Lucan. Vzorčili smo 30 vzorcev na treh lokacijah: v Sv. Petru, na dveh lokacijah v Dragonji, na dveh lokacijah v Lucanu in v Šaredu ter Nožedu po eno lokacijo (Preglednica 3).

Tabela 3: Delovna imena in oznake vzorcev artičok, lokacije vzorčenja ter koordinate drugega vzorčenja.

Delovno ime	Oznaka vzorca	Lokacija	Koordinate
Mateja doma	A27	Lucan	45,511262°–13,617526°
Matjaž doma	A28	Sv. Peter	45,462256°–13,674292°
Mario Koščica	A29–A34	Dragonja	45,455125°–13,658401°
Roman Bažec	A35, A36	Dragonja	45,456393°–13,659607°
Kostanjevica	A37–A43	Sv. Peter	45,46,3080°–13,669722°
Jani Forte	A44	Sv. Peter	45,459962°–13,683709°
Nika Šared	A45–A49	Šared	45,510262°–13,658049°

Tomi Nožed	A50–A52	Nožed	45,49,5657°–13,623309°
Jan Vivoda	A53, A54	Lucan	45,511486°–13,617777°

3.1.2 Shranjevanje rastlinskega materiala na dva načina

Pri prvem terminu vzorčenja (13. 6. 2016) smo pri vsaki rastlini izbrali od dva do tri liste (cca. 20 cm dolžine in 4 cm širine) in jih shranjevali v prozornih PVC-vrečkah. Do izolacije DNA smo vzorce tri dni hranili v hladilniku na 4 °C.

Drugo vzorčenje je potekalo 21. 10. 2016, rastlinski material pa smo, namesto v PVC-vrečke, shranili v posebej pripravljen pufer NaCl-CTAB. Za pripravo pufra smo uporabili NaCl in detergent CTAB (cetil-trimetil-amonijev bromid). Najprej smo pripravili nasičeno raztopino NaCl in nato počasi dodajali CTAB, tako da smo dobili viskozno raztopino, ki pa ni smela biti želatinozna (Rogstad, 1992). Dvo mililitrske centrifugirke smo napolnili z 1,5 ml pripravljenega pufra NaCl-CTAB. Na terenu smo s skalpelom odrezali košček rastlinskega tkiva, dolgega od 1,5 do 2 cm in širokega 0,5 cm ter ga prenesli v centrifugirko s pufrom in po potrebi dolili pufer, da je le-ta segal do vrha centrifugirke. Vzorci so bili v celoti prekrti s pufrom in tako pripravljene smo na terenu shranjevali v temni hladilni torbi. Nato smo jih prenesli v laboratorij in do nadaljnjih analiz shranili v hladilniku na 4 °C.

3.2 Izolacija celokupne DNA

Za izolacijo DNA iz listov artičoke smo uporabili izolacijski protokol CTAB-PVP, ki so ga objavili Japelaghi in sod. (2011). Izolacija DNA iz listov je bila enotna za vse vzorce artičok (13. 6. 2016 in 21. 10. 2016) in je potekala po naslednjih korakih:



Slika 9: Izolacija DNA (Foto: M. Sakelšak).

1. Najprej smo pripravili ekstrakcijski pufer CTAB-PVP in ga 20–30 min segrevali na 65 °C v vodni kopeli. Tik pred uporabo smo mu dodali 2 % β -merkaptotanol in med pripravo vzorcev pufer hranili na toplem v vodni kopeli.
2. Košček rastlinskega tkiva smo zdrobili v terilnici in mu dodali 1 ml pufra CTAB-PVP ter vse skupaj prenesli v 2 ml centrifugirko in vzorce 20–30 min inkubirali na 65 °C. Vsakih 5 min smo vzorce dobro premešali.
3. Vzorce smo ohladili na sobni temperaturi in dodali enak volumen fenol-kloroform-izoamil alkohola (25 : 24 : 1). Nastalo zmes smo dobro premešali, da je nastala homogena suspenzija in nato 10 min centrifugirali na 14.000 rpm.
4. Vodno fazo smo prenesli v svežo centrifugirko in ponovno dodali enak volumen fenol-kloroform-izoamil alkohola, dobro premešali ter ponovno centrifugirali 5 min na 14000 rpm.
5. V svežo centrifugirko smo odpipetirali vodno fazo in dodali 10 % volumna vodne faze (~70 μ l) 3 M NaCl in enak volumen vodne faze ledeno hladnega izopropanola (~700 μ l). Vse skupaj smo dobro premešali in shranili za 30 min na -80 °C.
6. Nato smo vzorce 30 min centrifugirali na 14.000 rpm, da se je iz vodne faze izločila DNA. Preostalo tekočino smo odlili in DNA sprali s 70 % etanolom. DNA smo nato posušili in raztopili v pufru TE.

3.3 Merjenje koncentracije DNA in preverjanje uspešnosti pomnoževanja DNA

Za merjenje koncentracije DNA smo uporabili Qubit™ fluorometer in reagente iz kompleta Qubit dsDNA BR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific). Pred meritvijo smo najprej pripravili delovno raztopino, ki je vsebovala pufer in fluorescentno barvilo. Za vsak vzorec smo potrebovali 199 μ l pufra in 1 μ l fluorescentnega barvila:

- fluorescentno barvilo = 1 μ l barvila x (število vzorcev + 2 standarda)
- pufer = 199 μ l pufra x (število vzorcev + 2 standarda)

Za kalibracijo aparature smo pripravili dva standarda. Standard 1 ni vseboval DNA, standard 2 pa je vseboval 100 ng/ μ l DNA:

- Standard 1 = 190 μ l delovna raztopine + 10 μ l standarda 1 (0 ng/ μ l DNA)
- Standard 2 = 190 μ l delovna raztopine + 10 μ l standarda 2 (100 ng/ μ l DNA)

Za vzorce smo v posebne centrifugirke odpipetirali 199 μ l delovne raztopine in 1 μ l izolirane DNA.

Sledilo je merjenje koncentracije DNA s Qubit™ fluorometrom: aparat smo prižgali in najprej s tipko »GO« izbrali opcijo »Quant-it dsDNA, BR«. Nato smo izbrali opcijo »opravi novo kalibracijo«. V aparat smo vstavili standard 1 in pritisnili »GO« ter enako ponovili za standard 2. Sledilo je merjenje vzorcev. Vstavili smo prvi vzorec in pritisnili »GO« ter nato določili volumen DNA, ki smo jo dodali delovni raztopini, da nam je aparat preračunal končno koncentracijo DNA v vzorcu.

Za določitev čistosti DNA smo s spektrofotometrom Epoch in Take3 mikroploščo (BioTek), ki omogoča meritve v volumnu 2 µl, določili razmerje A260/A280.

Na podlagi izmerjenih koncentracij DNA smo vse vzorce razredčili na delovno koncentracijo 10 ng/µl. Pri tako pripravljenih vzorcih smo nato preverili uspešnost pomnoževanja izolirane DNA. Ta del analize je izvedla raziskovalna skupina Oddelka za aplikativno naravoslovje (Fakulteta za matematiko, naravoslovje in informacijske tehnologije, Univerza na Primorskem). Za pomnoževanje DNA artičok so uporabili 12 mikrosatelitskih markerjev, ki so jih razvile in objavile različne raziskovalne skupine (Acquadro in sod., 2005; Acquadro in sod., 2009; Scaglione in sod., 2009). Pomnoževanje DNA je potekalo v cikličnem termostatu Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Singapur). Sledila je kapilarna elektroforeza na sekvenatorju ABI 3130 (Applied Biosystems, Hitachi High-Technologies Corporation, Tokio, Japonska) in analiza podatkov z računalniškim programom Gene Mapper v. 4.1 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Foster City, Kanada, ZDA).

4 REZULTATI IN DISKUSIJA

Artičoko poznamo še iz rimskih časov, saj je bila takrat zelo cenjena rastlina. Danes se povpraševanje po artičoki iz leta v leto povečuje (De Candolle, 1890). Vse bolj postaja zanimiva v kulinariki, zaradi različnih pozitivnih učinkov pa tudi v medicini. Pri artičoki lahko uporabljamo vse dele rastline. V kulinariki je najbolj cenjen cvet. Liste uporabljajo za izdelovanje različnih čajnih mešanic in za izdelavo pijače Cynar (Rodriguez in sod., 2002). V Slovenski Istri je veliko možnosti za gojenje te rastline, vendar niso izkoriščene. Gojenje artičoke ni posebej zahtevno in zelo lepo uspeva na istrskih terasah, ker potrebuje veliko sonca in nekoliko nagnjen teren, ki ne zadržuje vode. Danes so v Slovenski Istri manjši nasadi artičok, med sortami pa prevladuje »Strunjanska artičoka«. Na slovenskem tržišču so na izbiro tudi druge zanimive sorte, plodovi za uživanje ali sadike artičok. V Slovenski Istri do sedaj še niso natančneje raziskovali artičok oz. njihove sortne strukture. Za proučevanje raznolikosti sort je zelo zanesljivo orodje identifikacija sort na podlagi analize DNA. Če želimo analizirati DNA, mora biti le-ta kakovostna, za to pa sta prvi pogoj primerno vzorčenje rastlinskega materiala in nadaljnji postopek izolacije DNA. Pomembno je, da je rastlinski material čim manj oksidiran in da vsebuje minimalne

količine sekundarnih metabolitov, saj ti otežujejo izolacijo ter vplivajo na uspešnost pomnoževanja DNA. Za shranjevanje rastlinskega materiala na terenu obstaja veliko tehnik, najbolj uporabljene so zamrzovanje in liofilizacija, sušenje s sušilnimi sredstvi ter shranjevanje v predpripravljenih pufrih (Bhattacharje in sod., 2009).

4.1 Optimizacija vzorčenja rastlinskega materiala

Pri prvem načinu vzorčenja smo liste artičoke shranili v PVC-vrečke in jih do nadaljnje izolacije DNA tri dni pustili v hladilniku na 4 °C. Po treh dneh so bili listi artičok še vedno zelene barve, le na mestih, kjer smo jih odtrgali, je rastlinsko tkivo porjavelo. Listi artičok v PVC-vrečkah niso bili popolnoma zaščiteni pred zrakom, zato je na ranjenih delih prišlo do oksidacije. Do tako hitre oksidacije lahko pride zaradi vsebnosti polifenolov, encimov, polifenol oksidaze in peroksidaze (Thaler in Bajc, 2013). Ko so poškodovane celice tkiva izpostavljene kisiku, pride do kemijske reakcije, ki jo opazimo kot spremembo barve na ranjenih listih (Rogstad, 1992). Pri izolaciji iz poškodovanega tkiva smo po precipitaciji DNA opazili, da je bila le-ta pri vseh vzorcih rjavkaste barve, namesto belo-prozorne, kot je značilno za čisto DNA. Vzrok za obarvanje DNA so najverjetneje produkti oksidiranih fenolnih spojin. Fenolne spojine so v rastlinah zelo razširjene, najdemo jih predvsem v epidermalnih tkivih in so eden ključnih mehanizmov za odpornost proti boleznim in škodljivcem.

Pri drugem načinu vzorčenja smo liste artičok na terenu takoj shranili v centrifugirke in liste v celoti prelili s predhodno pripravljenim pufrom NaCl-CTAB. Pufer je preprečil stik vzorcev s kisikom, zato smo lahko tako zaščitene vzorce prenesli v laboratorij in jih do nadaljnjih analiz shranili v hladilniku na 4 °C. Ob začetku izolacije so bili vzorčeni listi artičok sivkasto zelene barve, taki kot na dan vzorčenja na terenu. Po precipitaciji DNA pa smo dobili belo-prozorne pelete DNA.

4.2 Primerjava količine DNA v izoliranih vzorcih in uspešnost pomnoževanja

Iz listov artičok, ki smo jih na terenu shranili na dva različna načina (v vrečkah PVC oz. v pufru NaCl-CTAB), smo izolirali DNA in nato vzorcem izmerili koncentracijo. Na podlagi primerjave rezultatov smo ugotovili, da v količini izolirane DNA ni bilo večjih razlik glede na način shranjevanja rastlinskega materiala. Pri prvem načinu vzorčenja (vrečke PVC) je bila količina DNA od 3,98 ng do 89,36 ng in je v povprečju znašala 2,05 ng. Pri drugem načinu vzorčenja (NaCl-CTAB pufer) pa so bile vrednosti količine DNA od 0,67 ng do 28,56 ng, v povprečju 7,76 ng (Preglednica 4).

Na osnovi razmerja A260/A280 smo ugotovili, da izolirna DNA po prvem načinu vzorčenju in DNA, izolirana po drugem načinu vzorčenju, ni vsebovala večjih količin polisaharidov in beljakovin.

Tabela 4: Količine DNA po prvem in drugem načinu vzorčenja (np. – ni podatka).

PRVI NAČIN VZORČENJA			DRUGI NAČIN VZORČENJA		
Oznaka vzorca	Količina DNA (µg)	A260/A280	Oznaka vzorca	Količina DNA (µg)	A260/A280
AK 1	13,36	2,12	A 27	2,53	2,13
AK 2	9,36	2,10	A 28	0,67	np.
AK 3	6,82	2,05	A 29	3,99	2,12
AK 4	6,06	2,11	A 30	4,05	2,14
AK 5	10,48	2,11	A 31	22,68	1,98
AK 6	89,36	2,13	A 32	6,06	2,14
AK 7	9,76	2,12	A 33	5,04	2,11
AK 8	9,20	2,16	A 34	9,00	2,12
AK 9	12,88	2,07	A 35	6,18	2,11
AK 10	17,44	2,12	A 36	28,56	2,00
AK 11	9,04	2,09	A 37	4,08	2,07
AK 12	9,52	2,10	A 38	13,20	2,04
AK 13	30,08	1,71	A 39	4,95	2,17
AK 14	14,48	2,08	A 40	6,54	2,16
AK 15	11,12	2,05	A 41	1,81	2,21
ADM 16	12,40	2,13	A 42	10,74	1,99
ADM 17	17,12	2,10	A 43	5,16	2,20
ADM 18	19,20	2,01	A 44	9,12	2,03
ADM 19	29,44	2,13	A 45	9,90	2,10
ADM 20	27,92	2,13	A 46	4,38	2,18
ADM 21	68,88	2,12	A 47	2,45	np.
ADM 22	75,52	1,99	A 48	12,96	2,02
ASD 23	19,76	1,46	A 49	17,28	2,14
ASD 24	29,36	1,94	A 50	10,44	2,08
ASD 25	3,98	2,14	A 51	7,92	2,16
ASD 26	4,15	1,98	A 52	3,33	2,19
			A 53	4,02	2,16
			A 54	1,08	2,21
			A 55	6,12	2,10
			A 56	8,76	2,13

Zadostna količina DNA še ne pomeni nujno uspešnega pomnoževanja DNA v verižni reakciji s polimerazo (angl. Polymerase Chain Reaction). Zato smo v nadaljevanju želeli preveriti uspešnost pomnoževanja pridobljene DNA z mikrosatelitskimi markerji, kar je opravila raziskovalna skupina Oddelka za aplikativno naravoslovje UP FAMNIT. Ugotovili so, da je bilo pomnoževanje DNA z mikrosatelitskimi markerji uspešno samo pri vzorcih, ki smo jih vzorčili v drugem terminu in rastlinski material shranili v pufru NaCl-CTAB. V pufru je bil rastlinski material zaščiten pred oksidacijo, ki lahko vpliva na kakovost izolirane DNA. Visoke koncentracije soli v pufru delno dehidrirajo rastlinsko tkivo, detergent CTAB pa tvori komplekse z nukleinskimi kislinami, beljakovinami in ogljikovimi hidrati, s čimer se upočasnijo procesi degradacije (Almakarem in sod., 2012). Poleg tega so rastline v pufru NaCl-CTAB zaščitene tudi pred mikroorganizmi, ker je za detergent CTAB značilno baktericidno delovanje, kar pomeni, da uničuje bakterije (Thomson, 2002). V študiji Bhattacharjee in sod. (2009) so vzorce shranjevali na -20 °C za en teden, dva tedna in en mesec. Enako so naredili z vzorci, ki so jih shranili v puferski raztopini NaCl-CTAB. V rezultatih poročajo, da dolgoročno shranjevanje rastlinskega materiala na nizkih temperaturah zelo vpliva na količino in kakovost DNA. V študiji so tudi dokazali, da je shranjevanje rastlinskega materiala v pufru NaCl-CTAB primernejše v primerjavi s shranjevanjem brez pufra. Primerjava je pokazala, da jim je iz rastlinskega materiala, shranjenega v pufru, uspelo izolirati bolj kakovostno DNA kot v drugih primerih.

5 ZAKLJUČEK

V zaključni nalogi smo ugotovili, da lahko različni načini shranjevanja rastlinskega materiala vplivajo na kakovost izolirane DNA. Za liste artičoke, ki so podvrženi hitri oksidaciji, se je izkazalo, da je shranjevanje v pufru NaCl-CTAB primernejše kot pa v vrečkah PVC. Ko smo primerjali količino in čistost DNA pri prvem in drugem načinu vzorčenja, nismo ugotovili bistvenih razlik, vendar je bilo pomnoževanje DNA artičok z mikrosatelitskimi markerji uspešno samo v primeru, ko smo liste artičok shranili v pufru NaCl-CTAB. Zaključimo lahko, da sta način vzorčenja na terenu in nadaljnje hranjenje rastlinskega materiala izjemno pomembna za pridobitev kakovostne rastlinske DNA, kar je ključnega pomena za uspešno pomnoževanje DNA in genetske analize. V okviru zaključne naloge nam je uspelo optimizirati način vzorčenja in shranjevanja listov artičok. S tem smo pridobili izhodiščni material DNA za nadaljnje raziskave artičoke na območju Slovenske Istre, kar bo lahko pomembno prispevalo k poznavanju sortne strukture artičoke in posledično k širjenju nasadov z artičokami, ki imajo v Slovenski Istri velik proizvodni potencial.

6 VIRI IN LITERATURA

Acquadro A., Lanteri S., Scaglione D., Arens P., Vosman B., Portis E. 2009. Genetic mapping and annotation of genomic microsatellites isolated from globe artichoke. *Theor Appl Genet*, 118(8): 1573–1587

Acquadro A., Portis E., Lanteri S. 2003. Isolation of microsatellite loci in artichoke (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus*). *Molecular Ecology Notes*, 3: 37–39

Acquadro A., Portis E., Lee D., Donini P., Lanteri S. 2005. Development and characterization of microsatellite markers in *Cynara cardunculus* L. *Genome*, 48: 217–225

Almakarem A. S. A., Heilman K. L., Conger H. L., Shtarkman Y. M., Rogers S. O. 2012. Extraction of DNA from plant and fungus tissues *in situ*. *BMC Research Notes*, 5: 266

Bhattacharjee R., Ferguson M., Gedil M., Dumet D., Ingelbrecht I. 2009. Field collection, preservation and large scale DNA extraction procedures for cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *African Journal of Biotechnology*, 8 (15): 3424–3430

Chateline. <http://www.chatelaine.com/recipes/chatelaine-kitchen/how-to-eat-an-artichoke/?dfix=dfix> (Datum dostopa: 6. 2. 2018)

Ciancolinia A., Alignanc M., Augusto Pagnottab M., Miquelc J., Vilaremc G., Crinòa P., 2013. Morphological characterization, biomass and pharmaceutical compounds in Italian globe artichoke genotypes. *Industrial Crops and Products*, 49: 326–333

Comino C., Lanteri S., Portis E., Acquadro A., Romani A., Hehn A., Larbat R., Bourgaud F., 2007. Isolation and functional characterization of a cDNA coding a hydroxycinnamoyltransferase involved in phenylpropanoid biosynthesis in *Cynara cardunculus* L. *Industrial Crops and Products*, BMC Plant Biology, 7: 14

Demeke T., Adams R. P. 1992. The effects of plant polysaccharides and buffer additives on PCR. *Biotechniques*, 12: 332–334

Do N., Adams R. P. 1991. A simple technique for removing plant polysaccharide contaminants from DNA. *BioTechniques*, 10(2): 162–166

Dreamstime. <https://www.dreamstime.com/royalty-free-stock-photos-artichoke-seed-close-view-his-fluffy-flying-instruments-image33398678> (Datum dostopa: 10. 3. 2018)

Food and agriculture organization of the United Nations.
<http://www.fao.org/faostat/en/#home> (Datum dostopa: 19. 4. 2018)

Food and agriculture organization of the United Nations. <http://www.fao.org/traditional/crops/cardoon/en/> (Datum dostopa: 11. 3. 2018)

Francaviglia R., Bruno A., Falcucci M., Farina R., Renzi G., Russo D. E., Sepe L., Neri U. 2016. Yields and quality of *Cynara cardunculus* L. wild and cultivated cardoon genotypes. *Europ. J. Agronomy*, 72: 10–19

Healthbenefits. <https://www.healthbenefitstimes.com/artichoke/>
(Datum dostopa: 11. 3. 2018)

History of vegetables- Artichoke history - different artichoke varieties
(<http://www.vegetablefacts.net/vegetable-history/artichoke-history/>)
(Datum dostopa: 11. 3. 2018)

Japelaghi R. H., Haddad R., Garoosi G. A. 2011. Rapid and Efficient Isolation of High Quality Nucleic Acids from Plant Tissues Rich in Polyphenols and Polysaccharides. *Mol Biotechnol*, 49: 129–137

Martin E., Cointry E., 2007. Genetic Diversity in *Cynara cardunculus* Determined by Sequence-related Amplified Polymorphism Markers *J Amer Soc Hort. Sci.* 132(2): 208–212

Orto mio. http://www.ortomio.it/le_piante_da_orto_varieta.php?IDVar=96&IDSpe=21
(Datum dostopa: 17. 5. 2018)

Orto mio. http://www.ortomio.it/le_piante_da_orto_varieta.php?IDVar=585&IDSpe=21
(Datum dostopa: 23. 4. 2018)

Raua D., Rodriguez M., Rapposellic E., Murgiala M. L., Papad R., Browne A. H. D., Attene G. 2016. Spatial genetic structure in wild cardoon, the ancestor of cultivated globe artichoke: Limited gene flow, fragmentation and population history. *Plant Science*, 253: 194–205

Rohn S., Rawel H. M., Kroll J. 2002. Inhibitory effects of plant phenols on the activity of selected enzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(12): 3566–3571

RTV SLO. <http://www.rtvsllo.si/tureavanture/kulinarika/foto-bi-poskusili-sladoled-iz-articok/309642> (Datum dostopa: 18. 5. 2018)

Scaglione D., Acquadro A., Portis E., Taylor C. A., Lanteri S., Knapp S. J. 2009. Ontology and diversity of transcript-associated microsatellites mined from a globe artichoke EST database. *BMC Genomics*, 10: 454

Scaglione D., Acquadro A., Portis E., Tirone M., Knapp J S., Lanteri S. 2012. RAD tag sequencing as a source of SNP markers in *Cynara cardunculus* L. *BMC Genomics*, 13: 3

Singh R. P., Singh M., King R. R. 1998. Use of citric acid for neutralizing polymerase chain reaction inhibition by chlorogenic acid in potato extracts. *Journal of virological methods*, 74(2): 231–235

Sonnante G., Morgese A., Sonnante G., Pignone D. 2011. The Evolution of *Cynara*: Diversity and Domestication of Artichoke and Cardoon. *Acta Hort.*, 942

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

Steven H. Rogstad, 1992. Saturated NaCl-CTAB Solution as a Means of Field Preservation of Leaves for DNA Analyses. *Taxon*, 41(4): 701–708

Thaler N., Bajc M. 2013. Effect of fungal and plant secondary metabolites on Polimerase chain reaction (PCR). *Acta Silvae et Ligni*, 100: 25–40

The spruce. <https://www.thespruce.com/tips-for-growing-artichokes-1403455> (Datum dostopa: 17. 5. 2018)

Thomson J. A. 2002. An improved non-cryogenic transport and storage preservative facilitating DNA extraction from 'difficult' plants collected at remote sites. *Telopea* 9(4): 755–760

Weising K., Nybom H., Wolff K., Kahl G. 2005. DNA Fingerprinting in Plants. Principles, Methods and Applications, Second Edition. Taylor & Francis Group, 86–87

Wilson I. G. 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(10): 3741–3751

