

# MICROPROPAGACION *IN VITRO* DE ALCACHOFA (*Cynara scolymus* L.) A PARTIR DE MERISTEMAS APICALES<sup>1</sup>

## *In vitro* culture of shoot meristems of artichoke (*Cynara scolymus* L.)

Annemarie Kamp H.<sup>2</sup>, Mónica Castro V.<sup>3</sup> y Carlos Muñoz S.<sup>4</sup>

### SUMMARY

In order to establish an efficient method for artichoke (*Cynara scolymus*) micropropagation, tissue culture media reported in the literature for the establishment, proliferation, and rooting of this species were evaluated. The effect of extracting the meristems in september, october or november on survival and subsequent growth of the explants, was also tested.

All experiments were conducted at the Micropropagation Laboratory of the Faculty of Agronomy of the Catholic University of Valparaiso (Chile). Methods for meristem culture were those described elsewhere for other species.

Results demonstrated that rooted plantlets can be obtained in 6 month, starting with apical meristems, 0.5 cm in length, excised from basal shoots arising from 2- year-old field plants. Explanting meristems in september, october or november did not affect their survival in culture, nor was subsequent growth, contamination or rooting of the explants affected.

The best medium for initiation of cultures was that described by Pecaut and Martin (INRA, no publicado). For shoot proliferation, media reported by Ancora and others (1981), and Pecaut and Martin (INRA, non published data) resulted equally adequated, with multiplication rates ranging from 6.0-6.9 after 8 weeks in culture.

Rooting was not only affected by the rooting medium used, but also by the medium used during the proliferation phase, with the medium described by Pecaut and Martin being the best in promoting root formation. Rooting media containing NAA in concentrations ranging from 2-20 mg/L were the best for root formation.

Endogenous contamination was the main problem detected for the micropropagation of this species, because it caused rapid explant deterioration and a severe decrease in the overall vigor of the plantlets.

**Key words:** tissue culture, micropropagation.

### INTRODUCCION

El cultivo de la alcachofa se extiende desde Copiapó a Valdivia, sin embargo, la zona de mayor producción se concentra en la V, VI y Región Metropolitana. Existen tradicionalmente cuatro tipos de alcachofas: la Chilena, la Argentina, la Francesa y la Green Globe. La tipo

Francesa, se caracteriza por poseer un receptáculo de mayor tamaño y una menor fibrosidad en sus brácteas.

Su cultivo está actualmente limitado principalmente por una enfermedad fungosa causada por *Verticillium*, cuya incidencia se intensifica debido a que la especie se propaga vegetativamente. Por otro lado, su cultivo es generalmente anual o bianual, por lo que se requieren hijuelos todos los años o cada dos años. Estos, por lo general, se obtienen directamente de plantas adultas seleccionadas por su sanidad y vigor. Desgraciadamente, a pesar de las precauciones tomadas durante la selección de plantas, existe el riesgo de propagar plantas sanitariamente deficientes. Una alternativa al método de propagación tradicional lo constituye la micropropagación *in vitro*, la cual garantiza un mayor grado de sanidad.

<sup>1</sup>Recepción de originales: 5 de julio de 1990.

Parte de la tesis de grado presentada por la autora principal a la Facultad de Agronomía de la Universidad Católica de Valparaiso, para optar al título de Ingeniero Agrónomo.

<sup>2</sup>Criadero de Arboles Huerto California. Casilla 360, Quillota.

<sup>3</sup>Universidad Católica de Valparaiso, Casilla 4-D, Quillota, Chile.

<sup>4</sup>Estación Experimental La Platina (INIA), Casilla 439, Correo 3, Santiago, Chile.

Varios autores han intentado el cultivo *in vitro* de la alcachofa a partir de diversos tejidos (Petri y Ricci, 1981; Bigot y Foury, 1984; Marras, Foddai y Fiori, 1985). El ápice meristemático ha sido el explante más comúnmente utilizado y el que ha resultado en un mayor porcentaje de obtención de plantas (Ancora, 1986). Morone (1981), Ancora, Belli-Donini y Cuozzo (1981) y Pecaut y Martin (INRA, no publicado), han propuesto técnicas de micropropagación, utilizando tres etapas: establecimiento, multiplicación y enraizamiento.

Los objetivos de esta investigación fueron determinar, para cada una de estas etapas, el mejor medio de cultivo de entre los mencionados en la literatura y establecer el efecto de la fecha de establecimiento en cultivo sobre la sobrevivencia de los explantes.

### MATERIALES Y METODOS

La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Micropropagación de la Facultad de Agronomía de la Universidad Católica de Valparaíso, entre septiembre de 1988 y abril de 1989.

Se utilizaron 810 hijuelos obtenidos de plantas de alcachofas (*Cynara scolymus* L.) del tipo francés, de dos años de edad, recolectados en la localidad de Hijuelas (V Región). Los hijuelos fueron esterilizados superficialmente con etanol al 70% por 5 minutos y luego con hipoclorito de calcio (1%) + tween-20 (0,01%) por 15 minutos. De los hijuelos se obtuvieron ápices de 0,5 cm de longitud, los que fueron colocados en una solución antioxidante compuesta de ácido ascórbico (1,5 g/L) y ácido cítrico (0,5 g/L). Los explantes fueron incubados a una temperatura de  $24 \pm 3^\circ\text{C}$ , con un fotoperíodo de 16 horas luz y una irradiación de  $34 \mu\text{E cm}^{-2} \text{seg}^{-1}$ .

Los medios base y las vitaminas utilizadas fueron las descritas por Murashige y Skoog (1962) (medio MS), Tendille y Lecerf (1974) (medio TL) y Morel y Wetmore (1951) (medio MO).

Para lograr los objetivos propuestos, se realizaron tres ensayos consecutivos, los que se analizaron empleando un análisis de devianzas a través del software GLIM (modelos lineales generalizados).

El primer ensayo consistió en determinar el efecto de tres medios de cultivo (Cuadro 1) y tres fechas de establecimiento de los ápices meristemáticos sobre el establecimiento *in vitro* de los explantes. Las fechas de establecimiento fueron septiembre, octubre y noviembre de 1988. Los explantes fueron sembrados en tubos de ensayo de 8 x 2,8 cm, que contenían 11 mL de medio de cultivo y tapados con papel de aluminio. El efecto de los medios de cultivo se determinó empleando un diseño de bloques al azar, y el de las

**CUADRO 1. Composición de los medios de cultivo (mg/L) usados para el establecimiento *in vitro* de explantes de alcachofa (*Cynara scolymus* L.)**

**TABLE 1. Composition of the culture media (mg/L) used for establishing meristems of artichoke (*Cynara scolymus* L.) *in vitro* culture**

Componente	Tratamientos <sup>1</sup>		
	A1	F1	P1
Macroelementos	MS <sup>2</sup>	MS	TL <sup>3</sup>
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50,0	0,0	0,0
Microelementos	MS	MS	TL
NaFe EDTA	MS	MS	½ MS
Vitaminas	MS	MS	MO <sup>4</sup>
Tiamina	0,1	100,0	1,0
Reguladores de crecimiento			
Gilberelinas GA3	0,0	0,025	0,1
Auxinas AIA	0,5	1,0	0,0
Citoquininas Kinetina	10,0	0,0	0,1
2iP	0,0	1,0	0,0
Adenina HCL	40,0	0,0	0,0
Otros			
Tirosina	100,0	0,0	0,0
Inositol	100,0	1.000,0	100,0
Sacarosa	40.000,0	20.000,0	20.000,0
Agar	7.000,0	6.000,0	7.000,0
pH	5,5	5,7	5,8

<sup>1</sup>A1: Ancora y otros (1981), F1: Morone (1981), P1: Pecaut y Martin (INRA, no publicado).

<sup>2</sup>Murashige y Skoog (1962).

<sup>3</sup>Tendille y Lecerf (1974).

<sup>4</sup>Morel y Wetmore (1951).

fechas, fue completamente al azar, con arreglo factorial de dos factores.

Las variables medidas fueron sobrevivencia de los explantes, longitud, color y contaminación de los brotes.

En el segundo ensayo se determinó el efecto de tres medios de cultivo (Cuadro 2) sobre la multiplicación de plántulas *in vitro*. Los explantes inicialmente establecidos fueron "repicados" a frascos de vidrio de 12 x 3,5 cm, que contenían 25 ml de medio de cultivo, los que fueron tapados con papel de aluminio e incubados en las condiciones ya descritas. Las variables medidas fueron sobrevivencia de los explantes y longitud, color y contaminación de las brotaciones laterales.

En el tercer ensayo se determinó el efecto de tres medios de cultivo distintos (Cuadro 3) sobre el número de plántulas enraizadas y el número de plantas contaminadas. El diseño, en ambos ensayos, fue completamente al azar con arreglo factorial de dos factores.

**CUADRO 2. Composición de los medios de cultivo (mg/L) utilizados para la proliferación de brotes de alcachofa (*Cynara scolymus* L.) cultivados *in vitro*****TABLE 2. Composition of the culture media (mg/L) used for proliferation of artichoke (*Cynara scolymus* L.) shoots cultivated *in vitro***

Compuestos	Medios de cultivo		
	A2	F2	P2
Macroelementos	MS	MS	MS
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		85	
Microelementos	MS	MS	MS
Na <sub>2</sub> FE EDTA	MS	MS	MS
Vitaminas	MS	MS	-
Tiamina	1	100	1,4
Reguladores de crecimiento			
Gilderelinas GA3		0,1	
Auxinas AIA		0,5	
ANA		5	0,1
Citoquininas K	5		0,5
2iP			0,5
BAP		10	
Adenina HCL	40		
Sulfato de adenina			40
Otros			
Tirosina	100		
Inositol	100	1.000	100
Sacarosa	40.000	20.000	30.000
Agar	7.000	6.000	8.000
pH	5,5	5,7	5,8

A2: Medio de proliferación de Ancora y otros (1981).

F2: Medio de proliferación de Morone (1981).

P2: Medio de proliferación de Pecaut y Martin (INRA, no publicado).

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Establecimiento *in vitro* de los ápices meristemáticos

Los distintos medios nutritivos evaluados mostraron tener un claro efecto sobre el porcentaje de explantes que lograron establecerse, en todas las fechas. En cambio, no hubo efecto de las distintas fechas de establecimiento sobre ninguna de las variables medidas.

En cuanto a la sobrevivencia de los explantes (Cuadro 4), ésta fue mayor en aquellas plántulas desarrolladas sobre el medio P1 (Pecaut y Martin, INRA, no publicado), aunque sólo alcanzó a un 30%. Ello se debe, principalmente, a la oxidación que sufren los explantes en el período post-establecimiento *in vitro* y a la alta contaminación del material vegetal. Ancora (1986) señala también estos dos problemas para el cultivo *in vitro* de esta especie, señalando que el alto contenido de fenoles de la planta de alcachofa la hacen muy propensa a oxidarse.

**CUADRO 3. Composición de los medios de cultivo (mg/L) utilizados para el enraizamiento *in vitro* de plántulas de alcachofa (*Cynara scolymus* L.)****TABLE 3. Composition of the culture media (mg/L) used for rooting artichoke (*Cynara scolymus* L.) plantlets cultivated *in vitro***

Compuestos	Medios de cultivo		
	A3	F3	P3
Macroelementos	½ MS	½ MS	½ MS
Microelementos	½ MS	½ MS	MS
Na <sub>2</sub> Fe EDTA	MS	MS	MS
Vitaminas	MS	MS	MS
Tiamina	1	40	0,1
Acido ascórbico	10		
Ergocalciferol			0,25
Reguladores de crecimiento			
Auxinas AIA		20	
ANA	2		0,5
Otros			
Inositol	100	1.000	100
Sacarosa	40.000	20.000	30.000
Agar	7.000	6.000	8.000
pH	5,5	5,7	5,8

A3: Medio de enraizamiento de Ancora y otros (1981).

F3: Medio de enraizamiento de Morone (1981).

P3: Medio de enraizamiento de Pecaut y Martin (INRA, no publicado).

**CUADRO 4. Total de plántulas de alcachofa (*Cynara scolymus* L.) vivas al término de la etapa de establecimiento, en tres medios de cultivo diferentes****TABLE 4. Survival of artichoke (*Cynara scolymus* L.) explants on three different tissue culture media used for establishing apical meristems in culture**

Medio de cultivo	Plántulas vivas <sup>1</sup>	
	Nº	%
A1	52 b	19
F1	61 b	22
P1	81 a	30

<sup>1</sup>Promedios con igual letra dentro de las columnas son estadísticamente iguales, según la Prueba de Comparaciones Múltiples (P = 0,05).

Los explantes que más crecieron fueron aquellos que se establecieron en el medio P1 (Cuadro 5), los que, además, siempre mostraron mayor vigor, en tanto que aquellos establecidos en el medio A1 (Ancora y otros, 1981) mostraron una excesiva brotación lateral, que se tradujo en un desequilibrio en la plántula. Este fenómeno podría deberse a las altas concentraciones de citoquininas que contiene este último medio.

**CUADRO 5. Efecto de tres medios de establecimiento sobre el crecimiento en longitud de explantes de alcachofa (*Cynara scolymus* L.) establecidos *in vitro***

**TABLE 5. Effect of three different establishment tissue culture media on the longitudinal growth of artichoke (*Cynara scolymus* L.) meristems cultivated *in vitro***

Medio de cultivo	Longitud media (mm) <sup>1</sup>
A1	11,06 c
F1	17,75 b
P1	28,80 a

<sup>1</sup>Promedios con igual letra dentro de las columnas son estadísticamente iguales, según la Prueba de Comparaciones Múltiples (P = 0,05).

El color de los brotes obtenidos con los medios A1 y P1 fue siempre óptimo, encontrándose, por lo general, plántulas de color verde oscuro, con hojas de morfología adulta.

Las plántulas creciendo en el medio F1 (Morone, 1981), mostraron un desequilibrio morfológico caracterizado por la presencia de tejidos de colores claros y con carencia de clorofila. Este fenómeno podría estar asociado a la alta concentración de inositol que este medio contiene.

**Multiplicación *in vitro* de los brotes**

La proliferación lateral se estimó contando el número de brotes obtenidos a partir de los explantes iniciales y se expresó mediante un coeficiente o tasa de multiplicación. Sobre esta tasa de multiplicación sólo hubo efecto del medio de cultivo utilizado. El Cuadro 6 muestra que los medios A2 (Ancora y otros, 1981) y P2 (Pecaut and Martin, INRA, no publicado) resultaron estadísticamente iguales con una tasa de multiplicación de 6,0 y 6,9, respectivamente, luego de 8 semanas de cultivo. En cambio, las plántulas que crecieron sobre el medio F2 (Morone, 1981), no proliferaron. Además, los explantes iniciales presentaron una malformación, la cual se puede deber a la alta concentración y a los tipos de reguladores de crecimiento utilizados, los cuales no parecen haber sido adecuados para estimular la multiplicación.

La presencia de adenina en los medios de cultivo en esta etapa, parecen favorecer la brotación lateral, ya que tanto el medio A2 como el P2 contienen 40 mg/L de esta base nitrogenada, precursora de las citoquininas (George y Sherrington, 1984). La similitud en respuesta de los medios A2 y P2 probablemente esté relacionada con el hecho que los reguladores de crecimiento se encuentran en proporciones similares, a pesar de que las cantidades totales de éstos son distintas. Los distintos medios de cultivo no tuvieron

**CUADRO 6. Tasa de multiplicación de brotes de alcachofa (*Cynara scolymus* L.) cultivadas *in vitro* en tres diferentes medios de cultivo después de 60 días en cultivo**

**TABLE 6. Multiplication rate of artichoke (*Cynara scolymus* L.) shoots in three different tissue culture medium after 60 days in culture**

Medio de cultivo	Total de brotes obtenidos	Nº de brotes iniciales	Tasa de multiplicación en 3 repiques <sup>1</sup>
A2	222	37	6,0 a
F2	40	40	1,0 b
P2	252	37	6,9 a

<sup>1</sup>Promedios con igual letra dentro de la columna son estadísticamente iguales, según la Prueba de Comparación Múltiple (P = 0,05).

efecto sobre la sobrevivencia de las plántulas *in vitro*. Sin embargo, existieron dos factores importantes que insidieron en la sobrevivencia: la contaminación endógena y el tamaño del brote al momento de la separación de la plántula madre. La contaminación endógena redujo en forma creciente el vigor de las plántulas, las que finalmente murieron. En cuanto al tamaño del brote al momento del repique, se determinó que los brotes muy pequeños no logran sobrevivir, confirmando lo observado por Bigot y Foury (1984), quienes también señalan que brotes con menos de 15 días de crecimiento, generalmente, mueren si son repicados.

Tampoco hubo efecto del medio de cultivo utilizado sobre la longitud de los brotes. Sin embargo, fue notorio el efecto del tamaño del explante usado, observándose que mientras mayor fue su vigor y su tamaño, mayor fue también la longitud de los brotes laterales, la que alcanzó un promedio de 22,4 mm luego de 60 días de incubación.

Las plántulas, en general, mostraron colores verde oscuro cuando se establecieron en el medio P2, observándose una tendencia al desarrollo de colores más claros en los medios A2 y P2. En el medio F2 se desarrollaron plántulas excesivamente cloróticas.

Durante esta etapa del desarrollo de las plantas, se observó una reversión al estado juvenil en algunas hojas, lo que también ha sido observado por Bigot y Foury (1984), pero sólo a partir del cuarto repique. Este fenómeno se presentó esporádicamente y, a veces, con anterioridad al cuarto repique.

**Enraizamiento *in vitro* de los explantes**

Los medios utilizados tanto en la etapa de proliferación como en esta etapa, tuvieron efecto significativo sobre la cantidad de plántulas enraizadas.

El Cuadro 7 muestra que aquellas plántulas provenientes del medio P2, lograron enraizar en mayor proporción. Esto ratifica lo observado por Bigot y Foury (1984) quienes señalan que para que exista una rizogénesis activa y rápida, el brote debe tener buen vigor, el cual en este caso lo confirió el medio P2.

**CUADRO 7. Efecto del medio de cultivo utilizado durante la etapa de proliferación sobre el porcentaje de enraizamiento de plántulas de alcachofa (*Cynara scolymus* L.) cultivadas *in vitro***

**TABLE 7. Effect of three different media used for shoot proliferation of artichoke (*Cynara scolymus* L.) cultivated *in vitro* on percentage rooting and plantlet contamination**

Medios de cultivo	Número de plantas			Porcentaje de enraizamiento <sup>1</sup>
	Totales	Contaminadas	Enraizadas	
A2	103	48	19	18 b
P2	168	60	49	29 a

<sup>1</sup>Promedios con igual letra dentro de la columna son estadísticamente iguales, según la Prueba de Comparaciones Múltiples (P = 0,05).

Ancora, Belli-Donini y Cuozzo (1981) señalan que existe poca producción de raíces cuando las citoquininas están presentes en el medio de cultivo. Esta podría ser la razón del pobre grado de enraizamiento que mostraran las plántulas provenientes del medio A2, el cual contiene una mayor concentración de citoquininas.

En cuanto a los medios de enraizamiento propiamente tales, el A3 (Ancora y otros, 1981) y el P3 (Pecaut y Martin, INRA, no publicado) fueron estadísticamente iguales en cuanto al porcentaje de enraizamiento, alcanzando éste sólo a un 34 y 32% de plántulas, respectivamente (Cuadro 8).

Las plántulas del medio P3 se mantuvieron 8 días en oscuridad inmediatamente después de repicadas, ya que según Pecaut y Martin (INRA, no publicado), el

**CUADRO 8. Efecto de tres medios de cultivo sobre el enraizamiento y la contaminación de plántulas de alcachofa (*Cynara scolymus* L.) cultivadas *in vitro***

**TABLE 8. Effect of three different media used for rooting artichoke (*Cynara scolymus* L.) plantlets cultivated *in vitro* on percentage rooting and plantlet contamination**

Medios de cultivo	Totales	Número de plantas <sup>1</sup>			
		Contaminadas		Enraizadas	
		Nº	%	Nº	%
A3	93	27	29 c	32	34 a
F3	88	44	50 a	7	8b
P3	90	37	40 b	29	32 a

<sup>1</sup>Promedios con igual letra dentro de la columna son estadísticamente iguales, según la Prueba de Comparaciones Múltiples (P = 0,05).

colocar las plantas en la oscuridad favorece la producción de raíces, ya que aumenta la síntesis de auxinas.

Las concentraciones de 0,5 y 2 mg/L de ácido naftalén acético presentes en los medios P3 y A3 no parecen inducir diferencias significativas en cuanto al porcentaje de enraizamiento, a pesar que se observó formación de callo y oxidaciones basales sólo en el medio A3.

El ácido naftalén acético parece ser más eficiente en la activación de la rizogénesis que el ácido indol acético, ya que el medio F3 fue el que mostró el menor porcentaje de enraizamiento (sólo un 8%), a pesar de tener una concentración de 20 mg/L de esta última auxina.

Las plántulas que crecieron en los medios A3 y P3 mostraron raíces cortas y largas, generalmente ramificadas, de colores blanco nacarados hasta colores antocianícos, en tanto que las raíces que se formaron en el medio F3, fueron escasas, largas y sin ramificación.

En esta etapa también se observó contaminación endógena, lo cual nuevamente afectó el porcentaje de enraizamiento e indujo un menor vigor en la plántulas.

## RESUMEN

Con el propósito de establecer una metodología eficiente para la micropropagación de la alcachofa (*Cynara scolymus* L.), se evaluaron los diversos medios de cultivo descritos en la literatura para el establecimiento, proliferación y enraizamiento de esta especie. Además, se determinó el efecto de la época de obtención de los explantes (septiembre, octubre o noviembre) sobre el crecimiento y desarrollo de la planta. La metodología

utilizada para el cultivo *in vitro* fue la comúnmente empleada en otras especies y se llevó a efecto en el Laboratorio de Micropropagación de la Facultad de Agronomía de la Universidad Católica de Valparaíso.

Los resultados de esta investigación han demostrado que en un período de seis meses es posible la obtención de plantas enraizadas a partir de ápices

meristemáticos de 0,5 cm de longitud, obtenidos de hijuelos de plantas de dos años de edad.

La época de establecimiento de los explantes en cultivo (septiembre, octubre o noviembre) no tuvo influencia sobre la sobrevivencia de éstos, ni sobre su posterior crecimiento, grado de contaminación, ni porcentaje de enraizamiento.

Para el establecimiento de los explantes el mejor medio de cultivo fue el descrito por Pecaut y Martin (INRA, no publicado). Para la proliferación de brotes, resultaron igualmente adecuados los medios descritos por Ancora y otros (1981) y por Pecaut y Martin (INRA, no publicado), lográndose tasas de multiplicación que variaron de 6,0 a 6,9, luego de 8 semanas de cultivo. El enraizamiento de las plántulas se vió afectado por el

medio de cultivo utilizado en la etapa de proliferación, observándose que el medio de Pecaut y Martin (INRA, no publicado) es el que le confiere mayores posibilidades de enraizamiento a las plantas. Los medios de enraizamiento que contienen ácido naftalén acético en concentraciones entre 2 y 20 mg/L, fueron los que mejor estimularon la formación de raíces.

Para el éxito de la micropropagación de esta especie, se requiere determinar las condiciones que permitan eliminar la contaminación endógena que esta especie posee, de manera de evitar los problemas que ésta ocasiona durante todas las etapas de proceso de micropropagación.

**Palabras claves:** Cultivo de tejidos, micropropagación.

### LITERATURA CITADA

- ANCORA, G. 1986. Globe artichoke (*Cynara scolymus* L.). In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Y.P.S. Bajaj (ed.). 2: 471-484.
- ANCORA, G. BELLI - DONINE, M. L., and CUOZZO, L. 1981. Globe artichoke plants obtained from shoot apices through rapid *in vitro* micropropagation. *Sci. Hortic.* 14: 207-213.
- BIGOT, C. and FOURY, C. 1984. *In vitro* propagation of Globe Artichoke (*Cynara scolymus* L.) from seedlings: field comparison of some clones with their parent lines. *Agronomie* 4(8): 699-710.
- GEORGE, E. and SHERRINGTON, P. 1984. Plant propagation by tissue culture. Exegetics Ltda. England.
- MARRAS, F. FODDAI, A. and FOIRI, M. 1985. Health selection of "Spinoso sardo" Globe Artichoke. *Informatore Fitopatológico* 35(9) 47-50.
- MOREL, G. and WETMORE, R. H. 1951. Tissue culture of monocotyledons. *Ann. J. Bot.* 38: 138-140.
- MORONE, F.I. 1981. Aspetti citoistologici della moltiplicazione vegetativa *in vitro* del carciofo (*Cynara scolymus* L.) *Annali della Facolta di Agraria della Universita di Bari* 32: 366-376.
- MURASHIGE, T. and SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- PETRI, P. S. and RICCI, A. 1981. Micropropagation of Globe Artichoke from tissues *in vitro*. In: *Industria Gráfica Laterza, 3° Congresso Internazionale di Studi sul Carciofo*. Bari. p. 231-238.
- TENDILLE, C. et M. LECERF. 1974. La multiplication végétative de l'asperge (*Asparagus officinalis* L.). Action de divers facteurs, en particulier de la nutrition minerale, sur le développement des méristèmes d'asperge, sur la croissance de plantes issues de ces méristèmes et sur la production de plantes adultes. *Ann. Amélior. Plant.* 24: 264-282.