

Micropropagazione, micorrizzazione e produzione di carciofo precoce

Claudia Ruta, Angela Campanelli, Anna Tagarelli, Giuseppe De Mastro e Irene Morone-Fortunato

Dipartimento di Scienze Agro-Ambientali e Territoriali, Università 'Aldo Moro' di Bari

Micropropagation, mycorrhization and yield of early type globe artichokes

Abstract. In this work, five globe artichoke (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* Fiori) ecotypes of early typology were cultured *in vitro* to identify an effective micropropagation protocol. Shoot tip explants excised from selected globe artichoke genotypes were transferred on a basal medium supplemented with isopentil adenine (2ip 1 mg^l⁻¹), indoleacetic acid (IAA 1 mg^l⁻¹), gibberellic acid (GA₃ 0,025 mg^l⁻¹) to establish the *in vitro* culture. Then they were multiplied using 0.05 mg^l⁻¹ 6-benzylaminopurine (BAP). For root induction, 10 mg^l⁻¹ indol 3-acetic acid were used. The *ex vitro* acclimatization was carried out in a greenhouse with heating and mist system. The effect of mycorrhization technique was evaluated to reduce the transplant stress. For the acclimatization, globe artichoke micropropagated plants were transplanted in field and the assessment of the plants was evaluated. The mycorrhizal plants showed a higher productivity, an earlier production in relation to harvest time and a marked increase in total phenolic content in flower heads. Data collected confirm the efficiency of the *in vitro* propagation technique and the positive effect of mycorrhiza on the yield of early globe artichoke genotypes.

Key words: *Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* Fiori, *in vitro* culture, nursery, mycorrhization, in field performance.

Introduzione

La micropropagazione di specie ortive per scopi commerciali ha consentito il risanamento e la conservazione di materiale di particolare pregio e interesse economico, la produzione di piante con elevato standard qualitativo e l'uniformità e sanità del materiale vivaistico, consentendo, inoltre, di disporre di un prodotto qualitativamente costante nel tempo facilitando la programmazione colturale. La micropropagazione è

stata applicata con ottimi risultati in termini di attecchimento, qualità e produzione, alle cultivar tardive di carciofo a partire dagli anni '80, rappresentando l'origine del successo per il vivaismo cinaricolo. Più complessa si è rivelata l'applicazione di questa tecnica propagativa alle cultivar precoci, che sono risultate più recalcitranti. Studi sulla capacità di rendere le piante micropropagate di carciofo precoce della cultivar catanese adattabili alle pratiche colturali, superando i problemi legati all'attecchimento *ex-vitro* mediante il ricorso all'inoculazione radicale di funghi micorrizici in fase di ambientamento, sono stati condotti in precedenza da Morone-Fortunato *et al.* (2005).

Le ricerche condotte nell'ambito del Progetto CARVARVI "Utilizzazione di funghi micorrizici e valorizzazione di germoplasma per la produzione di piantine di carciofo di qualità" (MiPAF) hanno avuto come obiettivo la definizione di protocolli per la produzione *in vitro* delle cultivar precoci di carciofo e relativi ecotipi, maggiormente coltivati in Italia, valutando, inoltre, l'efficacia della simbiosi micorrizica per evidenziare il rapporto di specificità fungo-pianta ospite. La validazione agronomica in campo, inoltre, ha consentito di accertare la validità dell'intero processo dalla moltiplicazione *in vitro* alla produzione dei capolini.

Materiali e metodi

Micropropagazione di cultivar precoci

La ricerca è stata condotta su tre ecotipi di carciofo della cv Catanese: "Locale di Mola", "Brindisino" e "Violetto di Sicilia", reperiti rispettivamente in località Mola di Bari, Brindisi e Catania, e su due ecotipi della cv. "Violetto di Provenza", con provenienza Oristano e Mola di Bari.

Il materiale utilizzato per la prova *in vitro* era costituito da apici vegetativi di giovani carducci in crescita, raccolti da carciofaie selezionate. Gli apici prelevati (5-6 mm) sono stati sterilizzati in una soluzione di cloruro di mercurio (5‰) per 15 minuti. Gli stessi, risciacquati abbondantemente in acqua sterile,

* claudia.ruta@uniba.it

sono stati trasferiti in tubi di vetro della capacità di 70 ml, contenenti 20 ml di substrato base (Morone Fortunato *et al.*, 2005). Nella fase di stabilizzazione il mezzo base è stato arricchito con isopentenil adenina (2ip 1 mg l⁻¹), acido indolacetico (IAA 1 mg l⁻¹) e acido gibberellico (GA₃ 0,025 mg l⁻¹).

Per la fase di moltiplicazione, gli espianti stabilizzati sono stati trasferiti in vasi di vetro della capacità di 220 ml, contenenti 40 ml di substrato arricchito con 6-benzilamminopurina (BAP) alla concentrazione di 0,05 mg l⁻¹. Sono state effettuate tre subcolture a distanza di 25 giorni, al termine delle quali è stato calcolato l'indice medio di moltiplicazione degli espianti. La radicazione *in vitro* degli ecotipi di carciofo micropropagati è stata realizzata aggiungendo al mezzo di coltura, arricchito in questo caso con saccarosio 30g l⁻¹, l'acido indolacetico (10 mg l⁻¹). Dopo 30 giorni è stata rilevata la percentuale di germogli radicati. Gli espianti sono stati incubati in camera di crescita a 22±1 °C con fotoperiodo di 16 h di luce e intensità luminosa di 60 μEm⁻²s⁻¹.

Per ogni fase della micropropagazione e per ciascun ecotipo sono state impiegate trenta piante per trattamento, ricorrendo ad uno schema sperimentale a randomizzazione completa. I confronti tra i trattamenti sono stati effettuati con il Test SNK ad un livello di significatività p≤0,01.

Prova di affinità simbiotica

È stata valutata l'influenza di due specie del genere *Glomus* (*G. viscosum* e *G. mosseae*) sull'ambientamento *ex-vitro* e sulla crescita delle piantine. Le due specie fungine sono state isolate in laboratorio e moltiplicate su colture trappola di fragola, note per l'elevata micotrofia. La prova iniziale di valutazione di specificità fungina ha riguardato l'ecotipo di carciofo "Locale di Mola" cv Catanese. È stato adottato uno schema sperimentale a blocco randomizzato con tre ripetizioni delle tre seguenti tesi: A-testimone, B-*Glomus viscosum*, C-*Glomus mosseae*, per un totale di 9 blocchi e 15 piante per blocco.

Le piantine radicate sono state trapiantate in vasetti (v = 200 ml) contenenti una miscela sterile di torba commerciale (torba bruna di sfagno, carbonio organico di origine biologica 46%, azoto organico 1,2%, sostanza organica 80%, pH 6) e perlite (2:1, v/v), e poste in una serra metallo-vetro, climatizzata e provvista di impianto di nebulizzazione (temperatura media 20-25 °C, livello di umidità relativa ridotto progressivamente dall'85-90% al 55-60% in 15 giorni). L'inoculo micorrizico, 10g per vaso, consisteva di circa 100-120 spore, micelio esterno e frammenti di radici micorrizzate ottenute da piante di fragola

(*Fragaria x Ananassa* Duch.) usate come piante trappola per moltiplicare l'inoculo.

A 30 giorni dal trapianto è stato monitorato il numero delle piante sopravvissute ed è stata stimata la percentuale di attecchimento *ex vitro*. Nei sei mesi successivi al trapianto, è stato monitorato mensilmente l'andamento dello SPAD (*Soil Plant Analysis Development*) misurato a mezzo del clorofillmetro portatile SPAD 502 (Minolta Camera Co. LTD, Japan). Dopo sei mesi, su dieci piante scelte a caso, sono stati determinati i seguenti parametri morfologici: numero di foglie per pianta (n), altezza (cm) corrispondente alla lunghezza media delle foglie per pianta, peso fresco e secco porzione epigea (g), area fogliare (cm²), peso fresco e secco porzione ipogea (g), densità radicale (cm cm⁻³) (Tennant, 1975).

L'area fogliare è stata misurata con l'ausilio di un Licor LAI Area Meter 3100. Le radici sono state prima colorate usando il protocollo di Philips e Haymann (1970), quindi è stata valutata la percentuale di colonizzazione micorrizica (Trouvelot *et al.*, 1986).

La dipendenza micorrizica (%) è stata calcolata per ogni specie fungina secondo la formula di Plenchette *et al.* (1983): $DM = [(peso\ secco\ totale\ in\ piante\ micorrizzate - peso\ secco\ totale\ in\ piante\ non\ micorrizzate) \times 100] / peso\ secco\ totale\ in\ piante\ micorrizzate$.

Micorrizzazione delle piantine micropropagate

Si è valutata l'efficacia della simbiosi sull'attecchimento di tutti gli ecotipi di carciofo prodotti *in vitro*. Per ogni ecotipo di carciofo ambientato è stata valutata la percentuale di attecchimento *ex vitro*. È stato adottato un disegno sperimentale a blocchi randomizzati 5x2, con 5 ecotipi di carciofo prodotti *in vitro* (tre ecotipi di carciofo cv Catanese: "Locale di Mola"- Mola di Bari, "Brindisino"- Brindisi, "Violetto di Sicilia"- Catania; due ecotipi di carciofo cv "Violetto di Provenza" con provenienza Oristano e Mola di Bari) e 2 trattamenti (con e senza *Glomus viscosum*).

Valutazione agronomica di selezioni di carciofo

Piante micropropagate, micorrizzate e non, della cultivar precoce 'Violetto di Provenza' (provenienza Mola) sono state trapiantate in campo nel mese di Agosto 2011, al fine di definire le caratteristiche agronomiche più idonee alla coltivazione del carciofo. Si è valutata la produzione in termini quantitativi, come numero dei capolini ed epoca di raccolta, e in termini qualitativi, considerando le caratteristiche merceologiche dei capolini prodotti quali il calibro, le dimensioni della parte edule, le caratteristiche delle brattee, la lunghezza totale del pappo e il contenuto in polifenoli (Shadidi e Nacz, 1995).

Risultati

Micropropagazione di cultivar precoci

Il protocollo di coltura *in vitro* utilizzato (Morone-Fortunato *et al.*, 2005) si è rivelato efficiente per tutti gli ecotipi presi in esame. In fase di stabilizzazione (fig. 1), la sopravvivenza degli espianti non è stata mai inferiore al 65% (Violetto di Provenza, provenienza Oristano), raggiungendo i valori più elevati con gli ecotipi Locale di Mola e Brindisino (rispettivamente 91% e 89%), mentre il Violetto di Sicilia e il Violetto di Provenza provenienza Mola si sono attestati intorno a valori del 70% (rispettivamente 72% e 71%).

In fase di moltiplicazione (fig. 2), i due ecotipi di Violetto di Provenza hanno presentato un indice di moltiplicazione più elevato (21,25 e 25,15 rispettivamente per la provenienza Oristano e Mola in terza subcoltura) dei tre ecotipi di Catanese.

I risultati ottenuti dalle prove di radicazione *in vitro* (fig. 3), fase critica precedentemente studiata da vari autori (Ancora *et al.*, 1981; Iapichino, 1996;

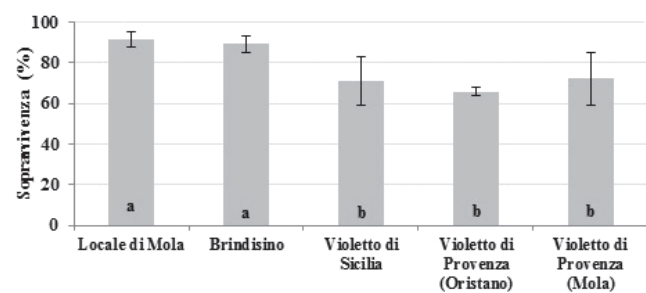


Fig. 1 - Percentuale di sopravvivenza degli espianti di ecotipi di carciofo precoce durante la fase di stabilizzazione dopo 25 giorni di coltura *in vitro*. Gli istogrammi indicano le medie e le barre \pm l'errore standard. Test SNK ($p \leq 0,01$).

Fig. 1 - Survival percentage of explants of artichoke ecotypes after 25 days of *in vitro* culture. Histograms represent the average and the bars \pm standard error. Test SNK ($p \leq 0,01$).

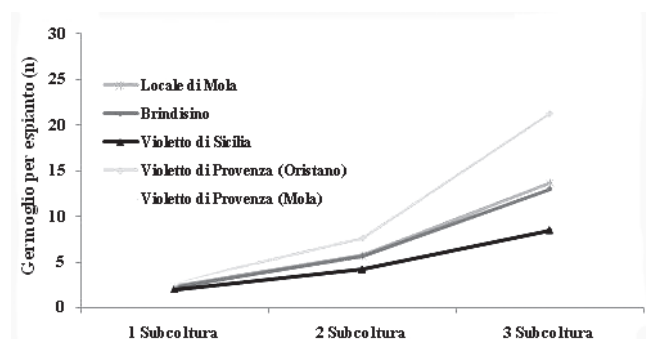


Fig. 2 - Indice medio di moltiplicazione dei germogli di ecotipi di carciofo precoce allevati su substrato di moltiplicazione durante le tre subcolture (1 subcoltura = 25 giorni).

Fig. 2 - Multiplication average index of shoots of artichoke ecotypes grown on substrate for proliferation in three subcultures (1 subculture = 25 days).

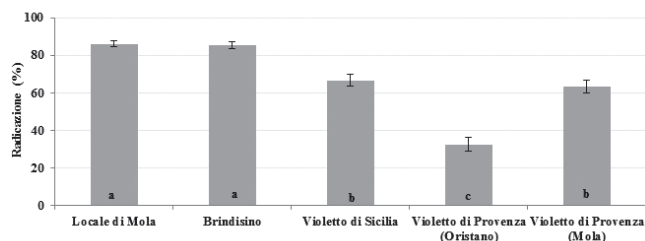


Fig. 3 - Percentuale di radicazione dei germogli di ecotipi di carciofo precoce allevati su substrato di radicazione dopo 30 giorni di coltura *in vitro*. Gli istogrammi indicano le medie e le barre \pm l'errore standard. Test SNK ($p \leq 0,01$).

Fig. 3 - Rooting percentage of shoots of artichoke ecotypes grown on substrate for rooting after 30 days of *in vitro* culture. Histograms represent the average and the bars \pm standard error. Test SNK ($p \leq 0,01$).

Brutti *et al.*, 2000), hanno confermato i risultati ottenuti da Morone-Fortunato *et al.* (2005). Anche in questo stadio si è notato un diverso comportamento fra i differenti ecotipi, infatti i due ecotipi di Violetto di Provenza si sono attestati su valori di radicazione più bassi (63% provenienza Mola di Bari e 53% provenienza Oristano) rispetto agli ecotipi catanesi (85% Locale di Mola e Brindisino, 77% Violetto di Sicilia).

Prova di affinità simbiotica

In tabella 1 sono riportate le risposte morfologiche delle piantine micropropagate dell'ecotipo Locale di Mola (cv Catanese) ai due trattamenti micorrizici rispetto alla tesi non trattata. I valori registrati hanno evidenziato, per tutti i parametri in esame, l'effetto positivo delle micorrize sull'accrescimento delle piantine in ambientamento, in particolare in simbiosi con *G. viscosum*.

I più alti valori di SPAD sono stati ottenuti sempre in presenza di micorriza e fra le due micorrize valutate il *G. viscosum* ha rilevato una maggiore efficienza delle piantine (fig. 4). Le differenze tra i trattamenti sono state valutate a partire dai due mesi successivi all'inoculazione micorrizica, tempo utile affinché possa manifestarsi l'effetto benefico.

I valori di SPAD fornendo una stima indiretta del contenuto in clorofilla delle foglie (Evans, 1983; Pasquini *et al.*, 2004), danno informazioni sullo stato nutrizionale delle piante in relazione alla disponibilità di azoto (Wood *et al.*, 1992), poiché la maggior parte dell'azoto è contenuto nelle molecole di clorofilla (Evans, 1983).

La valutazione della percentuale di infezione e della dipendenza micorrizica (tab. 2) ha evidenziato il diverso comportamento dei due inoculi. Il *G. viscosum* ha presentato una maggiore percentuale di infezione (85%) rispetto al *G. mosseae* (60%), a conferma

Tab. 1 - Principali caratteristiche bio-morfologiche di piantine di 'Locale di Mola', allevate in serra su substrato arricchito in inoculo micorrizico o in assenza di inoculo (testimone), a sei mesi dal trapianto.

Tab. 1 - Main bio-morphological characteristics of 'Locale di Mola' artichoke ecotype grown in greenhouse on substrate enriched or not with mycorrhizal inoculum or (control) six months after transplants.

Parametri morfologici	Testimone	<i>Glomus mossae</i>	<i>Glomus viscosum</i>
Foglie (n)	6,7 ± 1,0	7,3 ± 2,0	8,3 ± 1,0
Peso fresco epigeo (g)	86,5 ± 18,8	120,8 ± 46,1	121,4 ± 10,5
Peso fresco ipogeo (g)	17,9 ± 1,8 c	23,9 ± 2,1 b	31,5 ± 3,5 a
Peso secco epigeo (g)	9,2 ± 1,5	11,2 ± 3,3	12,6 ± 2,5
Peso secco ipogeo (g)	2,7 ± 0,0 b	3,1 ± 0,7 b	4,3 ± 0,3 a
Lunghezza radice (cm)	206,2 ± 84,7 b	506,3 ± 215,7 ab	802,5 ± 413,7 a
Densità radicale (cm cm ⁻³)	1,0 ± 0,4 b	2,5 ± 1,0 ab	4,0 ± 1,5 a
Area fogliare (cm ²)	1225,7 ± 564,9	1816,2 ± 549,6	1640,4 ± 209,8

I valori indicano le medie ± l'errore standard. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative (Test SNK - p≤0,01) comparando i dati lungo le righe della tabella.

Tab. 2 - Infezione e dipendenza micorrizica in piantine di 'Locale di Mola', allevate in serra su substrato arricchito in inoculo micorrizico, a sei mesi dal trapianto.

Tab. 2 - Frequency of AM colonization and mycorrhizal dependency of 'Locale di Mola' artichoke grown in greenhouse on substrate enriched or not with mycorrhizal inoculum, six months after transplants.

Parametri simbiotici	<i>Glomus mossae</i>	<i>Glomus viscosum</i>
Infezione micorrizica (%)	60 ± 2 b	85 ± 3 a
Dipendenza micorrizica (%)	16,5	29,5

I valori indicano le medie ± l'errore standard. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative (Test SNK - p≤0,01) comparando i dati lungo le righe della tabella.

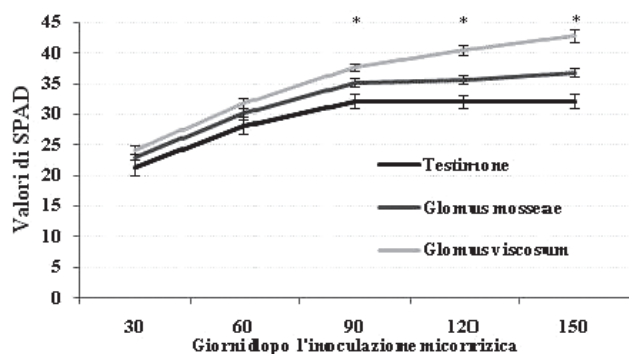


Fig. 4 - Andamento dei valori di SPAD in piantine di 'Locale di Mola', allevate in serra su substrato arricchito in inoculo micorrizico o in assenza di inoculo (testimone). I valori indicano le medie ± l'errore standard. Test SNK (p≤0,01).

Fig. 4 - SPAD values of 'Locale di Mola' artichoke ecotype grown in greenhouse on substrate enriched or not with mycorrhizal inoculum.. Values represent the average and the bars ± standard error. Test SNK (p≤0,01).

della maggiore affinità di questa specie fungina con l'ecotipo di carciofo precoce Locale di Mola.

Micorrizzazione delle piantine micropropagate

Glomus viscosum si è confermato efficace per i cinque ecotipi oggetto di studio. Dalla figura 5 si

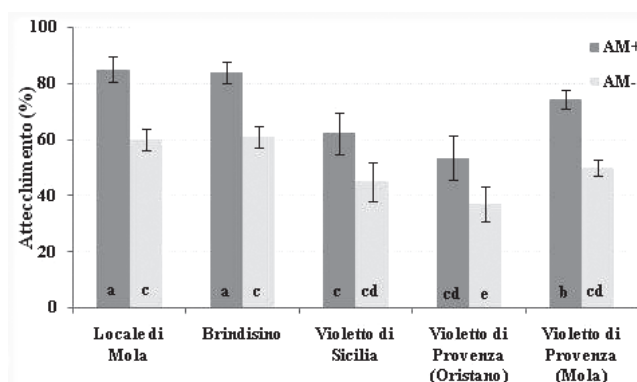


Fig. 5 - Effetto della simbiosi con *Glomus viscosum* sulla percentuale di attecchimento degli ecotipi di carciofo precoce micorrizzati (AM+) e non micorrizzati (AM-). Gli istogrammi indicano le medie e le barre ± l'errore standard. Test SNK (p≤0,01).

Fig. 5 - Effect of mycorrhiza on the ex-vitro establishment of inoculated (AM+) artichoke ecotypes compared with control not inoculated (AM-). Histograms represent the average and the bars ± standard error. Test SNK (p≤0,01).

evinces l'effetto benefico della simbiosi durante la fase di ambientamento *ex-vitro*, nel determinare percentuali di attecchimento significativamente più elevate rispetto alle tesi del controllo non micorrizzato (fig. 5).

Valutazione agronomica di selezioni di carciofo

La disponibilità di piantine micropropagate e ambientate, micorrizzate e non, sin dal mese di agosto, ha permesso l'impianto della carciofaia in tale data, consentendo l'entrata in produzione già nell'anno del trapianto.

Il calendario di produzione, relativo all'annata 2011-2012, ha evidenziato che i tipi micropropagati e micorrizzati hanno differenziato e portato a maturazione un numero più elevato di capolini nel periodo autunno-vernino-primaverile (da novembre 2011 a maggio 2012), mentre quelli micropropagati non micorrizzati esclusivamente nel periodo vernino-primaverile (tra febbraio e maggio 2012). I rilievi morfolo-

Tab. 3 - Caratteristiche produttive e contenuto in fenoli totali dei capolini di "Violetto di Provenza" (provenienza Mola) micorrizate e non con *Glomus viscosum*. Gli istogrammi indicano le medie e le barre \pm l'errore standard. Test SNK ($p \leq 0,01$).

Tab.3 - Productive characteristic and the total phenolic content in the heads of mycorrhizal artichoke (Violetto di Provenza - Mola) compared with control not inoculated. Histograms represent the average and the bars \pm standard error. Test SNK ($p \leq 0,01$).

Caratteristiche produttive capolini	Violetto di Provenza	
	Micorrizzato	Non micorrizzato
Peso fresco (g)	180,5	179,1
Peso secco (g)	22,0	22,0
Profondità ricettacolo (cm)	1,2	1,1
Diamentro ricettacolo (cm)	3,3	3,4
Peso fresco edule (g)	81,4	82,3
Peso secco edule(g)	10,2	11,1
Sostanza secca (%)	12,0	11,8
Contenuto fenoli totali (mg CA g ⁻¹ FW)	5,4 a	3,3 b

gici hanno indicato che i capolini rispettano le caratteristiche merceologiche tipiche della cultivar (tab. 3). Le analisi sui capolini hanno confermato il beneficio della simbiosi micorrizica sul miglioramento qualitativo delle produzioni, con un più elevato contenuto in polifenoli totali dei capolini raccolti (tab. 3), concordemente a quanto riportato da Ceccarelli *et al.* (2010).

Conclusioni

Grazie alle sue prerogative, la micropropagazione garantisce il mantenimento delle caratteristiche qualitative consentendo l'uniformità e la sanità del materiale vivaistico. La micorrizzazione stimola l'accrescimento degli apparati radicali favorendo un miglioramento degli altri parametri morfo-fisiologici e l'ottenimento, alla fine della fase di allevamento in vivaio, di piantine micorrizzate con requisiti bio-agronomici sicuramente superiori.

Il grado di colonizzazione micorrizica del sistema radicale e la risposta delle colture possono variare a seconda della specificità delle interazioni pianta-fungo (Smith e Read, 1997). L'individuazione del simbionte micorrizico specifico determina un maggior beneficio in termini di produttività e sostenibilità. Per le piante micropropagate di carciofo oggetto dello studio, il fungo *G. viscosum* è risultato più efficiente del fungo *G. mosseae*. Inoltre, per le piantine micropropagate le alte percentuali di attecchimento del materiale micorrizzato, rispetto al non micorrizzato, hanno evidenziato l'efficienza della simbiosi in carciofo nel superamento della maggiore criticità di questa tecnica propagativa, concordemente a quanto descritto in letteratura per altre specie (Khrishna *et al.*, 2005;

Moreas *et al.*, 2004; Estrada-Luna e Davies, 2003; Estrada-Luna *et al.*, 2000; Yano-Melo *et al.*, 1999).

Le modificazioni morfologiche e fisiologiche indotte dal fungo sulle piante di carciofo hanno determinato un più elevato rapporto radici/germoglio, fattore probabilmente responsabile dell'incremento del potenziale di accrescimento della pianta. La simbiosi micorrizica ha peraltro supportato un miglioramento quali-quantitativo della produzione ottenuta dalle piante micropropagate trapiantate in campo.

Queste biotecnologie sperimentate, utili al miglioramento qualitativo delle carciofaie, sono spendibili anche in sistemi a basso impatto ambientale per un'agricoltura ecosostenibile grazie all'azione biofertilizzante delle micorrize.

Ringraziamenti

Gli Autori ringraziano la dott.ssa Cadinu del Centro Regionale Agrario Sperimentale di Cagliari e il prof. Mauromicale del Dipartimento di Scienze Agronomiche, Agrochimiche e delle Produzioni vegetali di Catania per il prezioso materiale autoctono fornito.

Riassunto

Lo studio ha previsto il reperimento di cloni di ecotipi autoctoni di carciofo e l'individuazione di idonei protocolli di micropropagazione. La tecnica della micorrizzazione è risultata utile nella fase di ambientamento *ex vitro* delle plantule micropropagate. Il trapianto in campo delle piante micropropagate, micorrizzate e non, ha permesso di monitorare l'efficacia della tecnica di propagazione e l'effetto della simbiosi sulle produzioni ottenute.

Parole chiave: *Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* Fiori, coltura *in vitro*, vivaio, micorrizzazione, produzione in campo.

Ricerca supportata dal Ministero delle Politiche Agricole e Forestali, Progetto CARVARVI "Utilizzazione di funghi micorrizici e valorizzazione di germoplasma per la produzione di piantine di carciofo di qualità".

Bibliografia

- ANCORA G., BELLI-DONINI M.L., CUOZZO L., 1981. *Globe artichoke plants obtained from shoot apices through rapid in vitro micropropagation*. Sci. Hort. 14: 207-213.
- BRUTTI C., APOSTOLO N.M., FERRAROTTI S.A., LLORENTE B.E., KRYMKIEWICZ N., 2000. *Micropropagation of Cynara scolymus L. employing cyclodextrins to promote rhizogenesis*. Sci. Hort. 83: 1-10.

- CECCARELLI N., CURADI M., MARTELLONI L., SBRANA C., PICCIARELLI P., GIOVANNETTI M., 2010. *Mycorrhizal colonization impacts on phenolic content and antioxidant properties on artichoke leafe and flore heads two years after field trans-plant*. Plant Soil 335: 311-323.
- ESTRADA-LUNA A.A., DAVIES F.T.J.R., 2003. *Arbuscular mycorrhizal fungi influence water relations, gas exchange, abscisic acid and growth of micropropagated chile ancho pepper (Capsicum annum) plantlets during acclimatization and postacclimatization*. J. Plant Physiology 160: 1073-1083.
- ESTRADA-LUNA A.A., DAVIES F.T.J.R., EGILLA J.N., 2000. *Mycorrhizal fungi enhancement of growth and gas exchange of micropropagated guava plantlets (Psidium guajava L.) during ex vitro acclimatization and plant establishment*. Mycorrhiza 10: 1-8.
- EVANS J.R. 1983. *Nitrogen and photosynthesis in the flag leaf of wheat*. Plant Physiology. 72: 297-302.
- IAPICHINO G., 1996. *Micropropagation of globe artichoke (Cynara scolymus L.) from underground dormant buds ("ovoli")*. In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant 32: 249-252.
- KRISHNA H., SINGH S.K., SHARMA R.R., KHAWALE R.N., GROVER M., PATEL V.B., 2005. *Biochemical changes in micropropagated grape (Vitis vinifera L.) plantlets due to arbuscular-mycorrhizal fungi (AMF) inoculation during ex vitro acclimatization*. Sci. Hort. 106: 554-567.
- MORAES R.M., ANDRADE Z.D., BEDIR E., DAYAN F.E., LATA H., KHAN I., PEREIRA A.M.S., 2004. *Arbuscular mycorrhiza improves acclimatization and increases lignan content of micropropagated mayapple (Podophyllum peltatum L.)*. Plant Science 166: 23-29.
- MORONE-FORTUNATO I., RUTA C., CASTRIGNANÒ A., SACCARDO F., 2005. *The effect of mycorrhizal symbiosis on the development of micropropagated artichokes*. Sci. Hort. 106: 472-483.
- PASQUINI A., RIZZO A., SAVE L., 2004. *A methodology for the analysis of SPAD*. Safety Science, 42: 437-455.
- PHILLIPS J.M., HAYMAN D.S., 1970. *Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection*. Trans. Br. Mycol. Soc. 55: 158-161.
- PLENCHETTE C., FORTIN J.A., FURLAN V., 1983. *Growth responses of several plant species to mycorrhizae in a soil of moderate P fertility. I. Mycorrhizal dependency under field conditions*. Plant Soil 70: 199-209.
- SHADIDI F., NACZK M., 1995. *Methods of analysis and quantification of phenolic compounds*. In: Shadidi F., Naczk M (eds) *Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications*. Technomic, Lancaster, 287-293.
- SMITH S.E., READ D.J., 1997. *Mycorrhizal Symbiosis*. 2nd ed. Academic Press, London. 605 pp.
- TENNANT D., 1975. *A test of a modified line intersect method of estimating root length*. Journal of Ecology, 63: 995-1001.
- TROUVELOT A., KOUCH J., GIANINAZZI-PEARSON V., 1986. *Mesure du taux de mycorhization VA d'un système racinaire: Recherche of method d'estimation ayant une signification fonctionelle*. Les Mycorhizes: Physiologie and Genetique. 1^{er} Seminaire Dijon, Ed. INRA, Paris. 217-221.
- WOOD C.W., REEVES D.W., DUFFIELD R.R., EDMISTEN K.L., 1992. *Field chlorophyll measurements for corn nitrogen status*. Journal of Plant Nutrition 15: 487-501.
- YANO-MELO A.M., MAIA L.C., SAGGIN JR. O.J., LIMA-FILHO J.M., MELO N.F., 1999. *Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on the acclimatization of micropropagated banana plantlets*. Mycorrhiza 9:119-123.