

**Original****Propagación y conservación in vitro de clavel (*Dianthus ssp.*)****Propagation and in vitro conservation of carnation (*Dianthus ssp.*)**

Luis Alberto Acosta Cabrera, Ingeniero Forestal, Empresa de comunales Jiguaní,  
[jsilvap@udg.co.cu](mailto:jsilvap@udg.co.cu)

Yanexis Fonseca Carrasco, Instructor, Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Granma, [yfonsecac@udg.co.cu](mailto:yfonsecac@udg.co.cu), 

Marisel Bahí Arevich. Instructor, Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Granma, [mbahia@udg.co.cu](mailto:mbahia@udg.co.cu)

Juan José Silva Pupo, Profesor Titular, Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Granma, [jsilvap@udg.co.cu](mailto:jsilvap@udg.co.cu), 

Recibido: 7 de enero – Aceptado: 13 de junio

**Resumen**

El clavel constituye una de las principales especies productoras de flores de corte a nivel internacional. En esta investigación se realizaron tres experimentos dirigidos a evaluar la propagación y la conservación *in vitro* de diferentes variedades de clavel con el empleo de medios de cultivo. En un primer experimento se realizó la desinfección con hipoclorito de sodio al 1% de cloro activo durante 20 minutos en la cabina de flujo laminar y luego fueron lavados con agua destilada estéril 4 veces y posteriormente se sembraron en el medio de establecimiento con las sales Murashige-Skoog (1962) suplementadas con myoinositol 100 mg.l<sup>-1</sup>, tiamina 1 mg.l<sup>-1</sup>, ácido giberélico 10 mg.l<sup>-1</sup>, ácido indolacético 0,01 mg.l<sup>-1</sup>, sacarosa 30 g.l<sup>-1</sup>, agar 6 g.l<sup>-1</sup> y pH 5,7. Las cinco variedades de clavel chino evaluadas presentaron una mejor respuesta a la desinfección y a las variables del establecimiento *in vitro* que las variedades de clavel español. En un segundo experimento en la etapa de multiplicación utilizando el medio de cultivo anterior se compararon cinco variedades de clavel chino en cuanto al porcentaje de brotación y el enraizamiento, así como el número de segmentos nodales a los 28 días de cultivo. Las variedades MR y RF presentaron la mayor cuantía de segmentos nodales con valores de 7,37 y 6,92 respectivamente.

te y sin diferencias significativas entre ellas. En un tercer experimento se realizó un ensayo con el objetivo de valorar la posibilidad de conservar material *in vitro* de clavel español (*Dianthus caryophyllus*) en recipientes tipo "botella" para la conservación de material *in vitro*. Los segmentos fueron sembrados en el medio de multiplicación de clavel. Se logró la conservación *in vitro* de clavel español en frascos tipo "botella" durante un año.

**Palabras clave:** micropropagación; dianthus; medios de cultivo; segmentos nodales.

### **Abstract**

The carnation is one of the main species that produces cut flowers internationally. In this research, three experiments were carried out aimed at evaluating the propagation and *in vitro* conservation of different varieties of carnation with the use of culture means. In a first experiment, disinfection with 1% sodium hypochlorite of active chlorine was carried out for 20 minutes in the laminar flow booth and then they were washed with sterile distilled water 4 times and later they were seeded in the establishment medium with the Murashige-Skoog salts (1962) supplemented with myoinositol 100 mg.l<sup>-1</sup>, thiamine 1 mg.l<sup>-1</sup>, gibberellic acid 10 mg.l<sup>-1</sup>, indolacetic acid 0,01 mg.l<sup>-1</sup>, sucrose 30 g.l<sup>-1</sup>, agar 6 g.l<sup>-1</sup> and pH 5,7. The five evaluated varieties of Chinese carnation presented a better response to disinfection and to the variables of the *in vitro* establishment than the Spanish carnation varieties. In a second experiment in the multiplication stage using the previous culture medium, five varieties of Chinese carnation were compared in terms of the percentage of sprouting and rooting, as well as the number of nodal segments at 28 days of culture. The MR and RF varieties presented the highest number of nodal segments with values of 7,37 and 6,92 respectively and without significant differences between them. In a third experiment, a trial was carried out with the objective of evaluating the possibility of conserving *in vitro* material of the Spanish carnation (*Dianthus caryophyllus*) in "bottle" type containers for the conservation of *in vitro* material. The segments were seeded in the carnation multiplication environment. *In vitro* conservation of Spanish carnation was achieved in bottles type "bottle" for one year.

**Key words:** micropropagation; dianthus; culture means; nodal segments

## Introducción

Tras la caída de la Unión Soviética y el bloqueo económico impuesto por Estados Unidos, a principios de la década de los 90, Cuba se ve obligada a producir sus propios alimentos como medida para garantizar la seguridad alimentaria. Tras la necesidad de un cambio radical en sus técnicas de producción se comienza a tomar la agroecología como eje fundamental de su agricultura. Apoyados por el Gobierno se definieron lineamientos y un programa nacional de Agricultura Urbana flexibles que se revisan y modifican anualmente acorde a las necesidades de los productores y del mercado. Más de veinte años de resultados crecientes de producción e impactos positivos lo avalan, lo cual, junto con un desarrollo urbano caracterizado por la ocupación de espacios libres en excelentes zonas para la producción de alimentos, hacen de Cuba un ejemplo a nivel internacional en el avance y desarrollo de la Agricultura Urbana y Periurbana Acebedo (2015).

Sin embargo, el programa de la agricultura urbana y suburbana en Cuba no solo tiene la función de producir alimentos, sino que también dispone de subprogramas destinados a la producción de plantas medicinales y la floricultura y plantas ornamentales, lo que incrementa su importancia por contribuir a dar respuesta a un sector productivo deficitario como es la producción de flores de corte.

A nivel mundial, la floricultura se ha convertido en una de las alternativas más importantes de negocio en países ubicados en las zonas tropicales del mundo. Los claveles representan el 6% de la producción de flores. Estos son las flores más apetecidas por sus excelentes características de duración, belleza, disponibilidad durante el año y resistencia al embalaje y transporte González, Pita, Pinzón, Cely, y Serrano (2018).

Los claveles que se cultivan en Cuba se destinan al mercado nacional, aunque su demanda no se encuentra satisfecha debido principalmente a la ausencia de métodos de propagación seguros y eficientes, ya que en las condiciones climáticas de la isla, el clavel español (*Dianthus caryophyllus* L.) generalmente no produce semillas y se multiplica a partir de esquejes, lo que facilita la diseminación de algunas plagas y enfermedades Castilla, González, y Lara (2014). Sin embargo la disponibilidad de material vegetal de propagación es escaso y muy limitado su cultivo tanto para el clavel español como el clavel chino (*Dianthus chinensis* L.).

Los métodos de la biotecnología vegetal se han empleado con fines de propagación *in vitro*, erradicación de virus, mejoramiento genético, conservación de germoplasma y otras aplicaciones Ali, Afrasiab, Naz, Rauf e Iqbal, (2008). También la conservación sea realizado por la vía de la criopreservación Sekizawa, Yamamoto, Rafique, Fukui y Niino, (2011). Por su parte, Al-Snafi (2017) informó sobre el análisis fitoquímico de *Dianthus caryophyllus* que contenía triterpenos, alcaloides, cumarinas, glucósido cianogénico, cianidina, pelargonidina, aceite esencial, aceite volátil y muchos otros contenidos químicos. Los estudios farmacológicos revelaron que la planta poseía efectos anticancerígenos, antivirales, antibacterianos, antifúngicos, insecticidas, repelentes, antioxidantes, anestésicos y analgésicos.

El objetivo de esta investigación fue evaluar la propagación y la conservación *in vitro* de diferentes variedades de clavel con el empleo de medios de cultivo.

### Población y muestra

A partir de plantas en macetas de las variedades de clavel chino y de vástagos comerciales de clavel español de color rosado y blanco (Figura 1) se realizaron los experimentos 1 y 2. Las primeras cinco imágenes corresponden a *Dianthus chinensis* y la última a esquejes de *Dianthus caryophyllus*.



Matizada rosada (MR)	Rosada fuerte (RF)	Matizada morada (MM)	Rosada clara (RC)	Blanco (B)	Variedades Blanca y Rosada.
----------------------------	-----------------------	-------------------------	----------------------	------------	-----------------------------------

Figura 1. Variedades de clavel chino y español evaluadas en el experimento 1.

Las muestras del experimento 3 se obtuvieron de plántulas *in vitro* de clavel español (*Dianthus caryophyllus* L) cultivadas en el ciclo 1 de la etapa de multiplicación.

### Materiales y métodos

Experimento 1. Establecimiento *in vitro* de las diferentes variedades de clavel.

La desinfección se realizó con hipoclorito de sodio al 1% de cloro activo durante 20 minutos en la cabina de flujo laminar y luego fueron lavados con agua destilada estéril cuatro veces y posteriormente se sembraron en el medio de establecimiento con las sales Murashige- Skoog (1962) suplementadas con myinositol 100 mg.l<sup>-1</sup>, tiamina 1 mg.l<sup>-1</sup>, ácido giberélico 10 mg.l<sup>-1</sup>, ácido indolacético 0,01 mg.l<sup>-1</sup>, sacarosa 30 g.l<sup>-1</sup>, agar 6 g.l<sup>-1</sup> y pH 5,7. El medio fue distribuido en tubos de ensayo a razón de 10 ml por tubo. Los medios se mantuvieron 72 horas para comprobar su esterilidad y luego fueron inoculados un segmento nodal por tubo de ensayo. La siembra se realizó en cámaras con luz artificial y fotoperiodo de 16 horas luz y ocho oscuridades. El número de explantes por variedad osciló entre 15 y 25, en dependencia de la disponibilidad de material vegetal.

Las variables evaluadas fueron:

- Desinfección (%) a los 7 días.
- Brotación (%).
- Número de brotes por explante.
- Número de hojas en el brote principal.
- Longitud de los brotes (cm).

Estos últimos fueron evaluados a los 28 días de cultivo.

Experimento 2. Multiplicación *in vitro* de las variedades seleccionadas.

Se utilizó como medio de multiplicación con las sales Murashige- Skoog (1962) suplementadas con myinositol 100 mg.l<sup>-1</sup>, tiamina 1 mg.l<sup>-1</sup>, ácido giberélico 10 mg.l<sup>-1</sup>, ácido indolacético 0,01 mg.l<sup>-1</sup>, sacarosa 30 g.l<sup>-1</sup>, agar 6 g.l<sup>-1</sup> y pH 5,7. El medio fue distribuido en tubos de ensayo a razón de 10 ml por tubo de ensayo. Los medios se mantuvieron 72 horas para comprobar su esterilidad y luego fueron inoculados en los tubos de ensayos un segmento nodal por tubo de ensayo. La incubación se realizó durante 28 días en condiciones de luz natural y temperatura de 25±2°C.

Las variables evaluadas fueron brotación (%), enraizamiento (%) y número de segmentos nodales a los 28 días de cultivo.

Experimento 3. Conservación *in vitro* de clavel a mediano plazo en recipientes tipo botella.

Se realizó un ensayo con el objetivo de valorar la posibilidad de conservar material *in vitro* de clavel español (*Dianthus caryophyllus*) en recipientes tipo "botella" para la conservación de material *in vitro* tradicionalmente realizado en tubos de ensayo. Segmentos nodales fueron sembrados en el medio de multiplicación con las sales Murashige y Skoog (1962) suplementadas con myoinositol 100 mg.l<sup>-1</sup>, tiamina 1 mg.l<sup>-1</sup>, ácido giberélico 10 mg.l<sup>-1</sup>, ácido indolacético 0,01 mg.l<sup>-1</sup>, sacarosa 30 g.l<sup>-1</sup>, agar 6 g.l<sup>-1</sup> y pH 5,7. Cada recipiente se le agregó 40 mL del medio de cultivo mencionado. La siembra se realizó de un explante por frasco. La tapa del mismo fue de celulosa y después de sembrado se cubrió con film alimentario. A los seis meses de cultivo se le agregó medio de cultivo fresco y se aireó en condiciones de flujo laminar, de manera que se eliminaran los gases que se cumularon en el recipiente tipo botella. Se valora el crecimiento de los segmentos nodales, la conservación *in vitro* y la contaminación.

### **Análisis de los resultados**

Se aplicó un diseño completamente aleatorizado en los dos primeros experimentos realizados. Para las variables cuantitativas como número de brotes por explante, número de hojas en el brote principal, longitud de los brotes y número de segmentos nodales se aplicó un análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis, luego que los datos no respondieran a los preceptos del análisis de varianza. Para las variables porcentaje de desinfección, brotación y enraizamiento se realizó una comparación de proporciones. Para estos análisis se empleó el paquete estadístico InfoStat Di Rienzo Casanoves, Balzarini, González, Tablada, Robledo (2010). En el tercer experimento se realizó una valoración cualitativa de los resultados.

Experimento 1. Establecimiento *in vitro* de las diferentes variedades de clavel.

En la tabla 1 se presentan los resultados de las diferentes variedades y variables evaluadas. Para la variable desinfección el mejor resultado se obtuvo en la variedad Blanca sin diferencias significativas con la variedad RC con valores de 100 y 81% respectivamente. La respuesta de la variedad Blanca puede estar relacionado con los metabolitos aromáticos que presenta esa variedad que se manifiesta con el aroma que emiten las plantas progenitoras. En general pueden considerarse de manera satisfactoria los resultados obtenidos en todas las variedades. El grupo microbiano presente fueron los hongos con características similares al género *Aspergillus*.

La brotación resultó superior al 83,3% en todas las variedades sin diferencias significativas entre las variedades para esta variable, aunque las variedades RF, RC y MR tuvieron un 100% de respuesta, lo que indica que esta especie y variedades de clavel responden satisfactoriamente a la composición del medio de cultivo. Se observó incluso que hubo brotación hasta en explantes que tuvieron contaminación microbiana.

**Tabla 1. Resultados en el establecimiento *in vitro* de diferentes variedades de clavel chino.**

Variedades	Desinfección (%)	Brotación (%)	Número de brotes/ explante	Número de hojas por brote	Longitud de los brotes (cm)
MM	75 bc	83,3	2,67	4,33 a	5,79 a
RF	60 c	100	2,00	3,67 ab	3,06 c
RC	81,25 ab	100	1,69	2,62 bc	3,58 bc
B	100 a	94,4	2,83	2,50 c	4,52 b
MR	53,3 c	100	1,75	3,00 bc	4,06 bc
p<0,05	*	n.s.	n.s.	*	*

En la variable número de brotes por explantes no se obtuvo diferencia significativa entre las variedades evaluadas y su cuantía osciló entre 1,69 para la variedad RC y 2,83 para la variedad B. Estos resultados demuestran que cada segmento nodal sembrado inicialmente puede producir dos nuevos brotes, a pesar que el medio de cultivo utilizado no contenía citoquininas como el BAP que estimulan la formación de brotes axilares. Al respecto, Ali, Afrasiab, Naz, Rauf, e Iqbal, (2008) emplearon el medio MS que contenía BAP solo o en combinación con kinetina. La mejor respuesta de formación de brotes se obtuvo después de seis días de inoculación del meristemo apical y después de siete días de inoculación del meristemo axilar en medio MS suplementado con 4,0 mg.l<sup>-1</sup> de BAP. El meristemo apical mostró un efecto más pronunciado para la formación de brotes que el meristemo nodal.

El número de hojas por brote resultó superior en la variedad MM con 4,33 hojas sin diferencia significativa con la variedad RF con 3,67 hojas de promedio por brote. En último lugar la variedad B con 2,5 hojas por brote. En cuanto a la longitud de los brotes resultó mayor en la variedad MM con 5,79 cm con diferencias significativas en relación al resto de las variedades,

pero todas superaron el valor promedio de 3,06 cm, lo que puede catalogarse como una muy buena respuesta.

En la figura 2 se presentan muestras del crecimiento y desarrollo de las plántulas obtenidas *in vitro* de las variedades evaluadas, observándose un buen desarrollo de las mismas con brotes alargados, lo que es característico del clavel con hojas verdes intensas y en las variedades RC y MM se presentan dos brotes por tubo de ensayo. Eso pudo ser observado en todas las variedades. La presencia de varios segmentos nodales por explante es un indicador favorable para la multiplicación de esta especie.

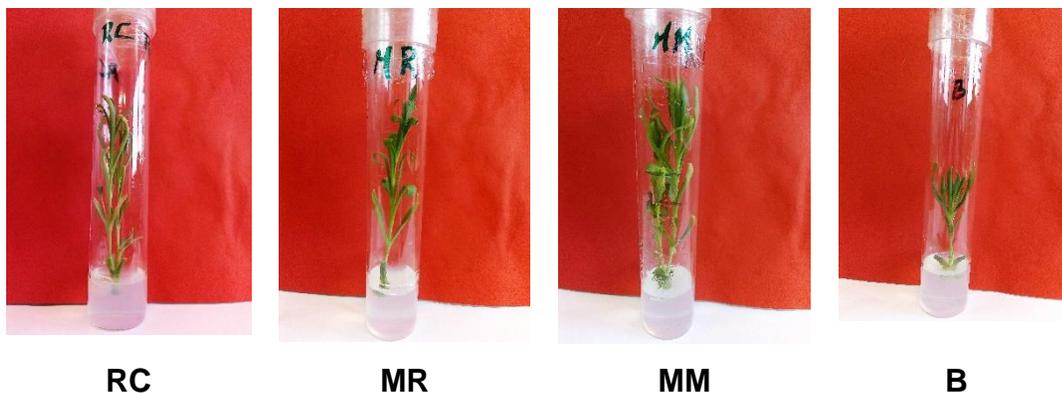


Figura 2. Establecimiento *in vitro* de diferentes variedades de clavel chino.

En este experimento se apreció en general una respuesta satisfactoria de las diferentes variedades de clavel chino estudiadas. En relación a las dos variedades de clavel español utilizadas en el experimento no se obtuvo unos resultados satisfactorios al existir contaminación microbiana causada por bacterias principalmente, lo que se considera que pudo estar determinado por la procedencia del material vegetal debido a que el mismo se adquirió como flor cortada. En futuras investigaciones se deben cortar los esquejes procedentes del tallo de una flor cortada y colocar en agua destilada estéril hasta su brotación para entonces tomar los brotes juveniles de manera similar como se hace con otras especies que se han trabajado en el Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal en morera Silva, Fonseca, Bahi, Pérez y Werbrouck (2018) y sauce llorón.

Experimento 2. Multiplicación *in vitro* de las variedades seleccionadas.

En la tabla 2 se presentan los resultados obtenidos en las variables brotación, enraizamiento y el número de segmentos nodales en las variables evaluadas. La brotación de los segmentos nodales fueron superior al 90% de respuesta en todas las variables evaluadas, lo que indica un favorable resultado al medio de multiplicación utilizado, solo existió diferencia significativa según el análisis de comparación de proporciones de la variedad MM en relación al resto de las variedades que tuvieron un 100% de respuesta sin diferencias entre ellas.

**Tabla 2. Respuesta de las variedades estudiadas a las variables brotación, enraizamiento y numero de segmentos nodales a los 28 días de cultivo en el medio de multiplicación *in vitro*.**

Variedades	Brotación (%)	Enraizamiento (%)	Número de segmentos nodales
MM	91,89 b	18,9 c	3,73 ±0,29 b
MR	100 a	76,32 a	7,37 ±0,29 a
RF	100 a	48,64 b	6,92 ±0,29 a
B	100 a	68,57 ab	3,11 ±0,30 b
RC	100 a	20,00 c	3,80 ± 0,79 b
p<0,05	*	*	*

A diferencia de la variable brotación que es positiva para la multiplicación *in vitro*, en el caso del porcentaje de enraizamiento no favorece la respuesta mencionada. El mayor porcentaje de enraizamiento se observó en la variedad MR con un 76,32% sin diferencia significativa con la variedad B con un 68,57% de respuesta. Los menores porcentajes de enraizamiento se observaron en las variedades MM y RC con 18,9 y 20,00% de respuesta sin diferencias significativas entre ellas.

Las mayores medias de segmentos nodales se obtuvieron en las variedades MR y RF con 7,37 y 6,92, sin diferencias significativas entre ellas. En el resto de las variedades los valores obtenidos fueron superiores a 3,00 segmentos nodales, lo que constituye un excelente resultado para la multiplicación *in vitro* de estas variedades de clavel chino. Ali *et al.*, (2008) obtuvieron el número máximo de brotes múltiples en medio MS que contenía 1,0 mg.l<sup>-1</sup> de BAP. Estos brotes múltiples aumentaron en su número cuando se les dio un período de incubación posterior. La adición de Kinetina al BAP no mostró una buena respuesta de multiplicación de brotes. Los brotes después de alcanzar el tamaño de 5,0 cm se desplazaron para enraizar en la

especie *Dianthus caryophyllus*. Sin embargo, Marković, Popović, y Vilotić, (2013) desarrollan la propagación rápida de las plantas nativas no invasivas, decorativas, de color rosa virgen (*Dianthus deltoides* L.) para preservar su diversidad genética. El cultivo *in vitro* se estableció con éxito en medio Murashige y Skoog (MS) utilizando semillas como material inicial. En la fase de multiplicación del brote, los explantes se cultivaron en medio MS suplementado con diferentes concentraciones de 6-bencilamina-opurina (BAP) y ácido naftalenacético (ANA). La tasa de multiplicación más alta se logró en un medio que contenía 0,1 mg.l<sup>-1</sup> de BAP. Los resultados obtenidos en este trabajo y los autores mencionados demuestran la necesidad de definir las mejores condiciones de la etapa de cultivo *in vitro* correspondiente en cada variedad y especie de clavel que se estudie.

En general estos resultados demuestran que el uso de un medio de cultivo con las sales de Murashige-Skoog, ácido giberélico y ácido indolacético son favorables para la multiplicación *in vitro*. En futuras investigaciones es necesario trabajar en disminuir las concentraciones del ácido giberélico.

Experimento 3. Conservación *in vitro* de clavel a mediano plazo en recipientes tipo botella.

El mantenimiento de los recursos fitogenéticos mediante los métodos de cultivo *in vitro* se logra generando cambios en el ambiente de cultivo que permiten desacelerar el crecimiento de las células y de los tejidos. El objetivo es aumentar al máximo el período de transferencia del cultivo. Es esta necesidad la que estimuló algunos de los primeros estudios sobre el mantenimiento *in vitro* del germoplasma de diversas especies. Este método cubre un amplio espectro de técnicas que implican el cultivo, bajo condiciones de asepsia, de órganos o fragmentos de órganos (meristemos, semillas, embriones somáticos, embriones cigóticos, hojas, tallos, raíces, yemas, polen, anteras, callos o protoplastos), en un medio de cultivo artificial definido, bajo condiciones ambientales controladas Scocchi y Rey (2004).

El recipiente utilizado para la conservación *in vitro* por mínimo crecimiento es normalmente un tubo de ensayo de 2 cm de diámetro y entre 15 y 20 cm de largo, dimensiones que obliga a realizar subcultivos frecuentes cada tres-cuatro meses del material vegetal que se encuentra en condiciones de conservación, lo que provoca una mayor manipulación del material vegetal con el aumento de la mano de obra, los peligros de contaminación microbiana y de cambios en la identificación del material en conservación.

En la figura 3 se presentan los resultados obtenidos en la conservación *in vitro* por mínimo crecimiento de clavel español en frascos tipo botella durante un año, al que solo se le realizó a los seis meses una aireación del recipiente mediante su traslado al flujo laminar y la apertura de la tapa manteniéndolo durante 30 minutos en esas condiciones para que se produjera una eliminación y entrada del aire que se encuentra en la misma. Las plántulas que crecen en las botellas tienen en general un buen aspecto con hojas extendidas, crecimiento vertical y un profuso desarrollo de las raíces que puede confundir al operario con la presencia de contaminantes fúngicos.



Figura 3. Conservación *in vitro* de clavel español (*Dianthus caryophyllus*) a mediano plazo en recipientes tipo botella.

En estudios realizados para la conservación *in vitro* de clavel por Jiménez, Silva, Borges y Fonseca (2016) conservaron segmentos nodales de esa especie con el uso de diferentes niveles de las sales Murashige-Skoog (1962) y emplearon como recipientes tubos de ensayo que limitaron la permanencia de las plántulas en ellos.

Estos resultados demuestran la posibilidad de utilizar este recipiente muy común y resistente en el cultivo *in vitro* de plantas que anteriormente no se conocía de su uso con ese fin. También se demuestra que el clavel es una especie de planta que se puede utilizar de manera satisfactoria para la evaluación de procesos biotecnológicos como la conservación *in vitro*.

## Conclusiones

- 1.- Las cinco variedades de clavel chino evaluadas presentaron una mejor respuesta a la desinfección y a las variables del establecimiento *in vitro* que las variedades de clavel español.
- 2.- En la etapa de multiplicación las variedades MR y RF presentaron la mayor cuantía de segmentos nodales.
- 3.- Se logró la conservación *in vitro* de clavel español en frascos tipo "botella" durante un año.

## Referencias bibliográficas

- Acevedo, J.A. (2015). *Agricultura urbana y periurbana en Cuba*. En: Agricultura urbana integral ornamental y alimentaria. Una visión global e internacional. Editores y coordinadores Julian Briz e Isabel Felipe. p. 323-340.
- Ali, A.; Afrasiab, H.; Naz, S.; Rauf, M. e Iqbal, J. (2008). *An efficient protocol for in vitro propagation of carnation (Dianthus caryophyllus L.)*. Pakistan Journal of Botany, vol. 40, no. 1, p. 111-121.
- Al-Snafi, A. E. (2017). *Chemical contents and medical importance of Dianthus caryophyllus- A review*. Journal of Pharmacy. Volume 7, Issue 3 p. 61-71. IOSR [www.iosrphr.org](http://www.iosrphr.org) (e)-ISSN: 2250-3013.
- Castilla, Y., Gonzalez, M.E. y Lara, R. M. (2014). *Determinación de estabilidad genética en vitroplantas de clavel español (Dianthus caryophyllus L.)*, micropropagadas con biobras-16. Cultivos Tropicales, vol. 35, no. 1, p. 67-74
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión (2010). Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Gonzalez, L., Pita, B., Pinzón, E., Cely, G. y Serrano, P. (2018). *Efecto de tratamientos pregerminativos en semillas de Dianthus barbatus cv. "Purple" bajo condiciones controladas*. Rev. Cienc. Agr. 35 (1):58-68. doi: <http://dxdoi.org/10.22267/rcia.183501.83>.
- Jiménez, L., Silva, J.J., Borges, M. y Fonseca-, M. (2016). *Conservación in vitro del cultivo de clavel español (Dianthus caryophyllus L.) a partir de sales minerales*. Agron. Mesoam. 27(1):177-181. ISSN 1021-7444.
- Marković, M., Popović, M. y Vilotić, D. (2013). *Micropropagation of Dianthus deltoides L. through shoot tip and nodal cuttings culture*. Arch. Biol. Sci., Belgrade, 65 (1), 17-22.
- Murashige, T. y Skoog, F. (1962). *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures*. Physiology Plantarum, vol. 15, p. 473-497.
- Scocchi, A. y Rey, H. (2012). *Conservación de germoplasma in vitro*. En: Libro Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. p 179-185. ArgenBio INTA. Argentina.

- Sekizawa, K. , Yamamoto, S., Rafique, T., Fukui, K. y Niino, T. (2011). *Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of carnation (Dianthus caryophyllus L.) by vitrification method using aluminium cryo-plates*. National Center for Seeds and Seedlings, Tsukuba, Ibaraki 305-0852, Japan; Genebank, National Institute of 3 Agrobiological Sciences, Tsukuba, Ibaraki 305-8602, Japan. Plant Biotechnology DOI: 10.5511/plantbiotechnology.11.0531a
- Silva, J. J., Fonseca, Y. Y., Bahi, M., Pérez, J. y Werbrouck, S. (2019). *In vitro propagation and callus formation of Morus alba*. Proceedings of the 5th Conference of the IUFRO Unit 2.09.02 on “Clonal Trees in the Bioeconomy Age: Opportunities and Challenges”. Coimbra, Portugal. In: J. Bonga, Y. Park, & J. Trontin (Eds.), page 159. <https://www.iufro.org/fileadmin/material/publications/proceedings-archive/20902-coimbra18.pdf>