

ARTICULO ORIGINAL

GERMINACIÓN *in vitro* DE *Dianthus caryophyllus* EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO

In vitro GERMINATION OF *Dianthus caryophyllus* IN DIFFERENT CULTURE MEDIUM

Melanie Arana-Paredes, Sofía Rengifo del Aguila & Julio Chico-Ruiz

Laboratorio de Biotecnología y Patología de Plantas. Universidad Nacional de Trujillo-Perú

RESUMEN

D. caryophyllus "clavel" es una planta ornamental que contribuye con el 12% de la exportación de flores a nivel mundial y se hace necesario masificar su cultivo utilizando los cultivo *in vitro*. Por ello se experimentó evaluar la germinación en condiciones *in vitro* en tres diferentes medios de cultivo. Los tratamientos fueron el medio de Murashige y Skoog (MS), medio con agua de coco y medio con extracto de papa, se compararon el porcentaje de germinación (%G), la velocidad de germinación (M) e índice de germinación (IG). El análisis estadístico del número de semillas germinadas al sexto día de siembra mostró que el medio agar con agua de coco (AC) fue el más efectivo para la germinación del clavel siendo estadísticamente similar al medio MS y distinto del medio con extracto de papa que obtuvo los valores más bajos.

Palabras clave: germinación, *D. caryophyllus*, medio de cultivo

ABSTRACT

D. caryophyllus "carnation" is an ornamental plant that contributes with 12% of the export of flowers worldwide and it is necessary to massify its cultivation using the *in vitro* culture. Therefore, it was experimented to evaluate the germination in *in vitro* conditions in three different culture media. The treatments were the medium of Murashige and Skoog (MS), medium with coconut water and medium with potato extract, the percentage of germination (% G), germination speed (M) and germination index (GI) were compared. . The statistical analysis of the number of seeds germinated on the sixth day of sowing showed that the agar medium with coconut water (AC) was the most effective for germination of the carnation being statistically similar to the MS medium and different from the medium with potato extract that obtained the lowest values.

Key words: germination, *D. caryophyllus*, culture medium

Recibido: 25 Junio 2017.

Aceptado: 12 Setiembre 2017.

Publicado online: 30 Diciembre 2017.

INTRODUCCIÓN

Se puede definir a la floricultura como la disciplina orientada al cultivo de plantas ornamentales que implica el conocimiento a detalle de todo el desarrollo productivo, tecnológico, económico y comercial de las mismas (Morisigue *et al.*, 2012). La floricultura se lleva a cabo en zonas de clima agradable y alta densidad demográfica, dentro de las zonas que cumplen con ambas condiciones está la zona norte de Perú, considerada como un invernadero natural con condiciones idóneas para la producción de flores durante todo el año (Masías, 2003). La importancia económica que ha alcanzado la floricultura a nivel global es realmente incalculable, ya que la producción de flores se ha convertido en un negocio rentable dentro del sector agropecuario, proporcionando elevados ingresos por unidad de superficie (Yong, 2010).

En nuestro país resulta desconocida la cantidad total de hectáreas dedicadas al cultivo de flores y la producción nacional; de la cual se exportaron en el 2012 más de ocho millones de dólares, pero se espera que para el año 2023 se superen los 80 millones de dólares, gracias a un crecimiento anual superior al 20%. Es importante mencionar que el principal mercado de exportación es Estados Unidos (De Olazabal *et al.*, 2013).

Dianthus caryophyllus “clavel” es una especie herbácea perenne perteneciente a la familia Caryophyllaceae. Figueredo (2014) la describe como una planta que posee base leñosa, con tallos a menudo hinchados y frágiles en los nudos que crecen entre 60- 75 cm, los cuales pueden producir en promedio seis flores cada uno; las hojas son opuestas, lineares, sus colores varían de verde a gris – azul. Posee una flor perfecta, longistilia e hipógina, cuya cantidad de granos de polen y óvulos depende de la variedad, asimismo el color de las flores puede ser entero, punteado, bordeado o moteado. Es una planta diploide ($2n=30$), aunque también se han identificado plantas tetraploides ($4n=60$) y hexaploides ($6n=90$).

De manera natural, la germinación de *D. caryophyllus* se da en un periodo de entre 2 y 3 semanas con una temperatura óptima que oscila entre 16° y 20° (Herrero, 2000). Muñoz (2001) afirma que el sustrato más adecuado para la germinación de esta especie es aquel compuesto por arena y turba, ambos en un porcentaje de 50%.

La importancia del clavel para el rubro de la floricultura, radica en que representa aproximadamente el 12% de la exportación mundial de flores, siendo una de las más cotizadas a nivel internacional. Esto, debido a que presenta diversidad de colores, posibilidad de florecer todo el año, considerable duración después del corte y resistencia al embalaje y transporte (Jimenez-Mariña *et al.*, 2016).

D. caryophyllus, se propaga mediante semillas, estratificación y cultivo de tejidos. Uno de los problemas más frecuentes para su siembra a gran escala es el bajo índice de germinación que este puede presentar (Roychowdhury *et al.*, 2012). Los factores que pueden influir en la inhibición de la germinación son controladores de tipo natural, estos son derivados de los ácidos benzoico, cinámico, cumarínico, jasmónico, abscísico y la naringenina. Se ha postulado que estos inhibidores de crecimiento están contenidos en pequeñas cantidades dentro de la testa de la semilla en numerosas plantas para prevenir su prematura germinación (El-Barghathi & El-Bakkosh, 2005). Se ha probado que la adición de sustancias controladoras como el ácido indol-3-acético (AIA), ácido giberélico (AG_3) y en algunos casos citoquininas frena la acción de inhibidores naturales de la germinación. Roychowdhury *et al.* (2012) reportaron que adicionando 20 ppm de ácido giberélico se podía obtener una tasa de germinación del 87.46%, colocando las semillas en papel filtro Whatman N° 1.

La propagación *in vitro*, permite una eficiente multiplicación de las plantas independientemente de las condiciones ambientales; asimismo facilita la obtención de plantas genéticamente idénticas, libres de patógenos y posibilita la manipulación de las especies en un tiempo breve, lo cual viabiliza su comercialización (Castilla *et al.*, 2014). Por otra parte, también puede ser utilizado como instrumento de conservación *ex situ*, siendo las semillas el material de propagación adecuado para los distintos programas de conservación; ya que estas aseguran el mantenimiento de la diversidad genética y pueden ser empleadas para conformar bancos de germoplasma.

Dentro de las técnicas de propagación, la germinación *in vitro* se utiliza con éxito para muchas especies vegetales y ha demostrado ser superior en comparación a otras técnicas de germinación (Ghanbari *et al.*, 2012). Para esta se suele emplear algunos medios nutritivos con diferentes componentes y otros a base de solo agar y agua. Los medios nutritivos son combinaciones de sustancias químicas que tienen el propósito de proporcionar a la planta los nutrientes necesarios en las concentraciones adecuadas (Cañal *et al.*, 2001).

Uno de los medios más conocidos y utilizados para la micropropagación es el medio planteado por Murashige y Skoog (1962) o MS, el cual contiene los requerimientos nutricionales necesarios para la mayoría de las especies vegetales como son: macronutrientes, micronutrientes, sales inorgánicas, carbohidratos, vitaminas y aminoácidos (Rodríguez *et al.*, 2004). Es importante mencionar que el medio MS presenta una elevada concentración salina, debido a las altas concentraciones de iones amonio NH_4^+ (20.6 mM), iones nitrato NO_3^- (39.4 mM), iones cloro Cl^- (6.0 mM) y MoO_4^- (1.0 mM); sin embargo, contiene concentraciones de Ca (3.0 mM), PO_4^- (1.3 mM), Mg^+ (1.5 mM) y Cu^{++} (0.1 mM) relativamente bajas en comparación con otros medios de cultivo (Martínez-Villegas *et al.*, 2015). En algunos casos los iones fosfato provenientes del medio MS son absorbidos de manera más rápida que otros iones, e incluso pueden agotarse antes de completarse las dos semanas de cultivo (George, 2008).

Además de los macronutrientes y micronutrientes, es común la incorporación de compuestos naturales a los medios de cultivo. Contreras (2016); Moreno & Menchaca (2007) y Salazar *et al.*, (2013) señalan que la adición de complejos orgánicos naturales a los medios, entre los que destacan: el agua de coco, extracto de tomate, extracto de piña, extracto de plátano entre otros; favorece la germinación y desarrollo de las plántulas. Por otro lado, George *et al.*, (2008) indican que se debe restringir el uso de este tipo de componentes ya que se tiene poco control o conocimiento acerca de su composición exacta, la cual puede variar cualitativamente y cuantitativamente dependiendo de la edad y particularidad de la planta de la cual fue obtenido.

Dentro de los compuestos orgánicos adicionados a los medios de cultivo, el agua o endospermo líquido de coco es uno de los más importantes debido a que posee un alto contenido de azúcares, aminoácidos, antioxidantes, minerales, ácidos orgánicos y agentes promotores del crecimiento (Moreno & Menchaca, 2007). Los efectos en la germinación y el crecimiento producidos por el agua de coco se deben a la presencia de fitohormonas como citoquininas, zeatinas, kinetinas y purinas (Yong *et al.*, 2009; Taiz & Zeiger, 2002).

La presente investigación pretende demostrar la germinación en condiciones *in vitro* de *D. caryophyllus* utilizando tres diferentes medios de cultivo: medio MS, medio con agua de coco y medio con extracto de papa y comparar cuál de estos es el más efectivo para su desarrollo.

MATERIAL Y MÉTODOS

a. Obtención de material biológico.

Se utilizaron semillas certificadas de *D. caryophyllus* "clavel" var. Chabaud blanco de la marca Hortus.

b. Preparación de medios de cultivo.

Se utilizaron tres medios de cultivo: el medio Murashige y Skoog (MS, 1962) y dos con componentes naturales, agar con agua de coco (AC) y agar con extracto de papa (EP).

- **Medio Murashige y Skoog (MS).** Para la preparación del medio MS se agregaron soluciones estandarizadas de macronutrientes, micronutrientes y vitaminas (Tabla 1). Luego se añadió 3.6 g de azúcar comercial y se calentó la mezcla, se midió el pH a 5.6. Finalmente, se agregó 3.6 g de agar y agua destilada para aforar la mezcla a 120 ml y se dispensó el medio en los frascos, se tapó estos con papel aluminio y se esterilizaron los medios en la autoclave por 30 minutos y a 1 atm. de presión.

- **Agar con agua de coco (AC).** Con un cuchillo de cocina esterilizado, se realizó una abertura en el poro de germinación funcional de un ejemplar de *Cocos nucifera* L. (Arecaceae) en estado inmaduro para extraer el endospermo líquido y colocarlo en un recipiente, luego se filtró el endospermo líquido con papel filtro Whatman N° 1. Se agregó 60 ml de endospermo y 3.6 g de agar, se calentó, agitó y aforó la mezcla con agua destilada. Finalmente se dispensó el medio en los frascos y se llevó a la autoclave para su esterilización.

Tabla 1. Macronutrientes, micronutrientes y vitaminas de las soluciones estandarizadas utilizadas para elaborar el medio MS (1962).

Soluciones	Macronutrientes y micronutrientes
Solución A	NH ₄ NO ₃ , KNO ₃ , CaCl ₂ .2H ₂ O
Solución B	MgSO ₄ .7H ₂ O, KH ₂ PO ₄
Solución C	KI, H ₃ BO ₃ , MnSO ₄ .H ₂ O
Solución D	ZnSO ₄ .7H ₂ O
Solución E	Na ₂ MoO ₄ .H ₂ O
Solución F	CuSO ₄ .5H ₂ O, CoCl ₂ .6H ₂ O
Solución G	FeSO ₄ .7H ₂ O, Na ₂ EDTA
	Vitaminas
	Tiamina
	Piridoxina
	Glicina
	Ácido nicotínico
	Mio-inositol

- **Agar con extracto de papa (EP).** Se cortaron los tubérculos de papa amarilla en forma de cubos y se pesaron 20 g de estos, los cuales se colocaron en un matraz con agua destilada hirviendo hasta obtener una papilla. El filtrado se utilizó para preparar el medio de cultivo al cual se agregó gradualmente 3g de agar. Finalmente se aforó la mezcla a 100 ml con agua destilada y se dispensó en 6 frascos de boca ancha que fueron cubiertos con tapas de papel aluminio y forradas con papel para luego ser autoclavados.

Tabla 2. Composición general de los diferentes medios de cultivo trabajados

Medio	M&S	AC	EP
Componentes			
Macronutrientes	Si	--	--
Micronutrientes	Si	--	--
Vitaminas	Si	--	--
Fito hormonas	--	Si	--
Almidones	--	--	Si
Sacarosa	Si	Si	Si

c. Desinfección y siembra de semillas *in vitro*.

Previo a la siembra, se realizó una desinfección de las semillas colocándolas *en agua estéril por 30 segundos, luego en hipoclorito de sodio al 2.5% por 2 minutos y finalmente en etanol al 70% por 30 segundos, enjuagando con agua estéril al finalizar cada uno.* La siembra se realizó en condiciones de asepsia en la cámara de siembra y se distribuyeron 10 semillas con ayuda de pinzas de disección estériles dentro de los frascos con medio de cultivo para cada uno de los tratamientos.

Los recipientes de cultivo con semillas se colocaron en la sala de incubación bajo intensidad luminosa de focos fluorescentes de 40 w a un fotoperiodo de 16:8.

d. Evaluación de la germinación.

Para evaluar la germinación *in vitro* se registró diariamente el número de semillas germinadas desde el tercer hasta el sexto día posterior a la siembra. Luego se procedió a determinar el porcentaje de germinación (%G), el índice de germinación (IG) y la velocidad de germinación (VG).

- **Evaluación del porcentaje de germinación (%G).** Se calculó teniendo en cuenta el número de semillas germinadas, respecto al número inicial de semillas puestas a germinar.

- **Evaluación del Índice de germinación (IG).** El índice de germinación es definido como la medida del tiempo de germinación en relación con la capacidad germinativa. Se calculó mediante la ecuación:

$$IG = \frac{\sum(n_i t_i)}{N}$$

Donde: **IG** = índice de germinación; **n_i**= número de semillas germinadas en el día **i**; **t_i** = número de días después de la siembra; **N**= total de semillas sembradas. (Enríquez-Peña y col., 2004).

- **Evaluación de la velocidad de germinación (M).** La velocidad de germinación (**M**), definida como la relación del número de semillas germinadas con el tiempo de germinación. Se calculó mediante la ecuación:

$$M = \sum \frac{(n_i)}{t}$$

Dónde: **M**= velocidad de germinación; **t** = tiempo de germinación desde la siembra hasta la germinación de la última semilla; **n_i**= número de semillas germinadas en el día **i** (Enríquez-Peña *et al.*, 2004).

e. Análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente aleatorio con 6 repeticiones, cada una con 10 semillas en tres tratamientos. Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) y posteriormente las medias se compararon utilizando la prueba Tukey para determinar las diferencias significativas entre cada uno de los medios. Se utilizó el programa estadístico INFOSTAT.

RESULTADOS

De acuerdo con la figura 1, el medio de agar con agua de coco (AC) presentó el número promedio de semillas germinadas más elevado tanto al tercer como al sexto día, seguido del medio MS.

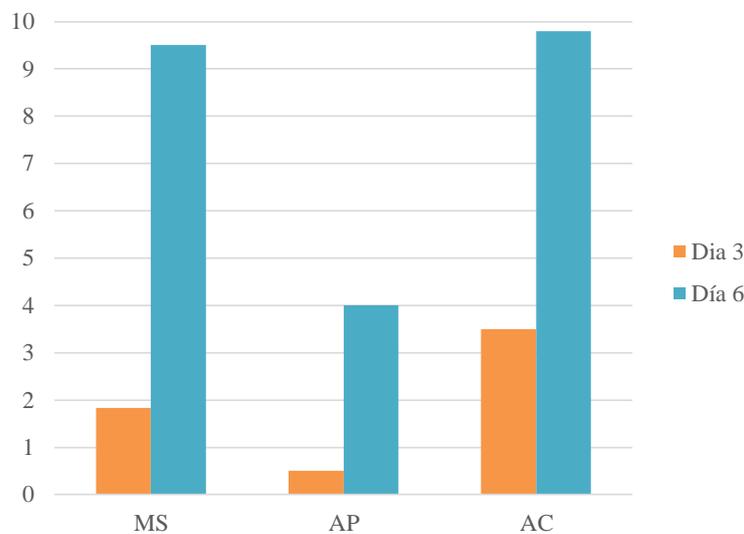


Fig. 1. Promedio del número de semillas germinadas al tercer día y al sexto día en 3 medios de cultivo (MS= Medio MS; AP= Medio agar con extracto de papa; AC=Medio agar con agua coco).

En la tabla 3 se puede observar que los valores del porcentaje de germinación, índice de germinación y velocidad de germinación fueron más elevados en el medio de agar con agua de coco (%G=98%; IG=14,18 y M=6,24) y en el medio MS (%G=95; IG=12,02 y M=4,86) en comparación con el medio de agar con extracto de papa (AP), que presentó un porcentaje de germinación de 40%, un índice de germinación de 4.18 y una velocidad de germinación de 1.59.

Tabla 3. Porcentaje de germinación (%G), índice de germinación (IG) y Velocidad de germinación (M) de *D. caryophyllus* en tres medios de cultivo al sexto día de la siembra.

	MS	AP	AC
% G	95	40	98
IG	12,02	4,18	14,18
M	4,86	1,59	6,24

MS= Medio MS; AP= Medio agar con extracto de papa; AC=Medio agar con agua de coco

Tabla 4. Análisis de Varianza para el número de semillas germinadas de *D. caryophyllus* en diferentes medios de cultivo.

F.V.	SC	gl	CM	Valor F	p-valor
Modelo	128.78	2	64.39	93.47	0.0001
Tratamientos	128.78	2	64.39	93.47	0.0001
Error	10.33	15	0.69		
Total	139.22	17			

F.V.=Fuente de variación; SC=Suma de cuadrados; gl=Grados de libertad; CM=Cuadrado medio

Tabla 5. Test de Tukey para el número de semillas germinadas de *D. caryophyllus* en diferentes medios de cultivo.

Tratamientos	Medias	n	E.E.	
AP	4	6	0.34	A
MS	9.5	6	0.34	B
AC	9.83	6	0.34	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

El valor p obtenido en los tratamientos fue menor a 0.05 (Tabla 4), por lo tanto, se infiere que los tratamientos son distintos estadísticamente. Para determinar cuáles de los tratamientos son diferentes, se optó por aplicar un test de comparación de medias, en este caso el test de Tukey (Tabla 5), el cual indica que tanto el medio MS como el medio de agar con agua de coco (AC) son estadísticamente iguales entre sí pero diferentes al medio de agar con extracto de papa (AP).

DISCUSIÓN

El proceso de germinación de las semillas está influenciado tanto por factores internos como externos. Como factores externos se pueden mencionar: el grosor de la testa, disponibilidad de agua, temperatura, tipos de luz y la presencia de distintas sustancias en el ambiente donde se desarrollan (Russo *et al.*, 2010). Entre estas sustancias, se pueden mencionar algunas vitaminas del complejo B y la vitamina C, las cuales pueden relacionarse con una mayor germinación y desarrollo de plantas (García *et al.*, 2000) y diversas fitohormonas o fitorreguladores que pueden actuar como promotores o inhibidores de la respuesta germinativa (Jordán & Casaretto, 2006).

Yong (2009), analizó la composición química y las propiedades del endospermo líquido de coco, donde los cocos inmaduros presentaron cantidades significativas de iones inorgánicos como el hierro, fósforo, potasio, sodio y cloro; algunas vitaminas como la vitamina C, tiamina, riboflavina,

niacina, ácido pantoténico y piridoxina y fitohormonas como auxinas (ácido indolacético), citoquininas tanto isoprenoides como aromáticas (isopenteniladenina, zeatina, dihidrozeatina, trans-zeatina, kinetina entre otras) y giberelinas. La presencia de los componentes antes mencionados, sobre todo las fitohormonas, pueden estar relacionados con los elevados valores de porcentaje de germinación, índice de germinación y velocidad de germinación encontrados en el medio complementado con agua de coco ya que, durante el proceso de germinación, las fitohormonas actúan a diferentes niveles. (Molina, 2012) (Figura 1, Tabla 3).

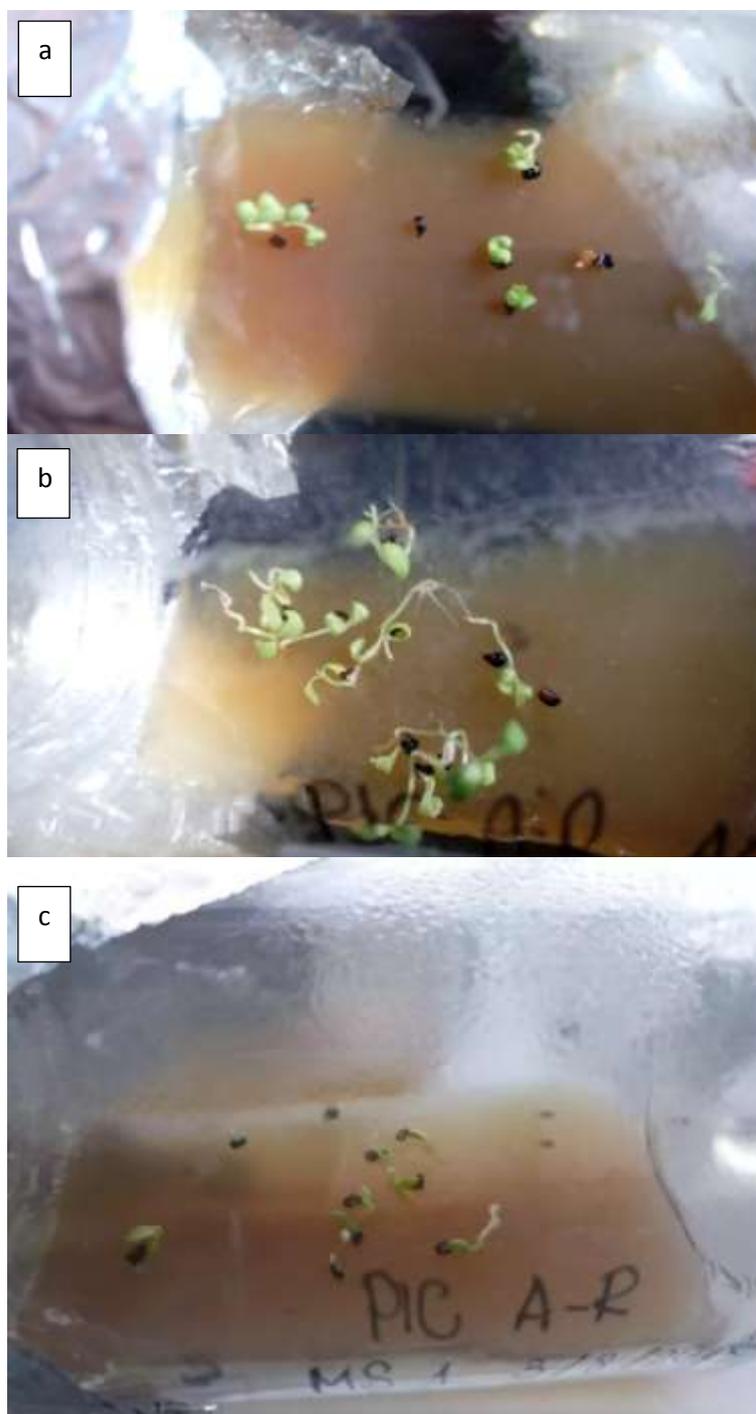


Fig. 2. Semillas germinando en EP (a), AC (b) y medio M&S (c)

Las giberelinas son las que más influyen en el proceso germinativo dado que están implicadas con el rompimiento de la latencia después de la imbibición de las semillas (Amador-Alferez *et al.*, 2013; Martínez-Díaz, 2011; Siobhan & McCourt, 2003). Esto se debe a que las giberelinas inducen la activación de genes relacionados con la síntesis de α -amilasas y otras enzimas hidrolíticas en la *Sagasteguiana* 3(1): Enero – Junio

capa de aleurona de las semillas, las cuales desencadenaran la degradación de las reservas de almidón en el endospermo para ser usados como fuente de energía por las células del embrión (Jordán & Casaretto, 2006; Mandujano *et al.*, 2007).

Las auxinas y citoquininas también ejercen cierta influencia sobre la germinación, aunque en menor medida que las giberelinas. En el caso de las auxinas, estas estimulan el desarrollo de raíces y promueven el alargamiento celular al estimular las síntesis de los componentes de la pared celular y mediante el incremento del contenido osmótico de la célula y la permeabilidad al agua, lo cual reduce la presión de la pared provocando un aumento en su plasticidad (Amador-Alferez y col., 2013; Barket y col., 2007; Chen y col., 2002; Perez-Guzmán y Quenta-Herrera, 2015).

Por otra parte, las citoquininas son importantes durante el desarrollo temprano de las semillas ya que se acumulan principalmente en el endospermo desde donde promueven la división celular en el embrión (Moreno y col., 2013), así como la ruptura de la dormancia y la germinación de semillas al estimular la elongación de las células de los cotiledones en respuesta a la luz (Quinto y col., 2009). De acuerdo con Patiño y col. (2011), las citoquininas del tipo isoprenoide, están implicadas en el proceso de división celular, y las aromáticas, en procesos postgerminativos.

Después del medio de agar con agua de coco (AC), el medio MS tuvo los parámetros de germinación más altos; esto debido a que el medio MS se destaca por contener diferentes concentraciones de iones. Los nutrientes de tipo mineral son altamente importantes en el metabolismo vegetal pues son constituyentes de estructuras orgánicas, activadores de reacciones enzimáticas, portadores de carga y osmorreguladores (Pérez-Jiménez, 2011). Por ejemplo el hierro es requerido por enzimas mitocondriales, en zonas de crecimiento y reproducción rápidos (Mengel y Kirkby, 2001). El manganeso activa enzimas que actúan durante el ciclo de Krebs, siendo su función específica la de la generación del oxígeno a partir del agua, mientras que los iones de Mg^{2+} activan enzimas implicadas en la respiración, fotosíntesis y activación de ADN y ARN. Por otro lado, el potasio cumple una doble función como activador de enzimas respiratorias y fotosintéticas, así como de osmorregulador (Taiz & Zeiger, 2002).

Finalmente, el bajo porcentaje de germinación, índice de germinación y velocidad de germinación encontrado en el medio agar con extracto de papa (EP) se puede deber a la composición del mismo ya que solo posee presencia de azúcares como el almidón, sustancia que está conformada por 79% amilopectina y 21% de amilosa (Hernández-Medina *et al.*, 2008), los cuales ya se encuentran presentes en el endospermo de la semilla de clavel y quizás su exceso sea un inhibidor de la germinación.

CONCLUSIONES

Los medios M&S y agua de coco (AC) fueron los más efectivos para la germinación de *D. caryophyllus*.

El porcentaje de germinación de *D. caryophyllus* en el medio artificial MS al sexto día fue de 95 %, en agua de coco (AC) y agar con extracto de papa (AP) al sexto día fue de 98 % y 40 % respectivamente.

El porcentaje de germinación de *D. caryophyllus* en el medio artificial MS fue estadísticamente igual al del medio natural agar con agua de coco (AC) pero diferente al del medio de agar con extracto de papa (AP)

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amador-Alfárez, K.; J. Díaz-González; S. Loza-Cornejo & Y. Bivián-Castro.** 2013. Efecto de diferentes reguladores de crecimiento vegetal sobre la germinación de semillas y desarrollo de plántulas de dos especies de *Ferocactus* (Cactaceae). *Polibotánica*, 35: 109-131.
- Barket, A.; I. Rani; S. Hayat & S. Ahmad.** 2007. Effect of 4-Cl-indole-3-acetic acid on the seed germination of *Cicer arietinum* exposed to cadmium. *Acta Bot. Croat*, 66: 57-65.
- Cañal, M.; R. Rodríguez; B. Fernández; R. Sánchez-Tames & J. Majada.** 2001. Fisiología del cultivo *in vitro*. *Bioteología vegetal 1*: 3-9.
- Castilla, Y.; M. González & R. Lara.** 2014. Determinación de estabilidad genética en vitroplantas de clavel español (*Dianthus caryophyllus* L.), micropropagadas con Biobras-16. *Cultivos Tropicales*, 35(1): 67-74. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S025859362014000100010&lng=es&tng=es. Recuperado el 29/08/2017.
- Chen, L.M., E.L. Cheng; T.J. Chen & Z.L. Liu.** 2002. Naphtaleneacetic acid suppresses peroxidase activity during the induction of adventitious roots in soybean hypocotyls. *Plant Physiology* 159: 1349-1354.
- Contreras, F.** 2016. *Desarrollo de métodos de propagación in vitro del alcaparro (Capparis spp.)*. [Tesis Maestría]. Aguascalientes, México: Universidad Autónoma de Aguascalientes. Facultad de Ciencias Básicas.
- De Olazabal, J.; J. Delpero & E. Flores.** 2013. *Planeamiento estratégico de las flores*. [Tesis Maestría]. Perú: Pontificia Universidad Católica del Perú. Escuela de Posgrado.
- El-Barghatgi, M. & A. El-Bakkosh.** 2005. *Effect of some mechanical and chemical pre-treatments on seed germination and seedling growth of Quercus coccifera (Kemes Oaks)*. Jordania: Jerash Private University.
- Enríquez-Peña, E.; H. Suzán-Azpiri & G. Malda-Barrera.** 2004. Viabilidad y germinación de semillas de *Taxodium mucronatum* (Ten.) en el estado de Querétaro, México. *Agrociencia*, 38(003): 375-381.
- Figaredo, M.** 2014. *Evaluación del desarrollo y las características morfológicas de una línea F4 de clavel (Dianthus caryophyllus)*. [Tesis Titulación]. Colombia: Universidad Militar Nueva Granada. Facultad de Ciencias Básicas y Aplicadas.
- García, J.; A. Valerín & R. Salazar.** 2000. Utilización de 3 medios orgánicos para la germinación *in vitro* de semillas de "guaria morada", *Cattleya skinneri* (Bateman). *UNICIENCIA* 17: 79-83.
- George, E.; M. Hall & G. De Klerk.** 2008. *The Components of Plant Tissue Culture Media I :Macro- and Micro-Nutrients* [summary]. Plant Propagation by Tissue Culture. Volume 1. The Background (3rd):65-114.
- Ghanbari, T.; B. Hosseini & Z. Jabbarzadeh.** 2012. Improving *Salvia sclarea* L. seed germination under *in vitro* condition. *International Journal of Agriculture: Research and Review* 2 (5): 1051-1058. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20133031538>. Recuperado el 28/11/2017.
- Hernández-Medina, M.; J. Torruco-Uco; L. Chel-Guerrero; D. Beancur-Ancona.** 2008. Caracterización fisicoquímica de almidones de tubérculos cultivados en Yucatán, México. *Ciencia e Tecnología de Alimentos* 28 (3):718-726.
- Herrero, M.** 2000. *Multiplicación del clavel para flor cortada*. Madrid, España: Ministerio de Agricultura.
- Jimenez-Mariña, L.; J. Silva-Pupo; M. Borges-García & M. Fonseca-Arias.** 2016. Conservación *in vitro* del cultivo de clavel español (*Dianthus caryophyllus* L.) a partir de sales minerales. *Agronomía Mesoamericana*, 27 (1): 177-181. doi: 10.15517/am.v27i1.21897
- Jordán, M. & J. Casaretto.** 2006. *Fisiología Vegetal*. Chile: Universidad de La Serena.

- Mandujano, M.; J. Golubov & M. Rojas-Arechiga.** 2007. Efecto del ácido giberélico en la germinación de tres especies del género *Opuntia* (Cactaceae) del Desierto Chihuahuense. *Cactaceas y suculentas mexicanas*, 52(2):46-52.
- Martínez-Díaz, G.** 2011. El ácido giberélico incrementa la germinación prematura en el nogal pecanero (*Carya illinoensis* Koch). *TECNOCIENCIA Chihuahua*, 5 (3):148-155. [http://tecnociencia.uach.mx/numeros/v5n3/data/El_acido_giberelico_incrementa_la_germinacion_prematura_en_el_nogal_pecanero_\(Carya_illinoensis_Koch\).pdf](http://tecnociencia.uach.mx/numeros/v5n3/data/El_acido_giberelico_incrementa_la_germinacion_prematura_en_el_nogal_pecanero_(Carya_illinoensis_Koch).pdf). Recuperado el 27/11/2017.
- Martínez-Villegas, Y.; M. Andrade-Rodríguez; C. Colinas-León; O. Villegas-Torres; A. Castillo-Gutiérrez & Y. Alía-Tejagal.** 2015. Efecto de las sales inorgánicas del medio de cultivo en el crecimiento de pasquita (*Euphorbia leucocephala* Lotsy). *Rev. Fitotec. Mex* 38(4): 369-374. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S018773802015000400004. Recuperado el 27/09/2017.
- Masías, J.** 2003. *Promoción de la exportación de flores ornamentales de la sierra piurana*. [Tesis Bachiller]. Universidad de Piura. Facultad de Ciencias Económicas y Empresariales.
- Mengel, K. & E. Kirkby.** 2001. *Principles of Plant Nutrition* (5th). Berlin, Germany: Kluwer Academic Publishers.
- Molina, J.** 2012. *Evaluación de cinco medios de cultivo (Phytamax, Murashige y Skoog, Knudson, Lindemann y Casero) y tres dosis de auxina y citoquinina para la germinación de semilla en *Comparetia speciosa**. [Tesis Bachiller]. Ecuador: Universidad de Cuenca. Facultad de Ciencias Agropecuarias.
- Moreno, D. & R. Menchaca.** 2007. *Efecto de los compuestos orgánicos en la propagación in vitro de *Stanhopea tigrina* Bateman (Orchidaceae)*. *Foresta Veracruzana*, 9 (2):27- 32. <http://www.redalyc.org/pdf/497/49790204.pdf>. Recuperado el 28/11/2017.
- Moreno, N.; D. Miranda & F. Martínez.** 2013. *La zeatina fomenta la germinación de semillas de anón (*Annona squamosa* L.)*. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 7 (1): 9-19. doi: 10.17584/rcch.2013v7i1.2031
- Morisigue, D.; D. Mata; G. Facciuto & L. Buldrich.** 2012. *Floricultura: pasado y presente de la Floricultura Argentina*. Buenos Aires: INTA.
- Muñoz, J.** 2001. *Evaluación de la producción de plántulas de clavel (*Dianthus caryophyllus* L. var. *Chabaud Picotee*) a partir de semilla en dos sustratos mezclados en cuatro proporciones diferentes, en la comuna de Quilpue, quinta región, Chile*. [Tesis Titulación]. Chile: Universidad del Mar. Escuela de Agronomía.
- Murashige, T. & F. Skoog.** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 15: 473-497.
- Patiño, C.; F. Mosquera & R. Tulio.** 2011. Efecto inductor del agua de coco sobre la germinación de semillas y brotamiento de los cormos de la hierba de la equis *Dracontium Grayumianum*. *Acta biol. Colomb.*, 16 (1): 133 – 142.
- Pérez-Jiménez, S.J.** 2011. *Análisis de crecimiento y comportamiento de los nutrientes en clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) variedad Delphi en un sistema de cultivo en sustrato en la sabana de Bogotá*. [Tesis Maestría]. Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Agronomía.
- Perez-Guzmán, J. & E. Quenta-Herrera.** 2015. Germinación in vitro de embriones de Nogal (*Juglans boliviana*). *Journal of the Selva Andina Biosphere*, 3(1): 15-23.
- Quinto, L.; P. Martínez-Hernández; L. Pimentel-Bribiesca & D. Rodríguez-Trejo.** 2009. Alternativas para mejorar la germinación de semillas de tres árboles tropicales. *Revista Chapingo serie ciencias forestales y del ambiente*, 15(1), 23-28. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S200740182009000100003&lng=es&tlng=es. Recuperado el 05/12/2017.

- Rodriguez, A.; A. Rodriguez; S. Quintero; M. Torres & Z. Fundora.** 2004. Influencia de los medios de cultivo en la micropropagación de plátano (*Musa* spp.) y malanga (*Xantshosoma sagittifolium* Schoot). *Cultivos Tropicales*, 25(1):23-26.
- Roychowdhury, R.; A. Ferdousul; S. Bishnu; T. Dalal & J. Tah.** 2012. Comparative study for effects of chemical mutagenesis on seed germination, survivability and pollen sterility in M₁ and M₂ generations of *Dianthus*. *Plant Breeding and Seed Science*, 65(1):29-38.
- Russo, V., V. Bruton & C. Sams.** 2010. Classification of temperature response in germination of Brassicas. *Industrial Crops and products*, 31: 48-51.
- Salazar, S.; A. Amaya & F. Barrientos.** 2013. Evaluación de diferentes medios de cultivo *in vitro* en el desarrollo de híbridos de Phalaenopsis (Orchidaceae). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 15 (2): 97-105.
- Siobhan, M. & P. McCourt.** 2003. Hormone Cross-Talk in Seed Dormancy. *J. Plant Growth Regul.*, 22: 25-31.
- Taiz, L. & E. Zeiger.** 2002. *Plant physiology*. (3rd). England: Sinauer Associates.
- Yong, A. 2010. La Biodiversidad Florística en los sistemas agrícolas. *Cultivos tropicales*, 31(4): 17-21.
- Yong, J.; L. Ge; Y. Fei & S. Tan.** 2009. The Chemical Composition and Biological Properties of Coconut (*Cocos nucifera* L.). *Water. Molecules*, 14: 5144.

