

EL CULTIVO *in vitro* DE YEMAS AXILARES DE PAPAYA (*Carica papaya* L.). I. EFECTO DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO SOBRE LA CONTAMINACIÓN INICIAL DE EXPLANTES

*Guillermo Sancho*¹
*Eric Guevara*²

ABSTRACT

***In vitro* culture of lateral buds of papaya (*Carica papaya* L.). I. Effect of culture conditions on the initial contamination of the explants.** The effect of different factors (disinfection, culture medium, liquid or solid condition and date of culturing) was studied on the establishment *in vitro* of apex and lateral buds of papaya. Adult hermaphrodite plants of cv. Sunrise were used.

Out of the three culture media evaluated (Litz, 1978; Guevara, 1981; De Winnaar, 1988), the one developed by De Winnaar in liquid conditions produced the best development of the explants. Litz medium favored the development of callus. Variations on the development of the explants were observed depending on the culture medium used and of the date of culturing. The importance of disinfection and of the culture medium is discussed.

INTRODUCCIÓN

El cultivo de la papaya tiene mucha importancia para los pueblos de los trópicos por ser una especie productora de frutas durante todo el año. En los últimos años su cultivo ha adquirido cada vez más importancia en Costa Rica, ya que las perspectivas para la exportación de esta fruta son promisorias (Mora³). Sin embargo, al tratar el cultivo en gran escala se presentan varios problemas. Prácticamente el único medio comercial conocido de propagar esta especie es a través de la semilla sexual (Nakasone, 1978; Storey, 1953, 1969), y como la mayoría de las plantaciones no se pueden mantener económicamente por más de dos o tres años de cosecha, un suministro constante de semilla de cultivares con características deseables

¹ Programa Fruticultura, Estación Experimental Fabio Baudrit Moreno, Facultad de Agronomía, Universidad de Costa Rica. Apartado postal 183-4050 Alajuela.

² Escuela de Fitotecnia, Universidad de Costa Rica. El autor es beneficiario del Programa de Apoyo a Investigadores del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT).

³ Mora, Denis. Universidad de Costa Rica, Facultad de Agronomía, Escuela de Fitotecnia (Comunicación personal).

es importante. Pero, por la forma en que está controlado el sexo en la papaya, bajo polinización libre inclusive los cultivares estabilizados pierden pronto su identidad individual. En las razas dioicas esta situación se agrava a causa del genotipo desconocido del fenotipo masculino (Nakasone, 1978; Storey, 1953). Otro problema lo constituyen las enfermedades virales, contra las cuales no se ha encontrado resistencia apreciable dentro de la especie. Si bien especies afines presentan grados de resistencia o tolerancia a los virus (Tsay; Su, 1985) existen problemas de incompatibilidad con la especie *C. papaya*. Por lo tanto se considera generalmente que el único modo de combate consiste en la eliminación de las plantas enfermas (Litz; Conner, 1978; Storey, 1969). Todas estas características de la especie representan una barrera para el mejoramiento genético y explican, en gran medida, la ausencia de verdaderas variedades de este cultivo. La posibilidad de contar con métodos asexuales para su propagación es muy atractiva, ya que permitiría superar esos inconvenientes al hacer factible la búsqueda de tipos superiores y su proliferación clonal en forma masiva. Los métodos convencionales, como el enraizamiento de estacas (Allan, 1964) o la injeración (Sookmask, 1975) han sido intentados pero con poco éxito.

Intentos realizados para la regeneración de plantas *in vitro* a partir de callo (Akora y Singh, 1978; Jordan et al., 1983; Litz y Conner, 1981) han tenido poco éxito y con el inconveniente de la gran variabilidad genotípica de las plantas obtenidas a partir de callo. La alternativa que puede evaluarse es el empleo de yemas apicales o axilares de las cuales la información disponible indica que son un buen material de propagación (Drew, 1988; Litz y Conner, 1978, 1981). Para ello se deben superar tres tipos de problemas: primero, el cultivo de tejidos de planta adulta con características hortícolas conocidas es más difícil que el de plantas juveniles (Rajeevan y Pandey, 1986). Segundo, se ha informado de la pérdida de la capacidad de proliferación del material después de varios subcultivos y de variaciones importantes en la respuesta entre genotipos (Litz y Conner, 1981). Por último, la obtención de material libre de contaminantes, tales como bacterias y hongos que destruyen, por proliferación en el medio, los tejidos cultivados *in vitro*, representa una limitación muy seria para el buen desarrollo de las fases subsiguientes (Guevara, 1981; Litz y Conner, 1981; Drew, 1988; Debergh y Maene, 1984).

Estas consideraciones, en conjunto, sugieren la necesidad de investigar en las condiciones locales, para poder contar con un sistema predecible y confiable que permita la propagación clonal de la papaya.

El presente trabajo forma parte de un proyecto, cuyo objetivo es la constitución de técnicas para la propagación clonal *in vitro* de la papaya. Los problemas iniciales, que se presentan al intentar el establecimiento de las yemas en condiciones asépticas son de tal magnitud que merecen una consideración especial, cuyas principales implicaciones son señaladas en este estudio.

MATERIALES Y METODOS

Las pruebas iniciales de desinfección fueron realizadas en el laboratorio de cultivo de tejidos del Centro de Investigaciones Agronómicas. Las pruebas de evaluación de la respuesta a los medios de cultivo

fueron realizadas en el laboratorio de cultivo *in vitro* y microbiología del Centro para Investigaciones en Granos y Semillas.

El material vegetal utilizado en este trabajo provino de plantas hermafroditas de la variedad Sunrise cultivadas en la zona del distrito de San José en Alajuela, cuya edad inicial fue siete meses de edad. Entre los meses de junio de 1988 y abril de 1989 se llevaron a cabo una serie de experimentos, los cuales se iniciaron con evaluaciones de métodos de desinfección, con el fin de determinar la tasa de sobrevivencia Y respuesta del material según el mes en que fue colectado. Para la realización de la pruebas de desinfección se utilizaron yemas provenientes de brotes laterales formados sobre el tallo principal de la papaya. Los brotes se colectaron y se depositaron en una bolsa plástica humedecida con papel toalla embebido con agua y sellada posteriormente. Luego fueron llevados al laboratorio en donde se seccionaron en porciones de uno o dos nudos y se colocaron en un "beaker" bajo un grifo de agua, dejando correr el agua por espacio de 30 minutos con el fin de reducir la secreción de latex. Transcurrido este tiempo fueron sumergidos por un minuto en alcohol de 95°, después de lo cual los explantes se sometieron a los diferentes tratamientos de desinfección. Independientemente del producto empleado, se utilizó un humectante, Tween 80 (1 cc/l) en combinación con el agente desinfectante (hipoclorito de sodio, hipoclorito de calcio y cloruro de mercurio). Realizado este proceso, los explantes fueron transportados a una cámara de flujo laminar en donde fueron enjuagados tres veces en agua destilada estéril. Las yemas apicales y axilares fueron extraídas de los nudos por disección bajo un estereoscopio y luego depositadas sobre el medio de cultivo.

Una vez realizado el tratamiento de desinfección se utilizó el protocolo recomendado por Litz y Conover (1978) para la escogencia del medio de cultivo y cada semana se evaluó la sobrevivencia de explantes, la contaminación por hongos o bacterias y el tipo de respuesta del material vivo. En todos los casos se utilizó un mínimo de 50 explantes por tratamiento.

Con base en el procedimiento de desinfección más adecuado, se estableció cada mes un grupo de 50 explantes en tres diferentes medios de cultivo de naturaleza sólida y líquida y se procedió a evaluar cada semana de la misma forma que en las pruebas de desinfección. Los tres medios utilizados en la fase de establecimiento fueron los descritos por Guevara (1981) (MS adicionado de 1 mg/l de Kinetina); Litz y Conover (1978)(MS adicionado de 1,1 mg/l Kinetina; 1,81 mg/l de ANA) y De Winaar (1988) (MT adicionado de 0,5 mg/l de BAP; 0,2 mg/l de ANA). Todos los medios de cultivo estudiados fueron evaluados tanto en condición sólida (agar, 8 g/l) como en condición líquida (uso de puentes de papel de filtro) y fueron depositados en tubos de ensayo de 18 mm por 150 mm y sellados con tapas plásticas blancas opacas.

En todos los casos el pH del medio fue ajustado a 5,8 antes de ser esterilizado a 1,05 kg/cm² a 120°C durante 20 minutos.

Una vez establecidos, los cultivos se mantuvieron en una cámara de crecimiento bajo condiciones controladas de intensidad lumínica (3500 lux), temperatura (22-26 °C) y humedad relativa (60-80%) con un periodo luminoso de 12 horas diarias.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Pruebas de desinfección:

El Cuadro 1 muestra los resultados obtenidos con el cloruro de mercurio. Se puede observar que si bien un aumento en la concentración del producto así como en el tiempo de exposición disminuyen la contaminación; el número de explantes sobrevivientes fue muy bajo. La contaminación observada fue causada en su mayoría por bacterias, lo que parece sugerir que el compuesto afectó principalmente el desarrollo de hongos. Muy útil en semillas y materiales lignificados, el cloruro de mercurio ha resultado tóxico en algunas especies (Street, 1977). Los resultados obtenidos indican que sólo 3 a 12 de cada 100 cultivos sobreviven después de dos semanas, lo que parece sugerir que en el caso de la papaya el cloruro mercuríco produce un efecto de fitotoxicidad.

CUADRO 1. Efecto de tres concentraciones de cloruro de mercurio y tres tiempos de desinfección sobre la contaminación y sobrevivencia de yemas de papaya C.v. sunrise *in vitro* al cabo de dos semanas. Junio 1988.

Tratamiento % HgCl ₂	Tiempo (minutos)	contaminación %	Sobrevivencia explantes(%)*
0,10	10	92,5	43,0
0,10	15	84,5	40,5
0,10	20	86,0	47,5
0,15	10	73,5	45,0
0,15	15	80,0	39,0
0,15	20	82,5	26,5
0,20	10	86,0	38,5
0,20	15	80,0	23,5
0,20	20	81,5	23,0

* % de explantes vivos, excluidos los que se contaminaron.

El Cuadro 2 muestra el efecto del hipoclorito de calcio sobre la contaminación y sobrevivencia de ye-

mas axilares de papaya. Al igual que con el desinfectante anterior se nota que el número de cultivos contaminados disminuye conforme se aumenta la concentración y el tiempo de tratamiento. El mejor resultado, obtenido con una concentración de 10% y un tiempo de exposición de 20 minutos, permite obtener una contaminación significativamente menor (63%) que la obtenida con el cloruro mercúrico (73%). Sin embargo, se puede notar una casi ausencia de explantes vivos, inclusive en comparación con este último desinfectante. El hipoclorito de calcio, ha sido recomendado con frecuencia, por presentar una menor toxicidad que el hipoclorito de sodio (Street, 1977). En zonas templadas, se ha utilizado con éxito y en algunos cultivos tropicales como el café (Berthouly⁴); sin embargo, ya se han presentado casos de incompatibilidad. Otras observaciones parecen sugerir que su acción efectiva requiere de procedimientos de desinfección más elaborados, tales como infiltración con vacío (Berthouly⁴). Los resultados obtenidos muestran que en las condiciones de este trabajo, el hipoclorito de calcio causa fitotoxicidad en los tejidos de papaya.

CUADRO 2. Efecto de dos concentraciones de hipoclorito de calcio y tres tiempos de desinfección sobre la contaminación y sobrevivencia de yemas de papaya cv. sunrise *in vitro* al cabo de dos semanas. Junio 1988.

Tratamiento % CaOCl ₂	Tiempo (minutos)	Contaminación %	Sobrevivencia explantes(%)*
8	10	100,0	0,0
8	15	100,0	0,0
8	20	90,0	0,0
10	10	92,0	5,5
10	15	84,5	0,0
10	20	63,5	0,0

* % de explantes vivos, excluidos los que se contaminaron.

El Cuadro 3 muestra la respuesta obtenida cuando se emplearon cinco concentraciones de hipoclorito de sodio con un tiempo de exposición de diez minutos. Nuevamente, como en el caso de los desinfectantes anteriormente utilizados, se observa una disminución de la contaminación con el aumento de la concentración del producto. La dosis de 0,5% fue totalmente inefectiva. Concentraciones comprendidas entre 1 y 1,25% permitieron obtener el menor número de tubos contaminados, con valores comprendidos entre 32 y 40% de explantes no infectados. Sin embargo, de los datos de sobrevivencia del Cuadro 3 se puede notar que conforme la concentración del producto aumenta, disminuye el número de explantes vivos después de dos semanas, siendo este efecto drástico con dosis superiores a 1% de producto activo. En base a los dos criterios anteriores, el mejor tratamiento lo constituye el uso de hipoclorito de sodio al 1% que, si

⁴ Berthouly, M. Promecafé, Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (Comunicación personal).

bien tiene una mayor contaminación inicial (67%) con respecto a la dosis de 1,25% (61%), el número de explantes vivos (87%) es superior al obtenido con la mayor concentración (55%).

CUADRO 3. Efecto de cinco concentraciones de NaOCl sobre la contaminación inicial y respuesta de yemas de papaya C.V. Sunrise al cabo de dos semanas. Junio 1988.

Tratamiento % NaOCl	Contaminación %	Sobrevivencia explantes (%)*
0,50	100,00	0,00
0,75	93,00	90,00
1,00	67,50	87,50
1,25	61,50	55,00
1,50	64,00	36,50

* % de explantes vivos, excluidos los que se contaminaron.

Un aspecto de interés es el tiempo de desinfección que se utilice. Del Cuadro 4, en donde se presenta el efecto de tiempos de exposición variables al hipoclorito de sodio al 1%, se puede notar que una inmersión de los explantes por periodos comprendidos entre 15 y 20 minutos es apropiado para lograr tanto el mayor número de cultivos libres de contaminantes como el de explantes vivos.

Los resultados obtenidos indican que en este estudio el mejor tratamiento para la desinfección de explantes es a través del hipoclorito de sodio. Este compuesto ha dado mejores resultados en condiciones tropicales que el cloruro mercúrico y el hipoclorito de calcio, aunque tenga menor efecto sobre las bacterias (Oviedo y Guevara, 1988). Varios laboratorios han recomendado este producto ya que han obtenido mejores resultados.

CUADRO 4. Efecto del tiempo de desinfección con hipoclorito de sodio (1%) sobre la contaminación inicial de papaya C. V. sunrise *in vitro* al cabo de dos semanas. Junio 1988.

Tratamiento % NaOCl	Tiempo (minutos)	contaminación %	Sobrevivencia explantes (%)*
1,00	10	72,00	96,50
1,00	15	60,50	90,00
1,00	20	55,50	92,50
1,00	25	59,00	71,00
1,00	30	38,50	54,50

* % de explantes vivos, excluidos los contaminados.

Evolución de la contaminación inicial de los cultivos:

Con base en los experimentos anteriores se decidió utilizar como agente desinfectante de rutina el hipoclorito de sodio en una concentración al 1% , con un tiempo de exposición de 20 minutos. A su vez se decidió evaluar el efecto de la condición física del medio (sólida o líquida) sobre el desarrollo inicial de bacterias y hongos en los medios de cultivo. La Figura 1 muestra los resultados obtenidos en tres medios de cultivo. Se puede notar que en general la presencia de bacterias representó el contaminante inicial más importante en condición sólida. Al utilizar un medio líquido se notó una disminución fuerte en la presencia de bacterias. En cuanto a la contaminación por hongos en medio líquido, no sobrepasó en ningún caso el 20% de los cultivos establecidos. Es posible que la lenta exposición del explante al medio, que se da por difusión en un puente de papel, sea menos favorable para la proliferación de bacterias, que cuando el explante se encuentra directamente en medio sólido. En este último, además, tanto bacterias como hongos pueden movilizarse más rápidamente por deslizamiento sobre la superficie al moverse el frasco. Además, en la condición sólida, existe mayor disponibilidad de oxígeno dentro del agar (Debergh y Maene, 1984). Debido a que en el medio líquido se obtuvieron mejores resultados, se utilizó para determinar las diferencias en la contaminación total que se produce a lo largo del año. Además de este factor, se ha observado un mejor desarrollo de los explantes en la condición líquida, lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Guevara (1981).

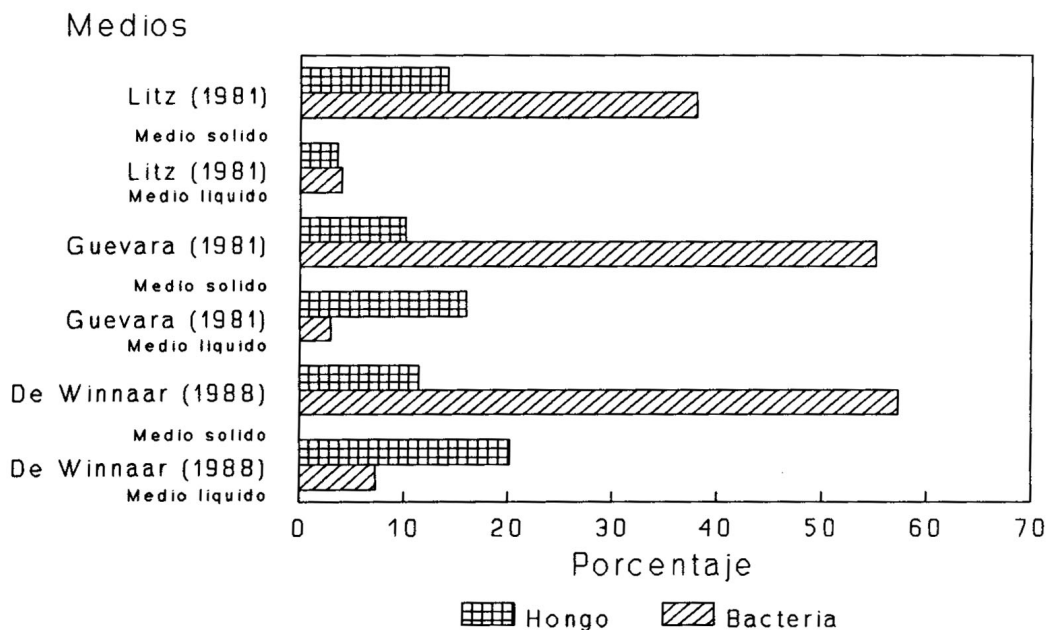


FIGURA 1. Diferencia en la causa de la contaminación inicial según el medio de cultivo descrito por autores utilizado para papaya. Julio 1988.

La Figura 2 ilustra la evolución del porcentaje de contaminación en explantes establecidos *in vitro* mensualmente durante el período comprendido entre junio de 1988 y abril de 1989. La mayor contaminación corresponde al período comprendido entre agosto y diciembre, meses de mayor precipitación, lo que favorece el salpique y una mayor humedad relativa, estimulando el desarrollo de microorganismos. Al haber mayor agua que se desliza por el tronco de la planta, se favorece una mayor acumulación de microorganismos en los espacios intersticiales alrededor de las yemas axilares y entre los primordios foliares de las mismas, lo cual en ocasiones dificulta una desinfección adecuada sin matar el explante. Es así que en noviembre prácticamente se perdió la totalidad de los frascos. Al avanzar la época seca (enero a abril) se notó una disminución de la contaminación, de manera que al final de esta época, menos del 20% de los cultivos se contaminaron.

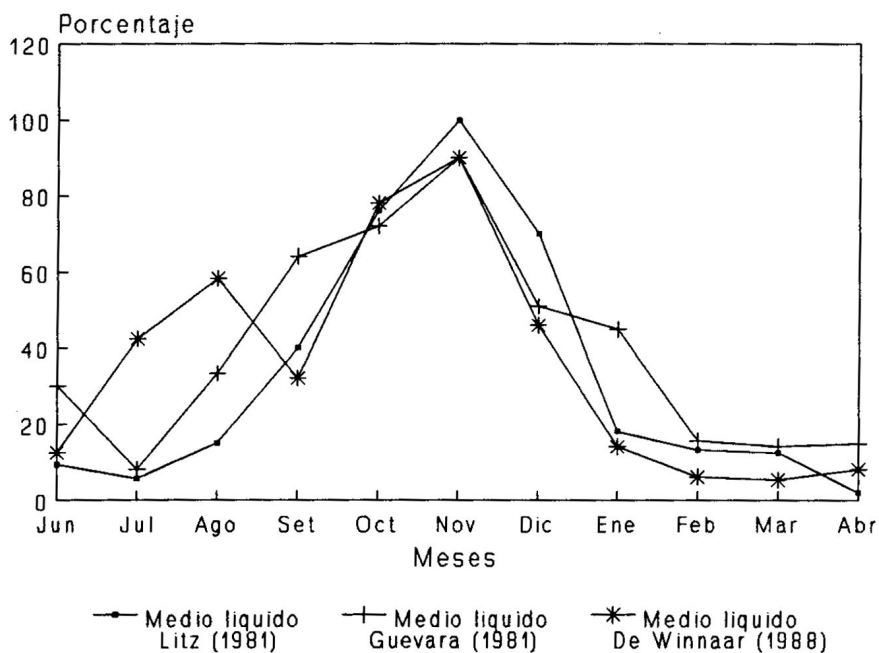


FIGURA 2. Diferencias en la contaminación inicial durante el establecimiento *in vitro* de yema de papaya, según medios de cultivos. Junio 1988 - Abril 1989.

En cuanto a la influencia del medio de cultivo, no se notan diferencias significativas de estos sobre la contaminación. Se observa una mayor contaminación con el medio de De Winnaar en los meses de julio y agosto, cuando en los otros dos medios disminuye. Por su parte, en el mes de noviembre el mayor número de explantes perdidos por contaminación corresponde al medio de Litz. Con excepción de estos dos períodos mencionados, el comportamiento es similar.

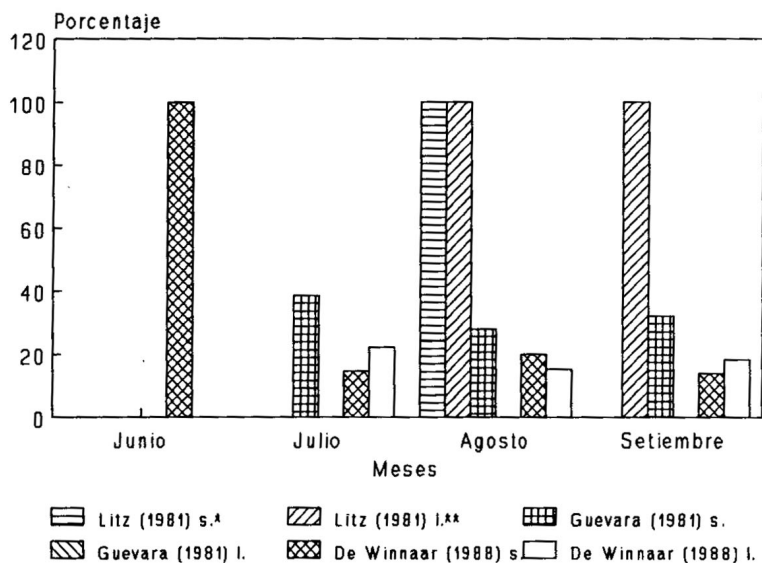
Es posible que bajo ciertas condiciones como las anteriormente mencionadas uno de los medios citados favorezca la expresión de un patógeno en particular. Sin embargo, es difícil verificar esta suposición ya que la caracterización de los microorganismos presentes es muy difícil, limitándose en algunos casos a únicamente el género (Oviedo y Guevara, 1988).

Respuesta inicial de los explantes:

Una dificultad adicional con respecto a la evaluación de la respuesta de los explantes 10 constituyó la contaminación observada en la transferencia posterior al establecimiento de los cultivos iniciales, la cual fue completa durante el año 1988. Las causas de esta contaminación se debieron principalmente a hongos saprófitos presentes en el laboratorio, cuya proliferación fue ese año superior a la normal. Ello obligó el reinicio de los cultivos de establecimiento. La transferencia de éstos a otra área de crecimiento resolvió este problema.

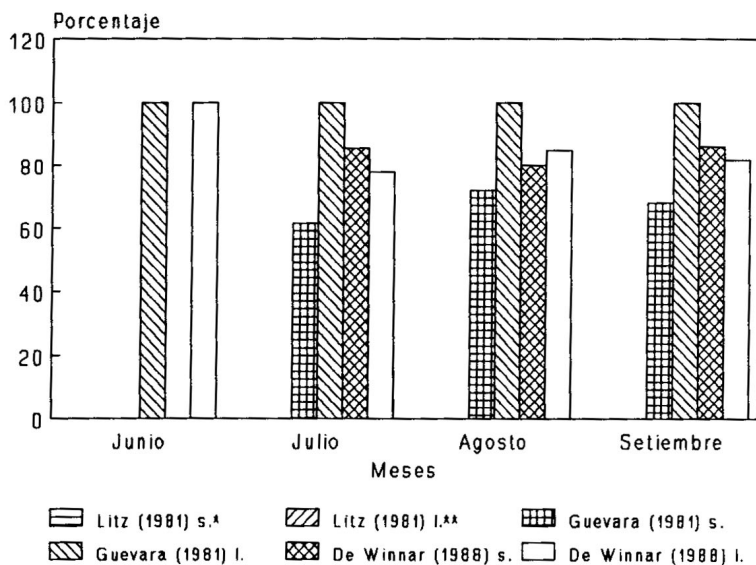
La Figura 3 indica la proporción de explantes que sobrevivieron a la contaminación y formaron callo, en experimentos realizados durante el año 1989. Se puede notar un mayor desarrollo de este tipo de crecimiento al utilizarse el medio de Litz, tanto en condición sólida como líquida. Los otros dos medios presentan una tendencia mucho más reducida en la formación de callo. Al respecto, la condición sólida estimuló en mayor grado este tipo de proliferación celular. Los resultados obtenidos en los diferentes meses (Figura 3) evidencia una alta variación del comportamiento de los explantes, observándose una alta formación de callo en agosto. Una situación diferente se presenta al estudiar la Figura 4, que muestra el porcentaje de explantes que inician un crecimiento organizado. En ella se nota que los medios líquidos, en especial los propuestos por Guevara y por De Winnaar inducen una fuerte respuesta vegetativa. Es interesante notar que, en el caso del medio propuesto por Guevara (medio MS adicionado de 1 mg L⁻¹ de kinitina) se logró que la totalidad de los explantes produjeran un buen crecimiento vegetativo en todos los meses evaluados. Por el contrario existe una gran divergencia con los resultados obtenidos por Litz y Conover (1978) ya que al utilizar el medio sugerido por estos autores no se obtuvo prácticamente un crecimiento vegetativo de los explantes.

Parece entonces existir una correlación inversa entre la mayor capacidad de un medio de cultivo en inducir callo (Figura 3) y la capacidad de formación de una estructura organizada (Figura 4). Es muy posible que el mayor desarrollo de callo en el medio de Litz conlleve a una menor formación de tallos. Estos resultados evidencian la necesidad de una evaluación preliminar de medios y metodologías previamente descritos para condiciones diferentes, ya que es posible que las diferencias locales de clima y formas de trabajar, tengan una repercusión sobre el desarrollo de los cultivos que se establezcan. Estas diferencias han sido observadas por Rajeevan y Pandey (1986); De Winnaar (1988) y por Drew (1988).



*) s: medio solido **) l: medio liquido

FIGURA 3. Diferencias en formación de tejido de callo al cultivar *in vitro* yemas de papaya cv. sunrise en seis condiciones de medio de cultivo (% de explantes vivos).



*) s: medio solido **) l: medio liquido

FIGURA 4. Diferencias en el crecimiento vegetativo diferenciado del explante inicial, al cultivar *in vitro* yemas de papaya cv. sunrise en seis condiciones de medio de cultivo.

Con excepción del medio de Litz, los otros dos medios evaluados produjeron una adecuada respuesta de los explantes, tanto en sólido como en líquida. El desarrollo de las plantas en los medios de Guevara y de De Winnaar presentan diferencias en su morfología: en el primer medio de cultivo las plantas son más compactas, con hojas pequeñas y a veces con un tallo grueso y poco diferenciado. Por el contrario, en el segundo las plantas presentaron una apariencia normal, con hojas de mayor tamaño y mayor grado de diferenciación. Por otra parte el hecho de que la contaminación inicial fuera mayor al utilizar medios sólidos hizo que la cantidad total final de cultivos sanos y en crecimiento activo a los cuatro meses de iniciado el experimento fuera máximo al utilizar el tratamiento propuesto por De winnaar. Por las anteriores consideraciones puede aceptarse el medio de De Winnaard en condición líquida como el medio más adecuado para el establecimiento inicial de la papaya, cultivar sunrise.

RESUMEN

Se estudió el efecto de diferentes factores (desinfección, medio de cultivo, condición líquida o sólida, época de cultivo) sobre el establecimiento *in vitro* de yemas apicales y axilares provenientes de las plantas hermafroditas de la papaya cv. Sunrise.

La menor contaminación y posterior crecimiento de los explantes se observó con hipoclorito de sodio. De los tres medios evaluados (Litz, 1978; Guevara, 1981; De Winnaar, 1988), el de De winnaar en condición líquida permitió obtener un mejor desarrollo de los explantes, mientras que el de Litz favoreció la formación de callo. Dependiendo del medio de cultivo y de la época de establecimiento, se observaron variaciones en el desarrollo de los explantes. Se discute la importancia de la desinfección y el efecto de los medios de cultivo.

LITERATURA CITADA

- ALLAN, P. 1964. Pawpaws grown from cuttings. Farming S. A. 101:1-6.
- AKORA, I. K.; SINGH, R. N. 1978. Growth hormones and *in vitro* callus formation of papaya. scientia Horticulturae 8: 357-361.
- DE WINNAAR, W. 1988. Clonal propagation of papaya *in vitro*. Plant, Cell, Tissue and Organ culture 12: 305-310.
- DEBERGH, P.; MAENE, L. 1984. Pathological and physiological problems related to the *in vitro* culture of plants. Parasitica 40 (2/3): 69-75.
- DREW, R. A. 1988. Rapid clonal propagation of papaya *in vitro* from mature field grown trees. HortScience 23(3): 609-611

- GUEVARA, E. 1981. propagación clonal *in vitro* de la papaya. Tesis Ingeniero Agrónomo, Facultad de Agronomía, Universidad de Costa Rica. 68 p.
- JORDAN, M.; CORTES, I.; MONTENEGRO, A. 1983. Regeneration of plantlets by embryogenesis from callus cultures of *Carica candamarcensis*. Plant science Letters 28: 321-326.
- LITZ, R. E.; CONNOVER, R. A. 1978. Recent advances in papaya tissue culture. Proc. Fla. state Hort. Soc. 91: 180-182.
- LITZ, R. E.; CONNOVER, R. A. 1981. Effect of sex type, season and other factors on *in vitro* establishment and culture of *Carica papaya* explants. J. Amer. SOC Hort. Sci. 106: 792-794.
- LITZ, R. E.; O'HAIR, S. K.; CONNOVER, R. A. 1983. *in vitro* growth of *Carica papaya* cotyledones. Scientia Horticulturae 19: 287-293.
- NAKASONE, H. Y. 1978. La lechosa. Curso Internacional sobre fruticultura. Maracay 29 octubre - noviembre. 41.
- OVIEDO, Y DEL C.; GUEVARA, E. 1988. propagación *in vitro* de la estacía *Limonium sinuatum* cv. 'Midnight Blue'. Agronomía costarricense 12(1): 113-122.
- RAJEEVAN, M. S.; PANDEY, R. M. 1986. Lateral bud culture of papaya (*Carica papaya* L.) for clonal propagation. Plant, Cell, Tissue and Organ culture 6: 181-188.
- SOOKMAASK, S.; Tai, E. A. 1975. vegetative propagation of papaya by budding. Acta Hort. 49: 85-90.
- STOREY, W. B. 1953. Genetics of the papaya. Journal of Heredity 44: 70-78.
- STOREY, W. B. 1969. Papaya. *In*: Ferwerda, F. B. y wit, F.(eds) outlines of perennial crops breeding in the tropics. wageningen, U. Ve en Man y Zonen, M. V. p. 389-408.
- STREET, H. 1977. Plant Tissue and Cell Culture. Oxford, Blackwell. p. 1-11.
- TSAY, H. S.; SU, C. Y. L. 1985. Anther culture of papaya (*Carica papaya* L.). Plant Cell Reports 4: 28-30.
-