

Aclimatización de plantas de *Carica papaya* var. Maradol roja obtenidas por embriogénesis somática

Alexis Rodríguez*, Laisyn Posada-Pérez, Rafael G. Kosky, Maritza Reyes, Marisol Tejada. *Autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Carretera a Camajuaní km 5.5. Santa Clara, Villa Clara, Cuba.
e-mail: alexis@ibp.co.cu

RESUMEN

En el cultivo *in vitro* de papaya (*Carica papaya* L.) la fase de aclimatización sigue siendo uno de los principales problemas. En este trabajo se evaluó la influencia del tipo de cobertor y la longitud de las plantas *in vitro* sobre la supervivencia de estas en la fase de aclimatización. Se emplearon plantas *in vitro* de papaya variedad Maradol roja obtenidas por embriogénesis somática. El uso de un cobertor de nylon y malla permitió alcanzar un 80% de supervivencia. Se comprobó que las plantas *in vitro* deben ser transferidas a condiciones de casa de cultivo con una longitud mayor de 3 cm y la presencia de raíz pivotante, lo cual tuvo una influencia determinante en el desarrollo de las plantas en condiciones *ex vitro*.

Palabras clave: casa de cultivo, enraizamiento, papaya, supervivencia

ABSTRACT

Acclimatization stage of *in vitro* cultured papaya (*Carica papaya* L.) remains one of the main problems. This study evaluated the influence of the type of cover and length of *in vitro* plants for their survival in the acclimatization phase. Plants of papaya, variety red Maradol, obtained by somatic embryogenesis were used. An 80% of survival was reached using a nylon and mesh coverter. Results demonstrated that *in vitro* plants should be transferred to greenhouse conditions larger than 3 cm and with taproot present. This is a decisive influence on the development of plants in *ex vitro* conditions.

Key words: greenhouse, papaya, rooting, survival

INTRODUCCIÓN

Carica papaya L. es uno de los miembros de la familia *Caricaceae* con solo cuatro especies nativas originarias de América del Sur. Se cultiva en las regiones tropical y subtropical en varios países de América y África (Reyes, 1983). La propagación de la papaya es por semillas, lo que trae como consecuencia considerable variabilidad en poblaciones comerciales (Drew y Manshardt, 1997). Además, el cultivo es afectado por varias enfermedades, la más importante de ellas es la causada por el *Virus de la Mancha Anular de la Papaya (PRSV)*.

La biotecnología en este cultivo puede ser herramienta útil para acelerar los programas convencionales de propagación masiva de plantas y mejoramiento genético. Se han desarrollado diferentes métodos de regeneración de plantas a partir del cultivo de tejidos en papaya por embriogénesis somática (Del Sol *et al.*, 2001; Gallardo *et al.*, 2004a; Posada-Pérez *et al.*, 2007). Sin embargo, por ser los métodos biotecnológicos hasta el presente más costosos respecto a la vía por semilla botánica su empleo está limitado solamente para genotipos híbridos que lo justifiquen (Elder y Macleod, 2000).

En el cultivo de la papaya han sido establecidas algunas metodologías para la regeneración de plantas vía embriogénesis somática, las cuales representan un gran potencial para la micropropagación. Una de ellas se basa en el empleo de plantas *in vitro* de papaya (Gallardo *et al.*, 2004b) y la otra en el uso como explante inicial de embriones cigóticos inmaduros (Posada-Pérez *et al.*, 2007). Sin embargo, no se encontraron en referencias científicas sobre el uso de este método de propagación a nivel comercial.

La aclimatización de las plantas *in vitro* es una de las fases críticas de cualquier protocolo de propagación en este cultivo. Lo fundamental en esta fase es que las plantas formen un buen sistema radical, debido a que su nutrición dependerá durante mucho tiempo y en gran parte de la efectividad de sus raíces.

En la papaya resulta importante y merece una mayor atención en condiciones *ex vitro* mantener una alta humedad relativa para lograr mayor éxito en la adaptación de las plantas a las condiciones ambientales. Gallardo *et al.* (2002) para conseguir este propósito cubrieron individualmente las plantas con frascos de vidrio (250ml) durante cuatro semanas. Con ello garantizaron se

mantuviera la humedad y aumentaron los porcentajes de plantas aclimatizadas hasta un 71% a los 60 días. Las plantas tenían una altura de 10-15 cm, 7-12 hojas y las raíces con una longitud entre 6 y 10 cm. Sin embargo, el uso del frasco de vidrio como cobertor resulta muy engorroso y laborioso cuando se trabaja con grandes poblaciones de plantas.

Por estas razones este trabajo tuvo como objetivo determinar la influencia del tipo de cobertor y la longitud de las plantas *in vitro* en la aclimatización de plantas de papaya obtenidas por embriogénesis somática.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se emplearon embriones cigóticos inmaduros obtenidos a partir de frutos inmaduros (90-120 días después de la antesis) procedentes de flores hermafroditas elongatas de la variedad de papaya Maradol roja. Estos frutos en el laboratorio primeramente fueron lavados con una solución de detergente comercial y luego se colocaron 30 minutos en una solución de hipoclorito de sodio al 1.0% (v/v) con dos o tres gotas de Tween 80 por litro de solución. Posteriormente se lavaron dos veces con agua destilada estéril, se secaron en la cabina de flujo laminar y se procedieron a abrirlos con ayuda de una cuchilla, se extrajeron las semillas y se cortaron con el auxilio de bisturí No. 11 y pinzas curvas para obtener los embriones cigóticos inmaduros.

Regeneración de plantas vía embriogénesis somática

Se empleó en este trabajo la metodología desarrollada por Posada-Pérez *et al.* (2007) para la regeneración de plantas vía embriogénesis somática para esta variedad de papaya. Se colocaron cuatro embriones cigóticos por frasco de vidrio con una capacidad de 250 ml, los que contenían 30 ml de medio de cultivo compuesto por las sales MS (Murashige y Skoog, 1962) al 50%, vitaminas MS, 5 mg.l⁻¹ de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), 400 mg.l⁻¹ de L-glutamina, 100 mg.l⁻¹ de mio-inositol y 30 g.l⁻¹ de sacarosa.

Para la multiplicación secundaria de los embriones somáticos se tomaron pequeños grupos de embriones en etapa globular (10-15 embriones somáticos) obtenidos de los embriones cigóticos y se colocaron en un medio de cultivo con las sales MS a la mitad de su concentración, vitaminas MS, 400mg.l⁻¹ de L-glutamina, 100mg.l⁻¹ de mio-inositol, sacarosa 60 g.l⁻¹ y se probaron tres concentraciones de 2,4-D (2.0, 5.0 y 8.0 mg.l⁻¹). El medio de cultivo fue solidificado con agargel (5 g.l⁻¹). Los embriones somáticos permanecieron en este medio de cultivo durante cuatro semanas.

Los embriones somáticos en etapa torpedo y cotiledonal procedentes del medio de cultivo de multiplicación se colocaron en frascos de cultivo de vidrio con capacidad para 250 ml que contenían un medio de cultivo compuesto por las sales MS a la mitad de su concentración, vitaminas MS, 0.5 mg.l⁻¹ de 6-BAP, 100 mg.l⁻¹ de mio-inositol, 20 g.l⁻¹ de sacarosa, 0.06 mg.l⁻¹ de vitamina B₂, y 5 g.l⁻¹ de Agargel.

Las plántulas obtenidas a partir de la germinación de los embriones somáticos, se colocaron en medio de cultivo de elongación, el cual contiene las sales MS, 0.25 mg.l⁻¹ de Ácido naftalenacético (ANA) y 0.25 mg.l⁻¹ de 6-bencilaminopurina (6-BAP). Después de cuatro semanas de cultivo y con una altura promedio de 3.0 cm, se transfirieron a un medio de cultivo de enraizamiento, compuesto por las sales MS a la mitad de su concentración y 5.0 mg.l⁻¹ de Ácido Indol Butírico (AIB), en el cual permanecieron durante 10 días para inducir la formación de raíces, pues a partir de este tiempo ocurre una caída casi total de las hojas (datos no mostrados). Luego se subcultivaron a un medio de cultivo compuesto por sales MS y sin reguladores de crecimiento. A las cuatro semanas, las plantas fueron llevadas a condiciones *ex vitro* en casa de cultivo.

En las fases de formación y multiplicación de los embriones somáticos los frascos de cultivo con los explantes fueron colocados en cámara de cultivo en oscuridad total a 27±2°C. Para la germinación de los embriones somáticos estos se colocaron en una cámara de cultivo con luz solar con una intensidad de fotones fotosintéticos de aproximadamente 48 - 62.5 mol. m⁻²s⁻¹, con igual temperatura que la cámara de cultivo con oscuridad.

Influencia del tipo de cobertor

Los experimentos de aclimatización se realizaron en una casa de cultivo. Dentro de esta se confeccionó un cobertor de *nylon* y malla antiáfido con las siguientes dimensiones: 127 cm de ancho, 240 cm de largo y 110 cm de altura, dentro del cual fueron colocadas las plantas de papaya. Se utilizó para el control de la intensidad de la luz una malla plástica de color negro (zarán), que permitía el paso del 30.0% de la luz solar. Se emplearon bandejas de polieturano de 70 alveolos con 120 cm³ de capacidad cada uno, y un sustrato compuesto por una mezcla de materia orgánica (70%) y zeolita (30%) y este fue esterilizado mediante un equipo eléctrico para la esterilización de suelo a 180°C durante 2 horas antes de realizar la plantación.

El riego se realizó por microaspersión, con aspersores de baja presión (dos bares y un caudal de 122 l/h). Durante los primeros diez días se le aplicó a las plantas un riego de 5 segundos cada 30 minutos y posteriormente un riego al día. Para el

transplante se utilizaron bolsas plásticas de color negro, agujereadas, de 15 cm de alto, 7 cm de diámetro. Las condiciones de cultivo fueron humedad relativa promedio de 80% y temperatura de 26 a 30°C. La temperatura y la humedad relativa dentro del cobertor se midieron con un Termo-Higrómetro electrónico tres veces al día. A las plantas se le realizó a partir del séptimo día una aplicación de fungicidas, los cuales fueron: 1.6 g.l⁻¹ de Fundazol, 1.6 g.l⁻¹ de Mancozeb y 3.2 g.l⁻¹ de Oxiclورو de Cobre.

Las plantas de papaya con más de 1 cm de longitud fueron lavadas en su base para eliminar los restos de gelificante del medio de cultivo y trasladadas en recipientes con agua desionizada estéril para la plantación inmediata.

Como control se empleó la metodología propuesta por Gallardo *et al.* (2002) frascos de vidrio como cobertor de las plantas *in vitro* para garantizar una cámara húmeda los primeros 15 días.

Este experimento se realizó tres veces en el tiempo y se utilizaron 40 plantas por tratamiento.

A los 30 días se evaluó: número de plantas vivas (supervivencia), longitud de la planta (cm) (medida desde la base hasta la inserción de la última hoja), número de hojas, número de raíces, longitud de la raíz más larga (cm) y presencia de raíz pivotante.

Los datos fueron procesados en los programas estadísticos computacionales SPSS ver. 15.0, STATGRAPHICS Centurium XV y Statistix ver 1.0. Se realizó un ANOVA simple y para determinar la diferencia entre las medias se empleó la prueba de rangos múltiples de Duncan y para los valores expresados en porcentaje se empleó una prueba de proporciones.

Influencia de la longitud de plantas *in vitro*

Se transfirieron al ambiente *ex vitro*, plantas *in vitro* de 1.0, 2.0 y 3.0 cm de longitud obtenidas por embriogénesis somática.

Las condiciones para la aclimatización fueron iguales a las señaladas en el acápite anterior.

A los 30 días se evaluó: número de plantas vivas, longitud de la planta (cm) (medida desde la base hasta la inserción de la última hoja), número de hojas, presencia o no de raíces, presencia de raíz pivotante.

Estos experimentos se realizaron tres veces en el tiempo y se emplearon 30 plantas por tratamiento. Los datos fueron procesados en el programa SPSS ver. 15.0, a los que se les realizó una ANOVA simple y para determinar la diferencia entre las medias se empleó la prueba de rangos múltiples de Duncan y

para los valores expresados en porcentaje se empleó una prueba de proporciones.

RESULTADOS Y DISCUSION

Influencia del tipo de cobertor

Se logró la aclimatización de las plantas de papaya procedentes del cultivo *in vitro*, en ambas condiciones a los 30 días de cultivo. Sin embargo, se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos tanto en el número de hojas, como en el largo y número de las raíces (Tabla 1). Al evaluar la supervivencia de las plantas se observó que no existieron diferencias significativas en cuanto a esta variable en ambas condiciones de aclimatización, con porcentajes de 80 y 82% respectivamente.

Cuando se emplearon frascos de vidrio como cobertor sobre las plantas *in vitro* de papaya se logró que el 98.0% de estas formaran raíces, con diferencias significativas, con el tratamiento donde se empleó el cobertor de *nylon*, donde existió un 5.0% de plantas que en el mismo período no desarrollaron raíces. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos en cuanto a los valores de plantas con emisión de raíz pivotante. Es importante señalar que durante este período existieron plantas que se mantuvieron vivas aun sin la presencia de raíces, lo cual indica que las condiciones debajo del cobertor de *nylon* son factibles para la aclimatización en esta especie de plantas propagadas *in vitro*. Lo fundamental en esta fase es que las plantas formen un buen sistema radical, debido a que su nutrición dependerá durante mucho tiempo y en gran parte de la efectividad de sus raíces, la presencia de raíces es fundamental en cualquier especie vegetal para lograr la supervivencia de las plantas cultivadas *in vitro* a condiciones de campo (Kataoka e Inoue, 1992).

Chen *et al.* (1991) lograron un 72.0% de supervivencia de las plántulas obtenidas y Gallardo *et al.* (2002) 71.0%, ambos autores utilizaron frascos invertidos sobre cada una de las plantas y los mantuvieron durante los períodos de riego. Sin embargo, cuando realizaron el estudio con las plantas sin cubrir con los frascos solo lograron que un 7.0% sobreviviera. En papaya resulta fundamental mantener una alta humedad relativa (cámara húmeda) para lograr mayor éxito en la adaptación de las plantas a las condiciones ambientales, estos autores refieren que con la utilización de los frascos encima de cada planta se logra que solo se humedezca el sustrato y de esta forma aumentar los porcentajes de plantas aclimatizadas.

En las plantas *in vitro* de papaya independientemente de las condiciones de aclimatización se comprobó la presencia de raíz pivotante lo cual es importante ya que le permite un buen anclaje a la planta y se logra una buena conexión entre los haces vasculares de la raíz y del tallo (Figura 1).

Tabla 1. Respuesta de plantas de papaya variedad Maradol roja obtenidas a partir de embriones somáticos en dos condiciones de aclimatización después de 30 días de cultivo.

Variables evaluadas	Cobertores		
	Frasco de vidrio (250 ml)	Nylon y malla*	EE
Número de hojas / planta	6.4 a	5.4 b	±0.15
Plantas con raíces	98 a	93 b	±1.1
Número de raíces / planta	4.3 b	6.3 a	±0.2
Presencia de raíz pivotante (%)	65.0	55.0	±0.16
Longitud de la raíz pivotante	2.8 b	3.7 a	

*1:100, Número de poros por cm²

Medias con letras diferentes en la misma columna difieren según prueba de proporciones para los datos expresados en por ciento y prueba de Duncan para número de hojas y raíces y longitud de la raíz principal para $p \leq 0.05$

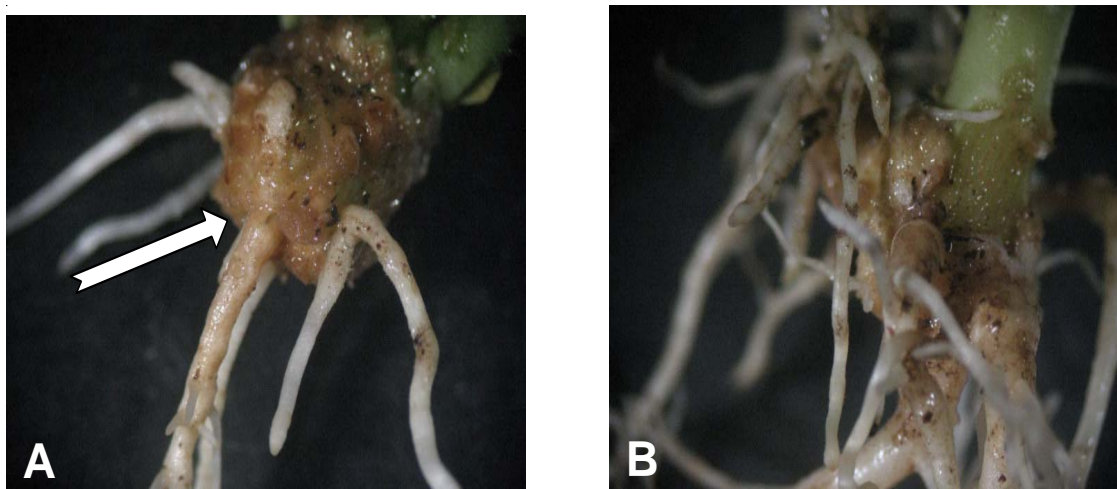


Figura 1. Sistema radicular de las plantas obtenidas a partir de embriones somáticos aclimatizadas en condiciones de casas de cultivo, variedad Maradol roja. (A) Planta con un sistema radicular con emisión de raíz pivotante. (B) Planta con un sistema radicular sin emisión de raíz pivotante definida.

Aunque existieron diferencias significativas entre el número de hojas, número de raíces por planta y longitud de la raíz principal, entre las plantas aclimatizadas bajo frascos de vidrio y en el cobertor de nylon y malla, estos factores no influyeron de forma significativa en los porcentajes de supervivencia.

Al comparar los resultados, teniendo en cuenta las plantas que habían desarrollado raíz pivotante con las que no la formaron, se determinó que las plantas con emisión de este tipo de raíz tuvieron diferencia significativa en todas las variables evaluadas respecto a las plantas que no la formaron (Tabla 2). Esto demuestra que las plantas que emitieron raíz pivotante lograron una mejor conexión entre los haces vasculares de la raíz y del tallo lo que permitió que lograran un mayor desarrollo de la parte aérea. Con ello se logró que las plantas alcanzaran las condiciones requeridas para su transplante a campo en menor tiempo (50 días).

Se determinó que las plantas de papaya cultivadas *in vitro* lograron la aclimatización empleando un cobertor de nylon y malla que le permitió la supervivencia al inicio de la aclimatización aun sin la emisión de raíces, lo que demuestra que bajo estas condiciones pueden ser aclimatizadas las plantas de papaya sin la utilización del frasco de vidrio encima de cada una de ellas.

Durante el desarrollo de las plantas en la fase de aclimatización hasta los 60 días (Figura 2), no se observaron cambios morfológicos tales como cambio de coloración de las hojas y el tallo. Esto no excluye la existencia de variación genética en estas plantas, sino que en esta fase no fue posible detectarla. Por otra parte, las plantas que emitieron raíz pivotante tuvieron un mayor desarrollo del área foliar dado por los factores evaluados (altura de la planta, número de hojas y número de raíces secundarias).

Influencia de la longitud de las plantas *in vitro*

La longitud de las plantas tuvo efecto significativo sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas *in vitro* en condiciones de casa de cultivo. Se obtuvieron diferencias significativas en cuanto a todas las variables morfológicas evaluadas (longitud de la planta, número de hojas, y presencia de raíz pivotante). El tratamiento donde se obtuvieron los mejores resultados fue al utilizar plantas con 3 cm de longitud (Tabla 3), lo cual indicó que es de gran importancia que las plantas *in vitro* tengan un adecuado tamaño para su buen desarrollo durante la fase de aclimatización (Gnanam, 2004).

La longitud de las plantas *in vitro* es particularmente importante cuando se transfieren a la fase de aclimatización, ya que esta fase es considerada como la etapa más crítica en el proceso de propagación *in vitro* de especies como *Carica papaya*. Al respecto, Palhares *et al.* (2004) señalaron

que la calidad del material vegetal *in vitro* tiene gran influencia en el porcentaje de supervivencia *ex vitro*.

Con respecto a la longitud que alcanzaron las plantas a los 60 días de cultivo, también se observaron diferencias significativas. Se obtuvieron los mayores valores en las plantas que poseían una mayor longitud inicial (Figura 4).

Al evaluar el número de hojas por planta y el número de plantas enraizadas también se obtuvieron diferencias significativas entre los tratamientos estudiados. Se alcanzó el mejor resultado en las plantas que poseían 3 cm de altura (Tabla 4). Estas plantas lograron una media de cinco hojas por planta y un 88.2% de plantas con raíces, aspecto que repercutió al final del proceso (Figura 3). Estos resultados avalan los obtenidos por Cruz *et al.* (2008) quienes lograron más del 85.0% de plantas de papaya enraizadas con plantas que tenían de 3 a 5 hojas en crecimiento activo y una longitud promedio de 3 cm, pero utilizando como cobertor frascos de vidrio encima de las plantas.

Tabla 2. Características de plantas de papaya var. Maradol roja aclimatizadas en casas de cultivo con emisión o no de raíz pivotante a los 30 días de cultivo.

Tipo de raíz presente	Longitud de las plantas (cm)	Número de hojas	Número de raíces secundarias
Pivotante	4.1 a	6.8 a	6.4 a
Secundarias	2.4 b	4.9 b	4.1 b
EE ±	0.08	0.1	0.2

Medias con letras diferentes en la misma columna difieren según Duncan para $p \leq 0.05$



Figura 2. Aspecto de las plantas de papaya variedad Maradol roja procedentes de la embriogénesis somática, a los 60 días de plantadas en la fase de aclimatización.

Tabla 3. Influencia de la altura de las plantas *in vitro* en la aclimatización de plantas de papaya obtenidas vía embriogénesis somática de la variedad Maradol roja a los 60 días de cultivo.

Longitud inicial (cm)	Supervivencia (%)	Longitud de la planta (cm)	Número de hojas	Presencia de raíz (%)	Presencia de raíz pivotante (%)
1.0	25 c	1.24 c	3.0 c	20.0 c	0.0 c
2.0	60 b	2.56 b	3.9 b	75.0 b	77.7 b
3.0	85 a	5.2 a	5.0 a	88.2 a	93.3 a
EE±	4.8	0.05	0.1	4.5	3.2

Medias con letras diferentes en la misma columna difieren según prueba de proporciones para los datos expresados en por ciento y prueba de Duncan para número de hojas altura de la planta para $p \leq 0.05$.



Figura 3. Aspecto de las plantas de papaya variedad Maradol roja obtenidas por embriogénesis somática, a los 60 días de cultivo en la fase de aclimatización. (A) Planta cultivada *in vitro* que inició la aclimatización con 3 cm de longitud, (B) planta con 2 cm y (C) planta con 1 cm.



Figura 4. Planta de papaya variedad Maradol roja obtenidas por embriogénesis somáticas lista para ser trasladada a campo a los 60 días de cultivo.

Las plantas que fueron transferidas a la fase de aclimatización con 3 cm de longitud, ya a los 60 días habían alcanzado una altura de 10-12 cm y emitieron de 5-7 hojas, estando listas para el trasplante a condiciones de campo según Posada-Pérez *et al.* (2007) quienes utilizan como vía de

propagación la embriogénesis somática y certifica las plantas listas para su traslado a campo con características similares (Figura 4). Las plantas con menos de 3 cm de altura aunque sobrevivieron y enraizaron, a los 60 días de cultivo no se encontraban listas para ser transferidas a campo. Las plantas

respondieron muy bien a la aplicación de la fertilización de forma foliar, tomando una apariencia vigorosa y mostrando hojas de color verde intenso. Resultados similares obtuvo Gallardo *et al.* (2002), en la aclimatización del híbrido cubano de papaya IBP 42-99 pero utilizando frascos de vidrio encima de las plantas.

CONCLUSIONES

El uso de un cobertor de *nylon* y malla permitió alcanzar un 80% de supervivencia en la aclimatización de plantas de papaya var. Maradol roja obtenidas por embriogénesis somática. Se comprobó que las plantas *in vitro* deben ser transferidas a condiciones de casa de cultivo con una longitud mayor de 3 cm y la presencia de raíz pivotante lo cual debe tenerse en cuenta como criterio de calidad y que sean seleccionadas las plantas *in vitro* con la altura promedio adecuada en la fase anterior, para ser transferidas a la fase de aclimatización.

REFERENCIAS

- Chen, M H , Chen C L, Wang D N, Chen F C (1991) Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of *Carica papaya* y *Carica cauliflora* culture *in vitro*. Can. J. Bot. 69:1913-1918
- Del Sol, L, García M, Gálvez D, Rodríguez S, Torres Y, Medero V, López J, Ventura J, Cabrera M, Rodríguez S, Álvarez M, Bauta M, García J (2001) Efficient plant regeneration from somatic embryogenesis in papaya cv. INIVIT-2000. Biotecnología vegetal y Agricultura sostenible Resúmenes evento, 133 - 215. INIVIT
- Drew, RA, Manshardt, RM (1997) Biotechnology of Papaya. En: RA Drew (Ed.) Proceedings of Int. Symp. Biotechnology of Tropical and Subtropical species, pp. 514. Queensland, Australia. 29 September –3 October.
- Elder, R J, Macleod W N B (2000) Growth, yield and phenology of 2 hybrid papayas (*Carica papaya* L.) as influenced by method of water application. Australian Journal of Experimental Agriculture. 40(5): 739-746
- Gallardo J, Posada-Pérez L, Kosky RG, Más L, Reyes M, Herrera I (2002) Micropropagación del híbrido cubano de papaya IBP 42-99. Biotecnología vegetal 2(4):211-215
- Gallardo, J, Kosky R, Tejeda M, Posada-Pérez L, Herrera I, Reyes M, García L, Freire M (2004a) Empleo de secciones de tallo de plantas *in vitro* de papaya (híbrido IBP 42-99) para obtener callos con estructuras embriogénicas. Biotecnología Vegetal 4(4): 213-216
- Gallardo, J, Kosky R, Herrera I, Tejeda M, Posada-Pérez L, Chong B, Reyes M y Freire M (2004b) Regeneración de plantas de un híbrido de papaya (IBP 42-99) a partir de callos obtenidos de ápices de plantas *in vitro*. Biotecnología Vegetal 4(3): 159-163
- Gnaman, R (2004) Micropropagation of mulberry using shoot tip (or) nodal segments. Proceedings of Indian Academy. [En línea] En: <http://nau.ac.in/cpps/productive/sericulture/0105.htm> (Consultado 2 de abril de 2006)
- Kataoka, I, Inoue, H (1992) Factors influencing *ex vitro* rooting of tissue cultured papaya shoots. Acta Horticulturae 321: 589-597
- Murashige, T y Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum 15: 437-497
- Pahlares, GA, R Rodríguez, M Cid, D Pina y JL González (2004) Efecto de un análogo de brasinosteroides (MH5) en la propagación de *Eucalyptus urograndis* en biorreactores de inmersión temporal. Cultivos Tropicales 25(1): 39-44
- Posada-Pérez Laisyn, Rafael G Kosky, Maritza Reyes (2007) Embriogénesis somática en *Carica papaya* L. var. Maradol rojo. Biotecnología Vegetal 7 (3): 131 - 138
- Reyes, RD (1983) Manual Técnico de producción de papaya. Ed. Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá. Ciudad de Panamá. 20 p.