

Induksi dan Regenerasi Embriogenesis Somatik Pepaya

Sutanto, A.¹⁾ dan M. A. Aziz²⁾

¹⁾ Balai Penelitian Tanaman Buah, Jl. Raya Solok-Aripan Km 8, Solok 27301

²⁾ Jabatan Sains Tanaman, Fakulti Pertanian, Universiti Putra Malaysia, Selangor DE, Malaysia
Naskah diterima tanggal 2 Mei 2005 dan disetujui untuk diterbitkan tanggal 17 November 2005

ABSTRAK. Penelitian ini bertujuan menginduksi dan meregenerasi embrio somatik dari embrio zigotik buah pepaya muda kultivar Eksotika II. Kegiatan dilaksanakan di laboratorium Kultur Jaringan Jabatan Sains Tanaman, Universiti Putra Malaysia pada bulan Januari sampai Agustus 2001. Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap dengan perlakuan kombinasi beberapa konsentrasi 2,4-D (1,0; 2,5 dan 5,0 mg/l) dan BAP (0; 0,001; 0,005; dan 0,01 mg/l). Hasil penelitian menunjukkan bahwa media MS yang mengandung 5,0 mg/l 2,4-D membentuk embrio somatik tertinggi (74,55%) dan kombinasi dari 2,4-D 1,0 mg/l dan BAP 0,01 mg/l menghasilkan kalus tertinggi (52,58%) pada 8 minggu setelah kultur. Jumlah embrio somatik per eksplan terbanyak (66,61) diperoleh pada media MS dengan 5,0 mg/l 2,4-D dan 0,01 mg/l BAP. Pemasakan embrio diperoleh dengan memindahkan embrio globular ke media padat MS tanpa zat pengatur tumbuh. Empat minggu setelah kultur, 42% embrio somatik berkecambah setelah embrio masak. Plantlet siap diaklimatisasi pada 8 minggu setelah kultur ke media perkecambahan. Sistem perbanyak dan regenerasi embrio somatik pepaya ini dapat menunjang keberhasilan pemuliaan tanaman pepaya modern melalui transformasi genetika.

Kata kunci: *Carica papaya*; Embriogenesis somatik; Induksi; Regenerasi; Zat pengatur tumbuh

ABSTRACT. Sutanto, A. and M.A. Aziz. 2006. The induction and regeneration of somatic embryogenesis on papaya. The experiments with the objectives to induce and regenerate somatic embryogenesis were carried out at the Tissue Culture Laboratory of Crop Science Department, Universiti Putra Malaysia from January to August 2001. The experiments involved the induction of somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of papaya cv. Eksotika II and regeneration of plantlets from the somatic embryos. A nonfactorial completely randomized design was used as experimental design with treatments of the 2,4-D combinations concentrations (1.0; 2.5 and 5.0 mg/l) and BAP concentrations (0; 0.001; 0.005 and 0.01 mg/l). The results showed that MS medium supplemented with 2,4-D 5.0 mg/l promoted the highest percentage of somatic embryogenesis (74.55%), while the combination of 1.0 mg/l 2,4-D and 0.01 mg/l BAP produced the highest percentage of callus formation (52.58%) after 8 weeks of culture. The highest number of somatic embryos per explant (66.61) was obtained when 5.0 mg/l 2,4-D and 0.01 mg/l BAP were added into MS medium. Maturation of somatic embryos was achieved on transferring the globular somatic embryos derived from zygotic embryo to solid MS medium without growth regulator. After 4 weeks of culture, 42% germinated somatic embryo was occurred following maturation of somatic embryos. Plantlets were ready for acclimatization to germination medium 8 weeks after culture. Somatic embryogenesis system could enhance the successful of the modern papaya breeding program through genetic transformation.

Keywords: *Carica papaya*; Somatic embryogenesis; Induction; Regeneration; Plant growth regulators

Pepaya adalah salah satu buah yang penting di negara-negara Asia Tenggara, seperti Thailand, In-

donesia, Filipina, dan Malaysia. Buah yang telah masak biasanya dapat dikonsumsi langsung atau dapat diproses menjadi selai, jus, anggur, serta sebagai bahan campuran dalam pembuatan saus. Selain sebagai bahan makanan, hasil produksi penting dari pepaya adalah papain, yang mempunyai permintaan yang cukup tinggi di pasaran internasional seperti Inggris dan Amerika Serikat. Negara Filipina adalah negara di Asia Tenggara yang telah mengembangkan produksi papain secara komersial besar-besaran.

Tanaman pepaya sangat rentan terhadap *papaya ringspot virus* (PRV). Menyisipkan gen tahan terhadap PRV dari spesies liar ke dalam pepaya komersial telah dimulai dengan hibridisasi interspesifik dan dikombinasi dengan teknik penyelamatan embrio secara in vitro (Manshardt dan Wenslaff 1989), namun sampai saat ini kultivar komersial yang tahan terhadap PRV masih belum dihasilkan. Akhir-akhir ini program perbaikan varietas untuk mengatasi masalah penyakit dan meningkatkan kualitas buah lepas panen bisa

ditempuh melalui teknik transfer gen.

Efektivitas transfer gen menuntut adanya sistem regenerasi tanaman yang efisien dari sel hasil transformasi. Regenerasi tanaman secara in vitro pada tanaman pepaya menggunakan eksplan kalus dari ovul (Litz dan Conover 1982), hipokotil (Yie dan Liaw 1977), dan akar (Chen *et al.* 1987) umumnya menghasilkan tingkat keberhasilan yang rendah dan kurang sesuai untuk produksi tanaman pepaya transgenik. Tanaman pepaya transgenik telah dihasilkan oleh Yang *et al.* (1996) menggunakan petiol yang dikokultivasikan bersama *Agrobacterium tumefaciens*. Mereka menginduksi embrio somatik dari kalus yang diperoleh dari eksplan petiol yang telah ditransformasi dan regenerasi tanaman menggunakan organogenesis dan proliferasi *multiple-shoot*. Kelemahan dari metode ini adalah kesulitan dalam regenerasi kalus dari petiol yang telah ditransformasi dan rendahnya tingkat keberhasilan regenerasi tanaman.

Embriogenesis somatik bisa terjadi secara langsung, di mana sel-sel embrionik dapat diinduksi langsung dari sel-sel eksplan, ataupun secara tidak langsung yang didahului oleh terbentuknya struktur kalus yang belum mempunyai bentuk. Pembelahan mitosis dari sel-sel kalus tersebut merupakan perantara dari sel-sel yang nonembrionik dengan struktur yang embrionik (Merkle *et al.* 1990). Kemudahan dari sel-sel untuk dapat membentuk jaringan yang embrionik diukur dari jarak epigenetik sel-sel eksplan terhadap status embrionik. Konsep tersebut pertama kali dikemukakan oleh Evan *et al.* (1981) yang menggolongkan sel-sel ke dalam 2 kategori, yaitu *preembryogenic determined cells* (PEDCs) dan *induced embryogenic determined cells* (IEDCs). Sel-sel dikelompokkan ke dalam PEDC apabila secara epigenetik sudah bersifat embrionik seperti sel-sel yang ada pada embrio zigotik, sedangkan sel-sel yang IEDC harus dirangsang terlebih dahulu menggunakan zat pengatur tumbuh tertentu di dalam media kultur sehingga menghasilkan sel-sel yang embrionik. Sel-sel yang berada pada jaringan embrio zigotik pepaya merupakan sel-sel PEDC sehingga tidak terlalu sulit untuk menghasilkan embrio somatik. Waktu yang dibutuhkan

untuk beregenerasi menjadi plantlet juga tidak terlalu lama.

Penelitian ini bertujuan untuk menginduksi dan meregenerasi embrio somatik yang berasal dari embrio zigotik muda dari buah pepaya muda kultivar Eksotika II.

BAHAN DAN METODE

Kegiatan penelitian dilaksanakan di laboratorium Kultur Jaringan Jabatan Sains Tanaman, Fakultas Pertanian, Universiti Putra Malaysia mulai bulan Januari sampai Agustus 2001. Buah pepaya kultivar Eksotika II yang berumur 2-3 bulan diambil dari kebun dan disterilisasi menggunakan alkohol 70% selama 10 menit, Clorox® 20% (5,25% sodium hipoklorit) selama 10 menit dan dibilas dengan aquades steril sebanyak 3 kali. Buah dibelah di dalam *laminar airflow cabinet* (LAFC) dan biji yang masih putih diambil dan diletakkan pada cawan petri berukuran 150 X 10 mm.

Embrio dipisahkan dan dikulturkan dalam modifikasi media MS yang mengandung ½ makro, 50 mg/l myo-inositol, 400 mg/l glutamine, 60 g/l sucrose, 7,0 g/l bacto agar dan kombinasi dari konsentrasi 2,4-D dan BAP untuk induksi embrio somatik. Kombinasi 2,4-D dan BAP merupakan perlakuan dengan konsentrasi seperti pada Tabel 1.

Tabel 1. Kombinasi perlakuan konsentrasi 2,4-D dan BAP (*Treatment combination of 2,4-D and BAP*)

Rancangan percobaan yang digunakan adalah

Kode media (<i>Media code</i>)	Konsentrasi 2,4-D (<i>Concentration 2,4-D</i>) mg/l	Konsentrasi BAP (<i>Concentration BAP</i>) mg/l
A	1,0	0
B	2,5	0
C	5,0	0
D	1,0	0,001
E	2,5	0,001
F	5,0	0,001
G	1,0	0,005
H	2,5	0,005
I	5,0	0,005
J	1,0	0,010
K	2,5	0,010
L	5,0	0,010

acak lengkap dengan setiap perlakuan diulang 5 kali dan setiap unit percobaan berisi 10 *vial*, setiap *vial* berisi 2 embrio zigotik. Kultur disimpan dalam ruang tumbuh yang bersuhu 25°C dan 16 jam penyinaran (12,17 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ intensitas cahaya). Setelah 8 minggu dalam media induksi, embrio somatik yang terbentuk dipindah ke media MS tanpa zat pengatur tumbuh untuk pemasakan dan perkecambahan embrio.

Peubah tumbuh yang diamati meliputi (a) persentase pembentukan embrio somatik, (b) persentase eksplan berkalus, dan (c) jumlah embrio somatik per eksplan yang diamati pada umur 8 minggu setelah kultur di media inisiasi. Analisis keragaman (ANOVA) menggunakan program NCSS 6.0 (*Number Cruncher Statistical System*) (Hintze 1996). Untuk membandingkan nilai tengah antarperlakuan digunakan uji jarak berganda Duncan (DMRT) pada taraf 5%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

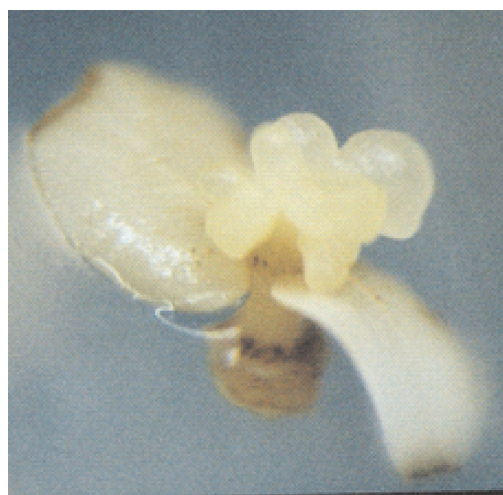
Dari pengamatan secara visual terlihat bahwa 3 hari setelah kultur dalam media induksi, kotiledon terbuka, dan 1 minggu kemudian titik tumbuh membengkak. Terjadinya pembengkakan pada titik tumbuh berarti bahwa sudah terjadi proses diferensiasi jaringan menjadi embrio somatik secara langsung tanpa pembentukan kalus (Gambar 1).

Dari hasil analisis keragaman terdapat perbedaan yang nyata antarperlakuan pada persentase pembentukan embrio somatik, pembentukan kalus, dan jumlah embrio somatik per eksplan (Gambar 2). Persentase embriogenesis tertinggi (74,55%) diperoleh dalam perlakuan media C (5,0 mg/l 2,4-D) walaupun tidak berbeda nyata dengan hasil yang diperoleh pada perlakuan media F (5,0 mg/l 2,4-D dan 0,001 mg/l BAP), I (5,0 mg/l 2,4-D dan 0,005 mg/l BAP), dan L (5,0 mg/l 2,4-D dan 0,01 mg/l BAP) (Gambar 2A). Pada konsentrasi 2,4-D yang lebih tinggi dengan atau tanpa BAP, menunjukkan peningkatan persentase embrio somatik yang terbentuk. Dalam media MS yang mengandung 2,4-D, embrio somatik dapat diinduksi secara langsung dari titik tumbuh embrio zigotik tanpa melalui tahap pembentukan kalus (Gambar 1). Keberadaan 2,4-D dalam media *in vitro* adalah penting untuk menginduksi dan

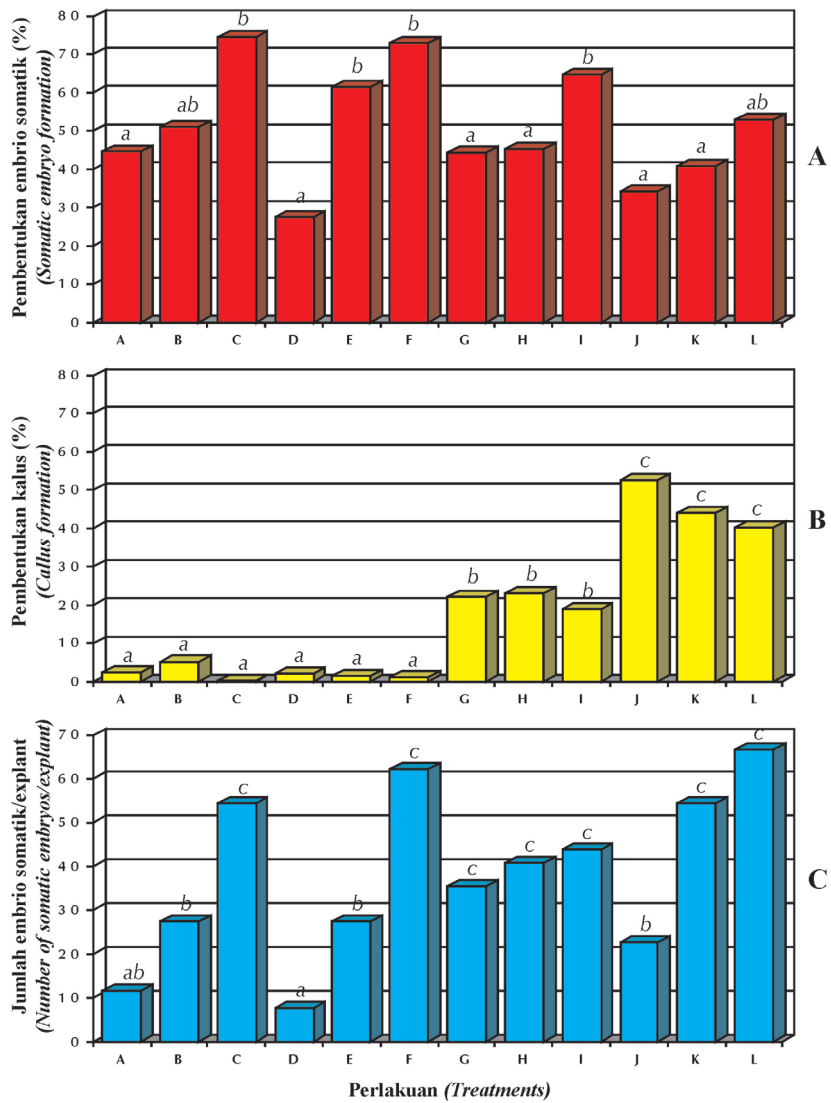
memperbanyak pembentukan embrio somatik.

Hasil penelitian juga menyatakan bahwa 2,4-D dapat merangsang pembentukan embrio somatik secara langsung dari permukaan titik tumbuh embrio zigotik tanaman pepaya. Zat pengatur tumbuh ini adalah salah satu hormon auksin yang secara nyata mempunyai efek embriogenesis dan merupakan hormon auksin yang kuat, khususnya untuk pembentukan kalus dan embrio somatik (Jordan dan Velozo 1996; de-Klerk 1998).

Persentase pembentukan kalus tertinggi (52,58%) diperoleh dari perlakuan media J yang mengandung 1,0 mg/l 2,4-D dan 0,01 mg/l BAP kemudian diikuti oleh media K yang mengandung 2,5 mg/l 2,4-D dan 0,01 mg/l BAP (43,94%), dan media L yang mengandung 5,0 mg/l 2,4-D dan 0,01 mg/l BAP (40,26%). Media yang mengandung kombinasi 2,4-D dengan konsentrasi BAP yang lebih tinggi (0,005 dan 0,01 mg/l) secara nyata dapat meningkatkan persentase pembentukan kalus dibandingkan dengan media yang mengandung 2,4-D saja atau yang dikombinasikan dengan BAP yang rendah (0,001 mg/l) (Gambar 2B). Hal ini berarti bahwa pembentukan kalus sangat dipengaruhi oleh konsentrasi BAP. Semakin tinggi konsentrasi BAP, semakin banyak kalus yang terbentuk sesuai dengan hasil yang diperoleh Anbazhagan dan Ganapathi (1999),



Gambar 1. Embrio somatik terbentuk secara langsung tanpa pembentukan kalus dari titik tumbuh embrio zigotik (*Somatic embryos induced directly without callus formation from the apical dome of a zygotic embryo*)



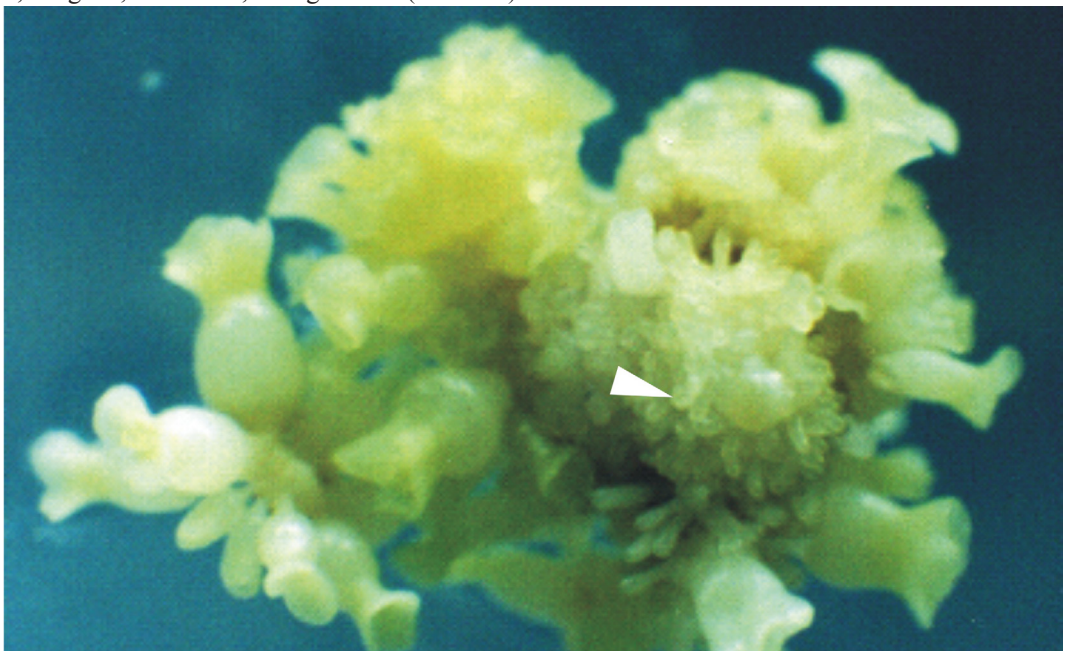
Gambar 2. Pembentukan embrio somatik (A) dan kalus (B), serta jumlah embrio somatik per eksplan (C) 2 bulan setelah kultur pada beberapa media (*Somatic embryo formation (A), callus formation (B), and the number of somatic embryos per explant (C) 2 months after culture*)

yang menyatakan bahwa kandungan sitokinin yang tinggi dalam media merangsang pembentukan kalus pada kultur tanaman kacang gude (*Cajanus cajan*). Pada kultur embrio zigotik pepaya, apabila pada awal pertumbuhan terbentuk kalus, maka kalus akan berkembang lebih cepat daripada pertumbuhan embrio somatik. Meskipun demikian, konsentrasi 2,4-D yang lebih tinggi dikombinasikan dengan BAP menghasilkan jumlah embrio per eksplan lebih banyak, karena kalus yang dihasilkan dari embrio zigotik mempunyai karakter embriogenik dan juga menghasilkan embrio somatik. Pada beberapa spesies tanaman, sitokinin digunakan bersama-sama auksin untuk merangsang embriogenesis, khususnya pada jaringan PEDC seperti jaringan *nucellus* pada jeruk (Evans *et al.* 1981). Pada *Carica* spp., beberapa peneliti menambahkan sitokinin (BAP) dalam media bersama-sama auksin (2,4-D atau NAA) untuk menginduksi pembentukan embrio somatik dari potongan tangkai buah, kotiledon, dan embrio zigotik (Litz dan Conover 1980; Litz *et al.* 1983; Chen *et al.* 1991).

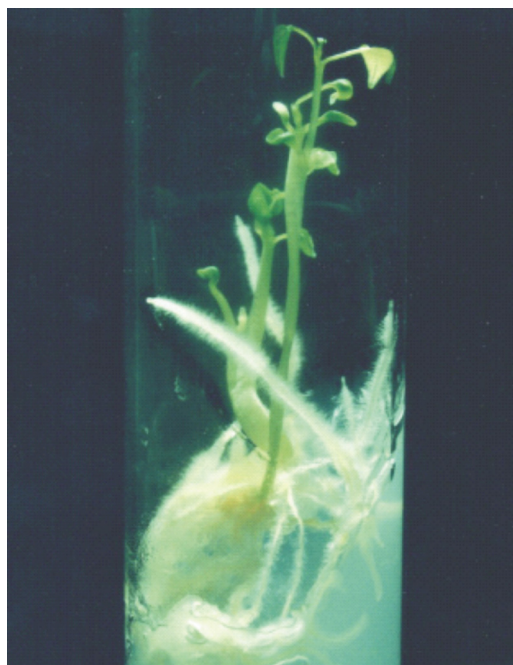
Jumlah embrio somatik per eksplan tertinggi (66,61) terdapat dalam media MS yang ditambah 5,0 mg/l 2,4-D dan 0,01 mg/l BAP (media L)

setelah 8 minggu pengkulturan (Gambar 2C). Embrio somatik sekunder juga terjadi pada permukaan embrio somatik primer (Gambar 3). Pembentukan embrio somatik sekunder yang dalam hal ini disebut *recurrent embryogenesis* atau *repetitive embryogenesis* disebabkan oleh embrio somatik yang masih berbentuk globular gagal menjadi masak dan sel-sel yang ada di permukaan embrio tersebut membentuk embrio baru. Hal ini disebabkan oleh keberadaan 2,4-D di dalam media kultur.

Konsentrasi 2,4-D yang tinggi dalam media dapat menghambat pemasakan embrio, karena auksin (2,4-D) dapat merangsang sintesis endogen etilen (Arteca *et al.* 1993). Etilen akan meningkatkan aktivitas dari enzim selulase dan/atau pektinase (Wochock dan Wetherell 1971). Enzim-enzim tersebut akan mengurangi ikatan-ikatan sel-sel yang terdapat di permukaan embrio (epidermis), sehingga sel-sel tersebut seakan-akan berdiri sendiri dan mulai berkembang menjadi embrio-embrio baru yang disebut embrio sekunder (Maheswaran dan Williams 1986; Merkle dan Sommer 1986). *Recurrent embryogenesis* dapat dicegah dengan memindahkan embrio somatik



Gambar 3. Embrio somatik sekunder (anak panah) terbentuk dari permukaan embrio somatik primer 8 minggu setelah kultur (*Secondary globular embryos (white arrows) emerged from the surface of primary globular embryos at 8 weeks after culture*)



Gambar 4. Plantlet yang terbentuk dari embrio somatik 8 minggu setelah pemindahan ke media MS tanpa zat pengatur tumbuh (*Plantlet from somatic embryo 8 weeks after subculture on germination medium*)

ke media yang tidak mengandung zat pengatur tumbuh, sehingga perkembangan embrio dari globular menjadi bentuk torpedo dan embrio yang masak dapat terjadi (Chen *et al.* 1991).

Embrio somatik yang telah masak ditandai dengan terbentuknya kotiledon yang berwarna kekuningan atau kehijauan. Pemasakan dan perkecambahan embrio terjadi pada media tanpa auksin, karena kandungan auksin yang tinggi dalam media dapat menghambat pemasakan embrio dan pertumbuhan embrio apabila proembrio tidak segera dipindah ke media yang rendah atau tanpa auksin (Muralidharan dan Mascarenhas 1987; Parrott *et al.* 1988), sehingga 8 minggu kemudian plantlet sudah dapat diaklimatisasi (Gambar 4). Perkecambahan embrio dimulai dengan pemanjangan hipokotil, pembesaran dan pelebaran kotiledon dan keluarnya bulu-bulu akar.

Induksi dan regenerasi embrio somatik pepaya adalah salah satu tahap awal dari perbaikan varietas tanaman pepaya. Tahapan selanjutnya adalah memodifikasi sifat-sifat tanaman dengan

menyisipkan karakter-karakter spesifik melalui transfer gen. Transfer gen dapat dilakukan dengan beberapa teknik, antara lain menggunakan *particle gun*, *Agrobacterium-mediated*, mikroinjeksi gen terhadap protoplas atau menggunakan *electroporation*. Penggabungan sifat dari 2 atau lebih spesies pepaya yang berbeda juga bisa dimungkinkan dengan mengisolasi protoplas dari embrio somatik masing-masing spesies dan dilanjutkan dengan fusi protoplas spesies-spesies tersebut. Perbanyakan masal embrio hasil modifikasi dapat dilakukan dengan teknik kultur suspensi sel.

KESIMPULAN

1. Pembentukan embrio somatik tertinggi (74,55%) diperoleh dengan mengkulturkan embrio zigotik ke dalam media MS yang mengandung 5,0 mg/l 2,4-D.
2. Pembentukan kalus tertinggi (52,58%) didapat pada media MS yang mengandung kombinasi 2,4-D 1,0 mg/l dan BAP 0,01 mg/l.
3. Jumlah embrio somatik per eksplan terbanyak (66,61) diperoleh pada media MS yang ditambah dengan 5,0 mg/l 2,4-D dan 0,01 mg/l BAP.
4. Zat pengatur tumbuh 2,4-D sangat diperlukan pada tahap induksi dan perbanyakan embrio somatik, tetapi tidak diperlukan pada tahap pemasakan dan perkecambahan embrio somatik pepaya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Disampaikan kepada Azmi Abdul Rasid, MPhil., staf pengajar di Jabatan Sains Tanaman Fakultas Pertanian dan Prof. Dr. Marziah Mahmood, staf pengajar di Jabatan Mikrobiologi dan Bioteknologi Fakultas Sains Alam Sekitar, Universiti Putra Malaysia, yang telah mengoreksi penulisan hasil penelitian ini. Ucapan yang sama juga disampaikan kepada Bank Dunia melalui proyek ARMP-II yang telah membiayai kegiatan penelitian ini serta Jabatan Sains Tanaman Fakultas Pertanian, Universiti Putra Malaysia yang telah menyediakan fasilitas penelitian.

PUSTAKA

1. Anbazhagan, V.R. and Ganapathi, A. 1999. Somatic embryogenesis in cell suspension cultures of pigeonpea (*Cajanus cajan*). *J. Plant Cell Tiss. Org. Cul.* 56: 179-184.
2. Arteca, J.M., Botella, J.R., and Arteca, R.N. 1993. Effect of plant hormones on ACC sythases gene expression in etiolated mung beans. *J. Plant Physiol.* 102:110-113.
3. Chen, M.H., Wang P.J. and Maeda E. 1987. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Carica papaya* L. tissue culture derived from root explants. *J. Plant Cell Rep.* 6:384-381.
4. _____, Chen, C.C., Wang, D.N. and Chen, F.C. 1991. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of *Carica papaya* X *Carica cauliflora* cultured in vitro. *Can. J. Bot.* 69: 1913-1918.
5. de Klerk, G.J. 1998. Plant hormones in tissue culture. In: *Duchefa catalogue 98-99. Biochemicals, Plant Cell and Tissue Culture, Haarlem.* Duchefa Biochemie BV, Netherland, pp. 19-23.
6. Evans, D.A., Sharp, W.R. and Flick, C.E. 1981. Growth and behavior of cell cultures: embryogenesis and organogenesis. In *Plant Tissue Culture: Methods and Applications in Agriculture*. Ed. T.A. Thorpe, New York. Academic Press Inc. pp 45-113.
7. Hintze, J.L., 1996. *NCSS 6.0: Statistical System for Windows*. Utah, Kaysville.
8. Jordan, M. and Velozo, J. 1996. Improvement of somatic embryogenesis in highland-papaya cell suspensions. *J. Plant Cell Tiss.Org. Cul.* 44:189-194.
9. Litz, R.E. and Conover, R.A. 1980. Somatic embryogenesis in cell cultures of *Carica stipulata*. *HortSci.* 15(6):733-735.
10. _____ 1982. In vitro somatic embryogenesis and plant regeneration from *Carica papaya* L. ovular callus. *J. Plant Sci. Let.* 26:159-165.
11. _____, O'Hair, S.K. and Conover, R.A. 1983. In vitro growth of *Carica papaya* L. cotyledons. *Sci. Hort.* 19:287-293.
12. Maheswaran, G. and Williams, E.G. 1986. Primary and secondary direct somatic embryogenesis fro immature zygotic embryos of *Brassica campestris*. *J. Plant Physiol.* 124:455-463.
13. Manshardt, R.M. and Wenslaff T.F. 1989. Interspecific hybridization of papaya with other *Carica* species. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 114(4):689-694.
14. Merkle, S.A. and Sommer, H.E. 1986. Somatic embryogenesis in tissue culture of *Liriodendron tulipifera*. *Can. J. For. Res.* 16:420-422.
15. _____, Parrott, W.A. and Williams, E.G. 1990. Applications of somatic embryogenesis and embryo cloning. In: *Plant Tissue Culture: Applications and Limitations*, (Bojwani, S.S., ed), The Netherlands. Elsevier, pp. 67-101.
16. Muralidharan, E.M. and Mascarenhas, A.F. 1987. In vitro planlet formation by organogenesis in *E. camaldulensis* and by somatic embryogenesis in *Eucalyptus citriodora*. *J. Plant Cell Rep.* 6:256-259.
17. Parrott, W.A., Dryden, G., Voght, S., Hildebrand, D.F. Collins, G.B. and Williams, E.G. 1988. Optimization of somatic embryogenesis and embryo germination in soybean. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 24:817-820.
18. Wochock, Z.S. and Wetherell, D.F. 1971. Suppression of organized growth in cultured wild carrot tissue by 2-chloroethyl-phosphoric acid. *Plant Cell. J. Physiol. Tokyo.* 12:771-774
19. Yang, J-S, Yu T-A, Cheng Y-H and Yeh S-D. 1996. Transgenic papaya plants from Agrobacterium-mediated transformation of petioles of in vitro propagated multishoots. *J. Plant Cell Rep.* 15:459-464.
20. Yie, S.T. and Liaw, S.I. 1977. Plant regeneration from shoot tips and callus of papaya. *J. In Vitro* 13:564-568.