

Identificación y selección de híbridos somáticos obtenidos mediante fusión de protoplastos

Wayner Montero-Carmona¹ y Víctor M. Jiménez^{2*}. *Autor para correspondencia.

¹Centro de Investigación y Desarrollo Agrícola Sostenible para el Trópico Húmedo, Escuela de Agronomía, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Sede Regional San Carlos, Costa Rica.

²Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS), Universidad de Costa Rica, 2060 San Pedro, Costa Rica. e-mail: victor.jimenez@ucr.ac.cr

RESUMEN

El poder seleccionar eficientemente las plantas híbridas producidas a partir de fusión de protoplastos es fundamental. Se han logrado muchos avances en el tema en las últimas décadas. Entre los métodos utilizados para la identificación de híbridos somáticos se encuentran la selección por características morfológicas (tipo de crecimiento, tipo de hoja, tallo, flor o fruto, color de la flor o tipo de inflorescencia), la selección mediante micromanipulación (o manual), la citometría de flujo, la complementación, el conteo de cromosomas, la detección por isoenzimas y la utilización de marcadores moleculares, tales como el polimorfismo mediante amplificación al azar o RAPD, la hibridación genómica *in situ* (GISH), las secuencias repetitivas simples (SSR) o microsatélites, las secuencias intergénicas repetitivas simples (ISSR), los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) y los polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP). También, el análisis isoenzimático ha sido uno de los métodos de selección más utilizados por muchos años. Aunque las técnicas moleculares basadas en el ADN se han convertido en métodos confiables para la detección de híbridos somáticos, la citometría de flujo ofrece la alternativa más rápida y sensible para la selección de las células híbridas. No obstante, los equipos necesarios para su aplicación son de un precio muy elevado. La aplicación de más de un método de detección temprana de híbridos somáticos permite aumentar la eficiencia en su selección. En esta reseña bibliográfica se describen los métodos más utilizados para la detección de híbridos somáticos y se hace un listado exhaustivo, con ejemplos de su utilización a partir de 1974.

Palabras clave: isoenzimas, técnicas moleculares

ABSTRACT

Efficient selection of hybrid plants produced by protoplast fusion is very important. Several advances have been made on the subject in recent decades. The methods used for the identification of somatic hybrids include selection by morphological characteristics (growth, leaf, stem, flower or fruit type, flower color or type of inflorescence), micromanipulation (or manual selection), flow cytometry, complementation, chromosome counting, isozyme detection and the use of molecular markers, such as random amplification of polymorphic DNA (RAPD), genomic *in situ* hybridization (GISH), simple sequence repeats or microsatellites (SSR), the inter-simple sequence repeats (ISSR), restriction fragment length polymorphisms (RFLP) and amplified fragment length polymorphisms (AFLP). Isozyme analysis was a very common selection method for many years. Although, molecular techniques based on DNA have become reliable methods to detect somatic hybrids. Flow cytometry offers a more rapid and sensitive method for the selection of hybrid cells. However, the equipment needed for its implementation is very expensive. Use of more than one method for early detection of somatic hybrids increases the selection efficiency. This review describes the methods used for detection of somatic hybrids and presents a list of examples on their use from 1974 on.

Key words: isozymes, molecular techniques

Contenido

INTRODUCCIÓN

MÉTODOS PARA LA SELECCIÓN DE HÍBRIDOS SOMÁTICOS

- Selección morfológica
- Selección manual
- Citometría de flujo
- Complementación
- Conteo de cromosomas
- Isoenzimas
- Marcadores moleculares de ácido desoxirribonucleico (ADN)

CONSIDERACIONES FINALES

INTRODUCCIÓN

La hibridación de plantas por medio de la fusión de protoplastos es una herramienta con gran potencial para la generación de nuevas combinaciones genéticas entre especies sexualmente incompatibles (Cocking, 1979; Li *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2005; Geerts *et al.*, 2008). Esta fue referida por primera vez en 1972 por Carlson y colaboradores (Pauls, 2005). Los híbridos somáticos son producto de la fusión química o eléctrica de protoplastos (Bengochea y Dodds, 1987). Durante esta se da la coexistencia inicial de dos núcleos y de los citoplasmas pertenecientes a las dos células somáticas fusionadas, que genera una etapa de heterocariosis. Si se da la fusión de los núcleos durante la mitosis, entonces la producción de células híbridas está completa. Los productos de una fusión simétrica (ambos genomas se fusionan) presentan características complementarias entre los padres o donadores (Sakamoto y Taguchi, 1991; Kirti *et al.*, 1992ab).

Debido a la presencia de dos núcleos en una misma célula, ocurre un cierto grado de inestabilidad que puede causar la pérdida total o parcial de uno de los genomas. Las plantas regeneradas en este tipo de eventos suelen parecerse más a uno de los donantes (Binding *et al.*, 1988; Fahleson *et al.*, 1988ab; Wijbrandi *et al.*, 1990a; Lindsay *et al.*, 1995; Navrátilová, 2004). Muchas veces, cuando ocurre pérdida de un cromosoma, también otros se pierden con gran rapidez. Cuando se eliminan todos los cromosomas de uno de los donantes, se forman cíbridos (mezcla de los citoplasmas de ambos donadores pero con solo el núcleo de uno de los dos parentales). También se pueden formar cíbridos cuando ocurre división de células heterocariontes que no han intercambiado su contenido nuclear, o bien inactivando el genoma nuclear de uno de los donantes con rayos X o rayos gamma, produciendo así colonias que exhiben las características nucleares de uno de los protoplastos parentales pero con organelas de ambos (Blackhall *et al.*, 1994; Navrátilová, 2004).

Un aspecto crítico para el uso efectivo de la hibridación somática es la selección de los fusionantes (Blackhall *et al.*, 1994). La tasa de fusión en un evento típico es muy baja. Aproximadamente 1-2% de fusionantes pueden ser obtenidos durante el proceso de fusión de protoplastos, los cuales, al colocarse en condiciones de selección apropiadas, pueden ser identificados y seleccionados (Cocking, 1979; Lindsay *et al.*, 1995).

Se han publicado numerosos trabajos relacionados con la identificación y caracterización de híbridos somáticos provenientes de fusiones intraespecíficas, interespecíficas e intergenéricas, particularmente en las familias *Solanaceae*, *Umbelliferae*, *Fabaceae*, *Poaceae*, *Rutaceae*, *Leguminosae* y *Brassicaceae* (Grosser y Gmitter, 1990; Wolters *et al.*, 1994; Waara y Glimelius, 1995; Guo *et al.*, 2004); sin embargo, no hay una revisión de literatura reciente específica sobre

el tema de selección e identificación de híbridos somáticos. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue presentar, en forma resumida, una recopilación de los principales métodos de selección e identificación de híbridos somáticos publicados en la literatura científica, relacionándolos con los casos particulares en que fueron utilizados.

MÉTODOS PARA LA SELECCIÓN DE HÍBRIDOS SOMÁTICOS

La caracterización de híbridos somáticos se ha realizado mediante indicadores morfológicos, selección manual, complementación, conteo de cromosomas y pruebas bioquímicas o moleculares (Blackhall *et al.*, 1994).

Selección morfológica

La selección morfológica se basa en la detección de variaciones fenotípicas en el híbrido somático al compararlo con los progenitores (Lindsay *et al.*, 1995; Cheng *et al.*, 2004). Algunas características, como el tipo de crecimiento (tallo erecto, tallo rastrero o semirastrero) y color de la flor, han sido utilizadas para este fin (Mendis *et al.*, 1991). Por otro lado, en la fusión de tomate (*Lycopersicon* spp.) y papa (*Solanum tuberosum* L.), Lindsay *et al.* (1995) evaluaron características tales como la forma, el tamaño y los tipos de tricomas, así como la pigmentación de hojas, tallos y flores. Iwamoto *et al.* (2007), por su parte, evaluaron características, como: altura, diámetro del tallo, tipo de hoja, color de la flor, tipo de inflorescencia y peso seco de la raíz, en fusionantes de *Solanum*. Fenotípicamente, dichas plantas presentaron un desarrollo intermedio al de los parentales. El tipo de hoja ha permitido, también, la identificación de híbridos somáticos en cítricos (Grosser *et al.*, 1992ab; Tusa *et al.*, 1992). Además, fusionantes de *Lotus corniculatus* con *L. tenuis* fueron caracterizados mediante su patrón de crecimiento, tipo de hoja y color de flor (Aziz *et al.*, 1990).

La identificación morfológica, sin involucrar otro tipo de marcador, tiene el problema de que es necesario cultivar la mayor cantidad de plantas posible, junto con los parentales, durante un período de tiempo considerable, hasta que las características se manifiesten, para luego realizar la selección al comparar los fenotipos. La selección en etapas tempranas de desarrollo, por medio de metodologías que no requieran la regeneración de gran cantidad de plantas que luego serán desechadas, evita, en gran medida, esta problemática (Hammatt *et al.*, 1990).

Selección manual

La selección manual (o micromanipulación) de los productos de fusión se utiliza cuando las dos poblaciones de protoplastos parentales pueden ser identificadas fácilmente. Esto facilita la selección

de los heterocariones y de los protoplastos fusionados. Uno de los prerrequisitos para el aislamiento manual y posterior cultivo de únicamente los heterocariones es la posibilidad de reconocerlos fácilmente y de distinguirlos de los homocariones (fusionantes entre protoplastos del mismo donador) (Patnaik *et al.*, 1982). Mendis *et al.* (1991) mencionan que el ejemplo típico de este procedimiento es la fusión entre protoplastos de mesófilo de hoja (de coloración verde por la presencia de clorofila) con protoplastos obtenidos de suspensiones celulares cultivadas en oscuridad (incolores, debido a la presencia de protoplastos y leucoplastos).

Cuando se fusionan protoplastos que tienen características similares (fusión entre protoplastos de mesófilo o entre protoplastos provenientes de suspensiones celulares sin color, por ejemplo) resulta de gran utilidad la tinción con fluorescencia (Patnaik *et al.*, 1982). Para ello, los protoplastos de uno de los parentales son marcados con fluorescencia verde mediante diacetato de fluoresceína ($1-20 \text{ mg l}^{-1}$), y luego se fusionan con los protoplastos del otro parental, el cual produce fluorescencia roja por autofluorescencia de la clorofila (Patnaik *et al.*, 1982; Gilmour *et al.*, 1987; Mendis *et al.*, 1991; Navrátilová 2004), o bien mediante tratamiento con isotiocianato de rodamina, rodamina 123 o escopoletina ($10-20 \text{ mg l}^{-1}$) (Barsby *et al.*, 1984). La fluorescencia presentada por los fusionantes puede persistir en las células híbridas hasta 12 días, lo que facilita la selección de las colonias de heterocariones e híbridos somáticos en las primeras etapas de desarrollo (Patnaik *et al.*, 1982; Gilmour *et al.*, 1989).

Al estudiar la eficiencia del polietilenglicol (PEG) en la fusión de protoplastos, Kao y colaboradores obtuvieron fusionantes de cebada (*Hordeum vulgare* Lin) y soya (*Glycine max*), así como de maíz (*Zea mays*) y soya. En ambos casos se logró la selección de los híbridos somáticos mediante micromanipulación de los fusionantes entre células verdes de mesófilo y células incolores de suspensiones celulares (Kao y Michayluk, 1974; Kao *et al.*, 1974). Igualmente, la presencia de antocianinas en protoplastos de hipocótilos de *Corchorus olitorius* (yute) fue utilizada para la selección manual de fusionantes con protoplastos verdes de cotiledones de *Corchorus capsularis* (Saha *et al.*, 2001).

Aunque la micromanipulación individual de los fusionantes consume mucho tiempo y es tediosa (Blackhall *et al.*, 1994; Navrátilová 2004), es el método más directo para la selección de los productos de fusión. Además, permite la extracción de híbridos aun cuando su porcentaje sea muy bajo, inclusive menor de 1% (Patnaik *et al.*, 1982; Gilmour *et al.*, 1989), lo que lo convierte en un método muy confiable (Mendis *et al.*, 1991).

Para la correcta selección manual de los fusionantes se requiere de un microscopio óptico invertido con, al menos, un micromanipulador, así como de accesorios

para epifluorescencia cuando se usan tintes fluorescentes (Patnaik *et al.*, 1982). Dichos equipos tienen un alto costo y requieren del desarrollo de pericia para su utilización, por lo que la selección manual, en muchos casos, depende de su disponibilidad y de la habilidad del personal de laboratorio. Otro inconveniente que puede presentar esta metodología es que la intensidad de la fluorescencia de los compuestos puede variar entre células del mismo donador, lo cual puede generar problemas durante la identificación de algunos heterocariones (Ozias-Akins *et al.*, 1986).

Citometría de flujo

La citometría de flujo se basa en la medición de la refracción de la luz al pasar por un fluido (Eeckhaut *et al.*, 2005). Para ello, se utiliza el sistema de fluorescencia con el marcaje de ambas poblaciones de protoplastos parentales, descrito antes. En un citómetro de flujo, las células resultantes de un experimento de fusión son transportadas en un flujo líquido entre una fuente de luz y un detector de fluorescencia. La corriente de flujo es reducida y dispersada en gotas, permitiendo que una computadora separe electrostáticamente las gotas que contienen híbridos somáticos (Harkins y Galbraith, 1984). Este proceso es completamente automático y rápido, por lo que aproximadamente 12 000 protoplastos pueden ser analizados y separados por minuto (Blackhall *et al.*, 1994).

Ejemplos exitosos de selección con este método se han obtenido en la fusión de tomate con papa (Lindsay *et al.*, 1995), trigo (*Triticum aestivum*) con maíz (Gönter *et al.*, 2002) y *Hordeum vulgare* con *Datura innoxia* (Alexander *et al.*, 1985). Esta técnica se recomienda cuando se logra aislar y fusionar concentraciones altas (superiores a los 5×10^7 protoplastos ml^{-1}) de protoplastos parentales (Blackhall *et al.*, 1994).

Sin embargo, el equipo necesario es bastante costoso y tasas de fusión menores del 10% afectan negativamente la efectividad de la técnica. Además, las técnicas químicas de fusión provocan a veces la formación de pseudo-heterocariones (protoplastos marcados con fluorescencia a los cuales de les adhirió en la plasmalema cloroplastos libres por la ruptura de otros protoplastos o protoplastos de ambos tipos adheridos uno al otro sin fusionarse) los cuales pueden dar falsos positivos en el citómetro de flujo. En la electrofusión la cantidad de pseudo-protoplastos es mínima, por lo cual la citometría de flujo es ampliamente recomendada (Hammatt *et al.*, 1990).

Otro factor a considerar es el flujo de la solución, el cual debe ser ajustado apropiadamente debido a que la velocidad de paso puede afectar la eficiencia de la técnica para detectar fusionantes. Por lo general, flujos bajos (100-200 gotas por segundo) permiten una buena detección y separación (Afonso *et al.*, 1985; Hammatt *et al.*, 1990). También, los cloroplastos pueden presentar niveles

mínimos de fluorescencia roja o verde (aún cuando estén teñidos con colorantes fluorescentes) lo que dificulta la selección automatizada utilizando el citómetro de flujo en algunos eventos de fusión.

Complementación

La complementación se basa en la incapacidad de los protoplastos parentales (o donadores) de poder regenerar plantas completas bajo ciertas condiciones de cultivo. No obstante, y por complementariedad, los fusionantes adquieren la capacidad de sobrevivir en las condiciones seleccionadas y regenerar plantas (Cocking *et al.*, 1977; Göntér *et al.*, 2002). Durante la preparación de los protoplastos se debe realizar una selección minuciosa de las características de complementariedad a utilizar, algunas de las cuales también pueden ser inducidas. Posterior a la fusión, y si la complementación se da, el desarrollo de células híbridas da lugar al crecimiento de plantas. En algunos casos, las especies parentales que, en teoría, no deberían crecer en las condiciones de cultivo restrictivas, forman colonias celulares. Estas colonias, sin embargo, no llegan a regenerar plantas en las condiciones restrictivas, por lo que se pueden seleccionar fácilmente. Este método de selección permite la detección de híbridos somáticos en estadios tempranos del desarrollo (Cocking *et al.*, 1977).

En los protocolos publicados se ha utilizado complementación de medios de cultivo (Power *et al.*, 1976; Smith *et al.*, 1976; Sakomoto y Taguchi 1991; Göntér *et al.*, 2002), así como el uso de mutantes

bioquímicos con autotrofia o auxotrofia hormonal, resistencia a antibióticos o a toxinas, o con la capacidad de metabolizar aminoácidos análogos (Power *et al.*, 1976; Maliga *et al.*, 1977; Glimelius *et al.*, 1978; Menczel *et al.*, 1978; Potrykus *et al.*, 1984; Aziz *et al.*, 1990; Mendis *et al.*, 1991). En la figura 1 se presenta un esquema que ejemplifica el proceso de selección mediante complementación.

Polgar *et al.* (1999) lograron identificar fusionantes de *Solanum tuberosum* con *Solanum brevidens* mediante la resistencia a *Erwinia carotovora* var. *carotovora* presente en los protoplastos de la primera especie y la incapacidad de *S. brevidens* de desarrollar colonias multicelulares en el medio de cultivo con extracto de la bacteria. En fusionantes de *Solanum bulbocastanum* con *S. tuberosum*, Helgeson *et al.* (1998) utilizaron la resistencia a *Phytophthora infestans* presente en *S. bulbocastanum* para la selección de híbridos somáticos. La selección de híbridos somáticos mediante sensibilidad de los padres a aminoácidos análogos, como S(2-aminoetil)-L-cisteína (AEC) y DL-5-metilriptófano (5MT), fue informada por primera vez por White y Vasil (1979). Tabaeizadeh *et al.* (1986) utilizaron AEC en protoplastos de *Pennisetum americanum* para la complementación con protoplastos de caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido) inactivados mediante iodoacetato. También la resistencia al ácido acetidin-2-carboxílico, junto con tratamientos con acetato de yodo, han mostrado ser útiles para la selección de híbridos somáticos de zanahoria (*Daucus carota*) mediante complementación (Cella *et al.*, 1983).

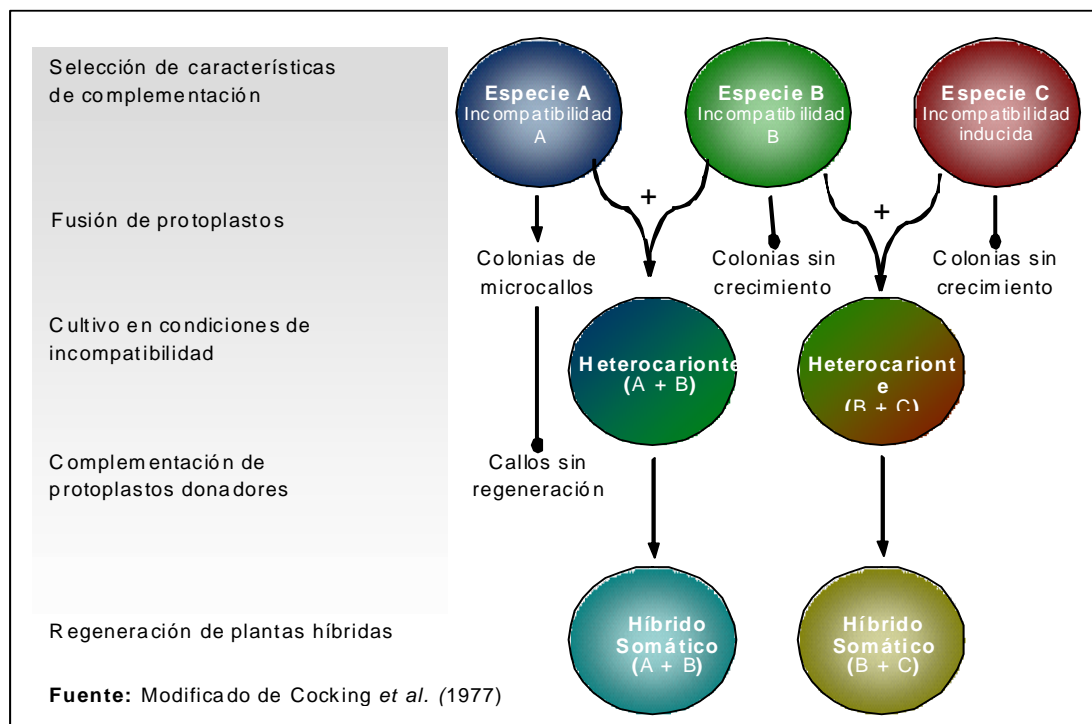


Figura 1. Proceso de selección de híbridos somáticos mediante complementación (→ Crecimiento de colonias;

—● Sin desarrollo; + Fusión).

La utilización de mutantes albinos también ha sido exitosa para la selección de fusionantes identificados por su capacidad para producir clorofila en presencia de luz (Cocking *et al.*, 1977; Menczel *et al.*, 1978; Gilmour *et al.*, 1989). El primer ejemplo de complementación mediante el uso de protoplastos albinos fue informado por Giles (1972). El proceso se basa en la regeneración de híbridos somáticos de color verde a partir de donantes albinos y donantes (con clorofila) incapaces de desarrollarse en el medio de cultivo usado (Mendis *et al.*, 1991; Göntér *et al.*, 2002).

Uno de los principales problemas para el uso de la complementación de protoplastos para la selección de híbridos es la falta de mutantes que permita la selección (Patnaik *et al.*, 1982). Además, la aplicación de aminoácidos análogos en concentraciones relativamente altas puede ocasionar problemas en la regeneración de los híbridos somáticos, y reducir su desarrollo (Ozias-Akins *et al.*, 1986).

Conteo de cromosomas

El número de cromosomas de los híbridos somáticos simétricos debe ser el resultado de la suma del número cromosómico de los donadores (Kao, 1977; Evans, 1983; Li *et al.*, 2004). Sin embargo, como se mencionó anteriormente, con frecuencia se forman híbridos asimétricos durante la división celular, ya que el genoma de alguno de los donantes puede ser eliminado parcial o totalmente (Smith *et al.*, 1976; McGrath *et al.*, 1996; Göntér *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2004; Iwamoto *et al.*, 2007).

Híbridos somáticos obtenidos mediante fusión entre zanahoria y cebada fueron caracterizados mediante conteo de cromosomas por Dudits *et al.* (1977). En híbridos de arroz (*Oryza sativa* L.) con zanahoria, se observó que gran parte del genoma de arroz fue eliminado (Sala *et al.*, 1985). Igualmente, híbridos somáticos entre varias especies de *Medicago* presentaron conteos superiores a los de los donadores; no obstante, ninguno de los casos mostró la sumatoria de los cromosomas de los parentales, lo cual indica que ocurrió pérdida de algunos cromosomas (Mendis *et al.*, 1991).

Una desventaja del uso del conteo de cromosomas es que, con mucha frecuencia, se utilizan puntas de raíces en crecimiento activo para hacer las evaluaciones. Por ello, hay que esperar a que los regenerantes lleguen a esa etapa para realizar la selección, con la consiguiente pérdida en tiempo y de recursos invertidos en plantas que luego deben ser desechadas.

Isoenzimas

La detección de híbridos somáticos por patrones de isoenzimas ha sido, quizá, una de las pruebas más

utilizadas para la caracterización de fusionantes, debido a que en los productos de fusión simétrica y complementaria deberían estar presentes las isoenzimas de ambos donantes, lo cual se puede evidenciar en un gel de almidón o poliacrilamida si tienen diferente movilidad electroforética (O'Connell y Hanson, 1985). Las isoenzimas heterodiméricas tienden a ser más utilizadas en la caracterización de fusionantes debido a que pueden representar más de una región del genoma (Ozias-Akins *et al.*, 1986).

El análisis isoenzimático de shiquimato deshidrogenasas, isocitrato deshidrogenasas y fosfoglucomutasas permitió la identificación de híbridos somáticos en solanáceas (Iwamoto *et al.*, 2007). En cítricos, la detección isoenzimática se ha realizado mediante peroxidasas, fosfoglucomutasas (Grosser *et al.*, 1992a), fosfoglucosa isomerasas (Grosser *et al.*, 1992b; Louzada *et al.*, 1992) y fosfoglucano deshidrogenasas (Tusa *et al.*, 1992).

Li *et al.* (2004) lograron seleccionar híbridos somáticos de *Triticum aestivum* con *Psathyrostachys juncea* (Fisch.) Nevski mediante análisis isoenzimático de peroxidasas. Mientras que Gilmour *et al.* (1987) utilizaron la identificación isoenzimática de esterases y leucin-aminopeptidasas para la selección de células híbridas entre especies de *Medicago*. En híbridos somáticos de lotus (*Lotus corniculatus* + *L. tenuis*), la caracterización isoenzimática se realizó mediante esterases, peroxidasas, fosfoglucomutasas, fosfatasa ácida, malato deshidrogenasas, alcohol deshidrogenasas y la actividad de leucin-aminopeptidasas (Aziz *et al.*, 1990).

Para híbridos entre papa y tomate se evaluaron diez isoenzimas diferentes, de las cuales glucosa-fosfato isomerasas, fosfoglucomutasas y esterases mostraron polimorfismo en las bandas provenientes de los parentales (Lindsay *et al.*, 1995). Sin embargo, en *Pennisetum americanum* + *Panicum maximum*, solo las isoenzimas de alcohol deshidrogenasa, aminopeptidasa, shiquimato deshidrogenasa y fosfoglucano deshidrogenasa permitieron la identificación de híbridos somáticos (Ozias-Akins *et al.*, 1986).

Menczel *et al.* (1978) informaron que en *Nicotiana knightiana* + *N. sylvestris*, isoenzimas de esterasa y alcohol deshidrogenasa permitieron la caracterización de híbridos somáticos. Por su parte, para el híbrido obtenido entre caña de azúcar y *Pennisetum americanum*, la fosfoglucano deshidrogenasa presentó las bandas provenientes de ambos padres (Tabaeizadeh *et al.*, 1986). También, fusionantes de *Nicotiana tabacum* + *N. glutinosa* fueron identificados con isoenzimas de peroxidasa, leucin-aminopeptidasa, glutamato-oxaloacetato transaminasa y ribulosa bifosfato carboxilasa (Horn *et al.*, 1983).

En yute (*Corchorus capsularis* + *Corchorus olitorius*), el uso de peroxidasas facilitó la identificación de fusionantes (Saha *et al.*, 2001). Igualmente, híbridos somáticos de *Triticum aestivum* con *Agropyron elongatum* presentaron bandas de esterasas y peroxidasas provenientes de ambos parentales (Cheng *et al.*, 2004).

Marcadores moleculares de ácido desoxirribonucleico (ADN)

A partir de inicios de la década de 1990, las técnicas moleculares basadas en ADN (tales como los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción o RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), los polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados o AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), la amplificación aleatoria del ADN polimórfico o RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*), las secuencias repetitivas simples SSR (*Simple Sequence Repeat*) o *Microsatellite*) o microsatélites y la hibridación genómica *in situ* o GISH (*Genomic in situ Hybridization*) se han convertido en métodos rápidos para la detección de híbridos somáticos (Baird *et al.*, 1992; Xu *et al.*, 1993; Li *et al.*, 2004).

Los AFLPs han sido utilizados con resultados satisfactorios en varias especies. Por ejemplo, los RFLPs, obtenidos mediante las enzimas de restricción *Xba*I y *Eco*RI, confirmaron la presencia de secuencias homólogas provenientes de los dos parentales (*Pennisetum americanum* y *Panicum maximum*) en el ADN del híbrido somático (Ozias-Akins *et al.*, 1986). De igual manera, RFLPs, utilizando las enzimas de restricción *Bam*HI, *Dra*I, *Eco*RI, *Eco*RV, *Hind*III y *Xba*I, fueron utilizados para la selección de fusionantes de *Solanum acaule* + *Solanum tuberosum* (Yamada *et al.*, 1998).

En *Nicotiana glauca* + *N. langsdorfii*, se utilizaron las enzimas de restricción *Acc*I, *Ava*I, *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III, *Hpa*II, *Kpn*I, *Sal*I, *Sma*I, de caña de azúcar + *Pennisetum americanum* Sau961, *Xba*I y *Xho*I para la detección de híbridos somáticos (Uchimiya *et al.*, 1983) y la enzima de restricción *Xba*I mostró ser una herramienta importante en la selección, mediante RFLPs, de híbridos con ADN ribosomal (Tabaeizadeh *et al.*, 1986). Otros autores, como Saul y Potrykus (1984) han realizado análisis mediante RFLPs con la enzima de restricción *Hind*III que permitieron la detección de híbridos somáticos entre *Hyoscyamus muticus* y *Nicotiana tabacum*. Igualmente, en *Brassica juncea* y *Moricandia arvensis* (Kirti *et al.*, 1992a) y *Trachystoma ballii* con *Brassica juncea* (Kirti *et al.*, 1992b).

En híbridos de *Solanum tuberosum* + *S. brevidens*, análisis mediante RFLPs (con las enzimas de restricción *Eco*RI, *Eco*RV, *Bam*HI, *Dra*I y *Hind*III) de la progenie obtenida permitieron la detección de

híbridos somáticos (Pehu *et al.*, 1989, Fehér *et al.*, 1992, Williams *et al.*, 1993). De igual manera, en fusionantes de *Diospyros glandulosa* con *D. kaki*, Tamura *et al.* (1998) emplearon la enzima de restricción *Sty*I para la detección y caracterización de híbridos somáticos. También en menta, se emplearon las enzimas *Apa*I y *Stel*I para la detección de híbridos somáticos mediante RFLP (Krasnyanski *et al.*, 1998).

Por su parte, AFLPs también han sido utilizados para la detección de híbridos somáticos en tomate (Thieme *et al.*, 2008), *Allium ampeloprasum* con *A. cepa* (Buiteveld *et al.*, 1998), *Cucumis melo* con *C. anguria* var. *longipes* (Dabauza *et al.*, 1998), *Oryza sativa* con *Daucus carota* (Kisaka *et al.*, 1994) y *Daucus carota* con *Nicotiana tabacum* (Kisaka y Kameya, 1994).

Los análisis mediante RAPDs han sido importantes para la evaluación de fusionantes intra e interespecíficos en papa (Polgar *et al.*, 1999). RAPDs también han permitido la identificación de híbridos somáticos en trigo + maíz (Göntér *et al.*, 2002). Esta técnica ha sido utilizada, adicionalmente, para la evaluación de fusionantes entre *Solanum tuberosum* y *S. brevidens* (Baird *et al.*, 1992; Xu *et al.*, 1993; Rokka *et al.*, 1994), así como sus progenies obtenidas de retrocruzas (McGrath *et al.*, 1994, 1996). RAPDs y RFLPs (con las enzimas de restricción *Hind*III y *Bam*HI) permitieron la selección de híbridos somáticos en productos de fusión de trigo con *Agropyron elongatum* (Cheng *et al.*, 2004).

Por otro lado, los SSR han sido utilizados para la detección de híbridos somáticos de *Triticum aestivum* + *Psathyrostachys juncea* (Fisch.) Nevski (Li *et al.*, 2004). Los microsatélites son de tipo codominante lo que, a diferencia de los RAPDs y los RFLPs, permite la identificación simultánea de ambos alelos de los donadores en el híbrido somático (Johnson, 1998).

Las técnicas moleculares anteriores no permiten la identificación de cromosomas completos, por lo que GISH, una técnica muy utilizada para este fin, puede proporcionar información valiosa a este nivel (Dong *et al.*, 1999; Iwamoto *et al.*, 2007). Pruebas mediante RAPDs y GISH permitieron la detección de híbridos somáticos entre *Solanum integrifolium* y *S. sanitwongsei* (Iwamoto *et al.*, 2007) y entre *Triticum aestivum* y *Psathyrostachys juncea* (Li *et al.*, 2004). Por su parte, Dong *et al.* (1999) demostraron que la combinación de análisis de RFLPs y GISH facilita la detección y caracterización de los cromosomas contenidos en el genoma de híbridos somáticos de papa en relación con los genomas parentales.

La tabla 1 muestra una lista de híbridos somáticos, simétricos y asimétricos, identificados mediante diferentes métodos de selección.

Tabla 1. Híbridos somáticos simétricos o asimétricos identificados mediante diferentes métodos de selección.

Híbrido somático	Método de selección	Referencia
<i>Agropyron elongatum</i> + <i>Triticum aestivum</i>	Cariotipo Molecular (GISH, AFLP y SSR de cloroplastos) Análisis de glutenina	Cui <i>et al.</i> (2009)
<i>Allium ampeloprasum</i> + <i>Allium cepa</i>	Morfología (crecimiento, tipo y color de hoja) Complementación (normal + iodoacetamida) Citometría de flujo Conteo de cromosomas (32 + 16) Isoenzimas (glutamato oxaloacetato transaminasas, shiquimato deshidrogenasas) Molecular (GISH, AFLP)	Buiteveld <i>et al.</i> (1998)
<i>Arabidopsis thaliana</i> + <i>Brassica campestris</i>	Manual (clorofila + incoloro) Conteo de cromosomas (20 + 36)	Hoffmann y Adachi (1981)
<i>Arabidopsis thaliana</i> + <i>Brassica napus</i>	Morfología (tipo de hoja, tallo) Complementación (Luz UV o rayos X + iodo acetato) Molecular (RFLP)	Yamagishi <i>et al.</i> (2002)
<i>Arabidopsis thaliana</i> + <i>Bupleurum scorzonerifolium</i>	Conteo de cromosomas Isoenzimas (esterasas) Molecular (RAPD y SSR)	Wang <i>et al.</i> (2008)
<i>Arabidopsis thaliana</i> + <i>Raphanus sativus</i>	Morfología de hoja y flor Conteo de cromosomas Molecular (RAPD)	Yamagishi y Glimelius (2003)
<i>Armoracia rusticana</i> + <i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	Manual (clorofila + incoloro)	Navrátilová <i>et al.</i> (1997)
<i>Beta vulgaris</i> + <i>Beta vulgaris</i>	Complementación (Luz UV + rayos γ)	Hall <i>et al.</i> (1992)
<i>Brassica juncea</i> + <i>Moricandia arvensis</i>	Morfología (crecimiento, tipo de hoja, flor) Conteo de cromosomas (36 + 28) Molecular (RAPD, RFLP)	Kirti <i>et al.</i> (1992a)
<i>Brassica napus</i> + <i>Eruca sativa</i>	Morfología (crecimiento, tipo de flor) Manual (carboxifluoresceína + clorofila) Isoenzimas (leucin-aminopeptidasas, fosfoglucoisomerasas, 6-fosfogluconato deshidrogenasas) Citometría de flujo Molecular (RFLP)	Fahleson <i>et al.</i> (1988a)
<i>Brassica napus</i> + <i>Isatis indigotica</i>	Conteo de cromosomas Molecular (AFLP, GISH)	Du <i>et al.</i> (2009)
<i>Brassica napus</i> + <i>Orychophragmus violaceus</i>	Morfología de hoja Molecular (GISH)	Zhao <i>et al.</i> (2008)

Tabla 1. Híbridos somáticos simétricos o asimétricos identificados mediante diferentes métodos de selección. Continuación...

Híbrido somático	Método de selección	Referencia
<i>Brassica napus</i> + <i>Raphanus sativus</i>	Morfología de hoja y flor Molecular (SSR, GISH)	Wang <i>et al.</i> (2006)
<i>Brassica napus</i> + <i>Sinapis arvensis</i>	Morfología de hojas y flores Citometría de flujo Molecular (RAPD)	Hu <i>et al.</i> (2002)
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> + <i>Armoracia rusticana</i>	Morfología (tipo y color de hoja) Conteo de cromosomas (18 + 32) Molecular (GISH)	Navrátinová <i>et al.</i> (1997)
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> + <i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i>	Morfología Citometría de flujo Molecular (cebadores que detecten secuencia mitocondrial específica) Complementación (resistencia a frío)	Sigareva y Earle (1997)
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i> + <i>Brassica napus</i>	Manual (incoloros + clorofila) Conteo de cromosomas (18 + 38)	Kao <i>et al.</i> (1992)
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i> + <i>Brassica rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i>	Morfología Citometría de flujo Molecular (RAPD) Complementación (normal + resistencia a <i>Erwinia</i>)	Ren <i>et al.</i> (2000) Liu <i>et al.</i> (2007)
<i>Brassica oleracea</i> + <i>Camelina sativa</i>	Morfología (crecimiento, tipo y color de hoja) Complementación (normal + iodo acetato) Citometría de flujo Isoenzimas (isocitrato deshidrogenasas, aminotransferasas) Molecular (RAPD)	Hansen (1998)
<i>Brassica rapa</i> + <i>Isatis indigotica</i>	Morfología (hoja, flor) Conteo de cromosomas Molecular (AFLP y GISH)	Tu <i>et al.</i> (2008)
<i>Capsella bursa-pastoris</i> + <i>Brassica oleracea</i>	Morfología (tipo y color de hoja) Complementación (resistencia a frío + iodoacetato) Isoenzimas (fosfoglucoasa isomerasas, malato deshidrogenasas, alcohol deshidrogenasas, aspartato amino transferasas, isocitrato deshidrogenasas) Molecular (RAPD)	Sigareva y Earle (1999)
<i>Cichorium intybus</i> + <i>Cichorium endivia</i>	Conteo de cromosomas Molecular (SSR)	Cappelle <i>et al.</i> (2007)

Tabla 1. Híbridos somáticos simétricos o asimétricos identificados mediante diferentes métodos de selección. Continuación...

Híbrido somático	Método de selección	Referencia
<i>Citrus aurantium</i> + <i>Citrus jambhiri</i>	Morfología (tipo de hoja) Conteo de cromosomas (36 + 36) Isoenzimas (p eroxidasas, fosfoglucomutasas, fosfoglucona isomerasas)	Louzada <i>et al.</i> (1992)
<i>Citrus aurantium</i> + <i>Citrus volkameriana</i>	Morfología (tipo de hoja) Conteo de cromosomas (36 + 36) Isoenzimas (p eroxidasas, fosfoglucomutasas, fosfoglucona isomerasas)	Louzada <i>et al.</i> (1992)
<i>Citrus jambhiri</i> + <i>Citrus limon</i>	Morfología (tipo de hoja) Conteo de cromosomas (36 + 36) Isoenzimas (fosfoglucomutasas, fosfoglucona isomerasas, fosfogluconato deshidrogenasas)	Tusa <i>et al.</i> (1992)
<i>Citrus microcarpa</i> + <i>Citrus aurantium</i>	Isoenzimas (fosfoglucomutasas, fosfoglucona isomerasas, isocitrato deshidrogenasas) Molecular (RFLP)	Grosser <i>et al.</i> (1996)
<i>Citrus paradisi</i> + (<i>Citrus reticulata</i> x <i>Citrus sinensis</i>)	Morfología (tipo de hoja) Conteo de cromosomas (36 + 36) Isoenzimas (p eroxidasas, fosfoglucomutasas, fosfoglucona isomerasas)	Grosser <i>et al.</i> (1992b)
<i>Citrus reticulata</i> + <i>Citrus aurantium</i>	Morfología (tipo de hoja) Conteo de cromosomas (36 + 36) Isoenzimas (p eroxidasas, fosfoglucomutasas, fosfoglucona isomerasas, isocitrato deshidrogenasas) Molecular (RFLP)	Louzada <i>et al.</i> (1992) Grosser <i>et al.</i> (1996)
<i>Citrus reticulata</i> + <i>Citrus jambhiri</i>	Morfología (tipo de hoja) Conteo de cromosomas (36 + 36) Isoenzimas (p eroxidasas, fosfoglucomutasas, fosfoglucona isomerasas)	Louzada <i>et al.</i> (1992)
<i>Citrus reticulata</i> + <i>Citrus limonia</i>	Morfología (tipo de hoja) Conteo de cromosomas (36 + 36) Isoenzimas (p eroxidasas, fosfoglucomutasas, fosfoglucona isomerasas)	Louzada <i>et al.</i> (1992)
<i>Citrus reticulata</i> + (<i>Citrus paradisi</i> x <i>Poncirus trifoliata</i>)	Morfología (tipo de hoja) Conteo de cromosomas (36 + 36) Isoenzimas (p eroxidasas, fosfoglucomutasas, fosfoglucona isomerasas)	Grosser <i>et al.</i> (1992b)
<i>Citrus reticulata</i> + <i>Citrus volkameriana</i>	Morfología (tipo de hoja) Conteo de cromosomas (36 + 36) Isoenzimas (p eroxidasas, fosfoglucomutasas, fosfoglucona isomerasas)	Louzada <i>et al.</i> (1992)

Tabla 1. Híbridos somáticos simétricos o asimétricos identificados mediante diferentes métodos de selección. Continuación...

Híbrido somático	Método de selección	Referencia
<i>Citrus reticulata</i> + <i>Poncirus trifoliata</i>	Morfología (tipo de hoja) Conteo de cromosomas (36 + 36) Isoenzimas (p eroxidadasas, fosfoglucomutasas, fosfogluco isomerasas)	Grosser <i>et al.</i> (1992b)
<i>Citrus reticulata</i> x (<i>Citrus reticulata</i> x <i>C. paradisi</i>) + <i>C. sinensis</i>	Morfología (tipo de hoja) Conteo de cromosomas (36 + 36) Isoenzimas (p eroxidadasas, fosfoglucomutasas)	Grosser <i>et al.</i> (1992a)
<i>Citrus sinensis</i> + (<i>Citrus paradisi</i> x <i>Poncirus trifoliata</i>)	Morfología (tipo de hoja) Conteo de cromosomas (36 + 36) Isoenzimas (p eroxidadasas, fosfoglucomutasas, fosfogluco isomerasas)	Louzada <i>et al.</i> (1992)
<i>Citrus sinensis</i> + <i>Citrus limon</i>	Morfología (tipo de hoja) Conteo de cromosomas (36 + 36) Isoenzimas (fosfoglucomutasas, fosfogluco isomerasas, fosfogluconato deshidrogenasas, isocitrato deshidrogenasas) Molecular (RFLP)	Tusa <i>et al.</i> (1992) Grosser <i>et al.</i> (1996)
<i>Citrus sinensis</i> + <i>Citrus limonia</i>	Morfología (tipo de hoja) Conteo de cromosomas (36 + 36) Isoenzimas (p eroxidadasas, fosfoglucomutasas, fosfogluco isomerasas)	Louzada <i>et al.</i> (1992)
<i>Citrus sinensis</i> + <i>Citrus reticulata</i>	Morfología (tipo de hoja) Conteo de cromosomas (36 + 36) Isoenzimas (p eroxidadasas, fosfoglucomutasas)	Grosser <i>et al.</i> (1992a)
<i>Citrus sinensis</i> + <i>Severinia buxifolia</i>	Morfología (tipo de hoja) Conteo de cromosomas (36 + 36) Isoenzimas (p eroxidadasas, fosfoglucomutasas, fosfogluco isomerasas)	Grosser <i>et al.</i> (1992b)
<i>Citrus sinensis</i> + <i>Citrus jambhiri</i>	Morfología (tipo de hoja) Conteo de cromosomas (36 + 36) Isoenzimas (p eroxidadasas, fosfoglucomutasas, fosfogluco isomerasas)	Grosser <i>et al.</i> (1992b)
<i>Corchorus capsularis</i> + <i>Corchorus olitorius</i>	Manual (clorofila + antocianinas) Isoenzimas (p eroxidadasas) Molecular (RFLP)	Saha <i>et al.</i> (2001)
<i>Cucumis melo</i> + <i>Cucumis anguria</i>	Manual (albino + clorofila) Molecular (AFLP)	Dabauza <i>et al.</i> (1998)
<i>Datura innoxia</i> + <i>Datura discolor</i>	Complementación (albino + rayos X) Conteo de cromosomas (24 + 24)	Schieder (1978)

Tabla 1. Híbridos somáticos simétricos o asimétricos identificados mediante diferentes métodos de selección. Continuación...

Híbrido somático	Método de selección	Referencia
<i>Datura innoxia</i> + <i>Datura innoxia</i>	Complementación (albino + rayos X)	Schieder (1977)
<i>Datura innoxia</i> + <i>Datura stramonium</i>	Complementación (albino + rayos X) Conteo de cromosomas (24 + 24)	Schieder (1978)
<i>Daucus carota</i> + <i>Daucus capillifolius</i>	Complementación (albino + medio de cultivo) Morfología (tipo de hoja) Conteo de cromosomas (36 + 36) Isoenzimas (peroxidasas)	Dudits <i>et al.</i> (1977)
<i>Daucus carota</i> + <i>Daucus carota</i>	Complementación (iodoacetato + A2CA)	Cella <i>et al.</i> (1983)
<i>Daucus carota</i> + <i>Nicotiana tabacum</i>	Complementación (rayos X + resistencia a kanamicina-estrep tomicina) Conteo de cromosomas (24 + 32) Presencia del gen que codifica para la neomicina fosfotransferasa Molecular (AFLP)	Kisaka y Kameya (1994)
<i>Daucus carota</i> + <i>Panax quinquefolius</i>	Isoenzimas (peroxidasas) Molecular (RAPD, GISH)	Han <i>et al.</i> (2009)
<i>Dendranthema x grandiflorum</i> + <i>Artemisia sieversiana</i>	Conteo de cromosomas Hibridación Sourthern Morfología (hojas y flores)	Furuta <i>et al.</i> (2004)
<i>Diospyros glandulosa</i> + <i>Diospyros kaki</i>	Citometría de flujo Conteo de cromosomas (30 + 90) Moleculares (RFLP, RAPD)	Tamura <i>et al.</i> (1998)
<i>Eruca sativa</i> + <i>Brassica napus</i>	Citometría de flujo Conteo de cromosomas	Fahleson <i>et al.</i> (1988b)
<i>Festuca arundinacea</i> + <i>Triticum aestivum</i>	Conteo de cromosomas Isoenzimas (peroxidasas) Molecular (RAPD, RFLP, GISH)	Cai <i>et al.</i> (2007)
<i>Glycine max</i> + <i>Hordeum vulgare</i>	Manual (clorofila + incoloros) Morfología (crecimiento, tipo de hoja)	Kao y Michayluk (1974)
<i>Gossypium hirsutum</i> + <i>Gossypium davidsonii</i>	Conteo de cromosomas Molecular (RAPD y SSR)	Sun <i>et al.</i> (2006)
<i>Helianthus annuus</i> + <i>Helianthus maximiliano</i>	Isoenzimas (malato deshidrogenasas, fosfatasa ácida, fosfohexosa isomerasas, 6-fosfogluconato deshidrogenasas, fosfoglucomutasas y aconitasas) Molecular (RAPD)	Taski-Ajdukovic <i>et al.</i> (2006)
<i>Hordeum vulgare</i> + <i>Datura innoxia</i>	Citometría de flujo (normal + diacetato de fluoresceína)	Alexander <i>et al.</i> (1985)

Tabla 1. Híbridos somáticos simétricos o asimétricos identificados mediante diferentes métodos de selección. Continuación...

Híbrido somático	Método de selección	Referencia
<i>Hordeum vulgare</i> + <i>Daucus carota</i>	Manual (incoloros + clorofila) Morfología (crecimiento, tipo y color de hoja, flor) Conteo de cromosomas (18 + 14) Molecular (RFLP)	Kisaka <i>et al.</i> (1997)
<i>Hordeum vulgare</i> + <i>Glycine max</i>	Manual (clorofila + incoloros) Morfología (crecimiento, tipo de hoja)	Kao <i>et al.</i> (1974)
<i>Hyoscyamus muticus</i> + <i>Nicotiana tabacum</i>	Molecular (RFLP)	Saul y Potrykus (1984)
<i>Ipomoea cairica</i> + <i>Ipomoea batatas</i>	Conteo de cromosomas Isoenzimas (peroxidasa) Molecular (RAPD)	Guo <i>et al.</i> (2006)
<i>Iris ensata</i> + <i>Iris germanica</i>	Complementación (albino + iodoacetato) Molecular (RAPD)	Shimizu <i>et al.</i> (1999)
<i>Lotus corniculatus</i> + <i>Lolium perenne</i>	Molecular (amplificación con hebra desplazada)	Raikar <i>et al.</i> (2007)
<i>Lotus corniculatus</i> + <i>Lotus conimbricensis</i>	Morfología (tipo de inflorescencia, color de flor) Complementación (iodoacetato + normal) Isoenzimas (esterasas, fosfoglucomutasas) Conteo de cromosomas (24 + 12)	Wright <i>et al.</i> (1987)
<i>Lotus corniculatus</i> + <i>Lotus tenuis</i>	Morfología (crecimiento, tipo de hoja, color de flor) Complementación (iodoacetato + resistencia a kanamicina) Isoenzimas (esterasas, peroxidasas, fosfoglucomutasas, fosfatasas ácidas, malato deshidrogenasas, alcohol deshidrogenasas, leucinaminopeptidasas) Conteo de cromosomas (24 + 12)	Aziz <i>et al.</i> (1990)
<i>Lupinus angustifolius</i> + <i>Lupinus subcarnosus</i>	Molecular (secuencias específicas para <i>Lupinus</i>)	Sonntag <i>et al.</i> (2009)
<i>Lycopersicon esculentum</i> + <i>Lycopersicon pennellii</i>	Morfología (tipo de hoja, flor) Complementación (rayos γ + normal) Isoenzimas (fosfoglucoisomerasas) Molecular (RFLP)	O'Connell y Hanson (1985)
<i>Lycopersicon esculentum</i> + <i>Lycopersicon peruvianum</i>	Morfología (tipo de hoja, flor) Complementación (normal + rayos γ) Conteo de cromosomas (24 + 24) Isoenzimas (fosfatasas ácidas, glutamato oxaloacetato transaminasas) Resistencia a kanamicina Análisis Southern blot	Wijbrandi <i>et al.</i> (1990ab)

Tabla 1. Híbridos somáticos simétricos o asimétricos identificados mediante diferentes métodos de selección. Continuación...

Híbrido somático	Método de selección	Referencia
<i>Lycopersicon esculentum</i> + <i>Solanum acaule</i>	Morfología Conteo de cromosomas Complementación (iodoacetamida + rayos X γ)	Melchers <i>et al.</i> (1992)
<i>Lycopersicon esculentum</i> + <i>Solanum lycopersicoides</i>	Conteo de cromosomas Morfología de hoja y flor Isoenzimas (cinco)	Handley <i>et al.</i> (1986)
<i>Lycopersicon esculentum</i> + <i>Solanum muricatum</i>	Morfología (crecimiento, tipo de hoja, flor, fruto) Complementación (incompatibilidad con el medio + normal) Conteo de cromosomas (24 + 24)	Sakamoto y Taguchi (1991)
<i>Lycopersicon esculentum</i> + <i>Solanum tuberosum</i>	Morfología Conteo de cromosomas Análisis de ADN mitocondrial	Melchers <i>et al.</i> (1992)
<i>Lycopersicon esculentum</i> + (<i>Solanum tuberosum</i> x <i>Solanum nigrum</i>)	Morfología (tipo de hoja, color y forma de la flor) Conteo de cromosomas (24 + 96) Citometría de flujo (ioduro de propidium + normal) Isoenzimas (glucosa-fosfato isomerasas, fosfoglucomutasas, esterases)	Lindsay <i>et al.</i> (1995)
(<i>Lycopersicon esculentum</i> x <i>Lycopersicon pennellii</i>) + <i>Solanum melongena</i>	Resistencia a kanamicina Isoenzimas (fosfoglucoisomerasas y peroxidases) Conteo de cromosomas Hibridización Southern beot	Liu <i>et al.</i> (1995)
<i>Medicago sativa</i> + <i>Medicago borialis</i>	Complementación (albino + albino) Isoenzimas (leucin-aminopeptidasas) Conteo de cromosomas (32 + 16)	Gilmour <i>et al.</i> (1989)
<i>Medicago sativa</i> + <i>Medicago falcata</i>	Morfología (crecimiento, color de flor) Manual (diacetato de fluoresceína + clorofila) Isoenzimas (esterases y leucin-aminopeptidasas) Conteo de cromosomas	Gilmour <i>et al.</i> (1987) Mendis <i>et al.</i> (1991)
<i>Medicago sativa</i> + <i>Medicago quasifalcata</i>	Manual (diacetato de fluoresceína + clorofila) Isoenzimas (esterases y leucin-aminopeptidasas) Conteo de cromosomas (32 + 31)	Gilmour <i>et al.</i> (1987)
<i>Medicago sativa</i> + <i>Medicago varia</i>	Complementación (resistencia a fosfotricina + glutamin-sintetasa)	Deak <i>et al.</i> (1988)
<i>Medicago truncatula</i> + <i>Medicago scutellata</i>	Conteo de cromosomas Molecular (AFLP)	Tian y Rose (1999)
<i>Mentha piperita</i> + <i>Mentha spicata</i>	Morfología (tipo y color de hojas) Conteo de cromosomas (48 + 36) Moleculares (RAPD, RFLP)	Krasnyanski <i>et al.</i> (1998)

Tabla 1. Híbridos somáticos simétricos o asimétricos identificados mediante diferentes métodos de selección. Continuación...

Híbrido somático	Método de selección	Referencia
<i>Moricandia nitens</i> + <i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	Morfología (tipo de hoja, color de hoja y flor)	Yan <i>et al.</i> (1999)
<i>Moricandia nitens</i> + <i>Brassica oleracea</i> var. <i>gongylodes</i>	Manual (clorofila + incoloro)	
<i>Moricandia nitens</i> + <i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i>	Conteo de cromosomas	
	Molecular (RAPD)	
<i>Musa</i> sp. cv. Gros Michel (AAA) + <i>Musa</i> sp. cv. SF265 (AA)	Morfología de hoja Citometría de flujo	Asani <i>et al.</i> (2005)
<i>Musa</i> sp. cv. Maçã (AAB) + <i>Musa</i> sp. cv. Lidi (AA)	Citometría de flujo Molecular (RAPD)	Matsumoto <i>et al.</i> (2002)
<i>Musa</i> Silo (AAB) + <i>Musa acuminata</i> (AA)	Complementación (iodoacetamida + luz ultravioleta) Molecular (RAPD, ISSR)	Xiao <i>et al.</i> (2009)
<i>Nicotiana glauca</i> + <i>Nicotiana langsdorffii</i>	Complementación (medio de cultivo) Conteo de cromosomas (24 + 18) Molecular (RFLP)	Smith <i>et al.</i> (1976) Uchimiya <i>et al.</i> (1983)
<i>Nicotiana glauca</i> + <i>Nicotiana tabacum</i>	Conteo de cromosomas Morfología de hoja y flor Isoenzimas (aspartato aminotransferasas y alanil aminopeptidasas)	Evans <i>et al.</i> (1980)
<i>Nicotiana knightiana</i> + <i>Nicotiana sylvestris</i>	Complementación (albino + resistencia a kanamicina) Manual (albino + clorofila) Isoenzimas (esterasas y alcohol deshidrogenasas)	Menczel <i>et al.</i> (1978)
<i>Nicotiana plumbaginifolia</i> + <i>Lycopersicon esculentum</i>	Morfología (crecimiento, tipo y color de hoja, flor) Complementación (normal + resistencia a kanamicina, luz UV) Conteo de cromosomas (20 + 24) Isoenzimas (neomicin-fosfato transferasas) Molecular (RFLP)	Vlahova <i>et al.</i> (1997)
<i>Nicotiana plumbaginifolia</i> + <i>Nicotiana plumbaginifolia</i> (mutantes auxotróficos)	Conteo de cromosomas Complementación (nitrato y aminoácidos)	Negrutiú <i>et al.</i> (1986)
<i>Nicotiana rustica</i> + <i>Nicotiana sylvestris</i>	Morfología (hojas y flores) Isoenzimas (6-fosfogluconato deshidrogenasas) Patrón de enzima RUBISCO	Gleddie <i>et al.</i> (1983)
<i>Nicotiana rustica</i> + <i>Nicotiana tabacum</i>	Morfología (hoja, flor) Isoenzimas (esterasas) Patrón de enzima RUBISCO	Douglas <i>et al.</i> (1981) Pental <i>et al.</i> (1984)

Tabla 1. Híbridos somáticos simétricos o asimétricos identificados mediante diferentes métodos de selección. Continuación...

Híbrido somático	Método de selección	Referencia
<i>Nicotiana sylvestris</i> + <i>Nicotiana knightiana</i>	Complementación (resistencia a kanamicina + normal) Isoenzimas (esterasas, alcohol deshidrogenasas y 6 fosfatoglucosa deshidrogenasas)	Maliga <i>et al.</i> (1977)
<i>Nicotiana sylvestris</i> + <i>Nicotiana sylvestris</i>	Complementación (AEC + 5MT) Conteo de cromosomas (48 + 96)	White y Vasil (1979)
<i>Nicotiana tabacum</i> + <i>Nicotiana alata</i>	Manual (diacetato de fluoresceína + clorofila)	Patnaik <i>et al.</i> (1982)
<i>Nicotiana tabacum</i> + <i>Nicotiana glutinosa</i>	Morfología (tipo de hoja, flor) Complementación (5MT + normal) Conteo de cromosomas (24 + 24) Isoenzimas (peroxidasas, leucin-aminopeptidasas, glutamato-oxaloacetato transaminasas y ribulosa bifosfato carboxilasas)	Horn <i>et al.</i> (1983)
<i>Nicotiana tabacum</i> + <i>Nicotiana remanda</i>	Conteo de cromosomas Isoenzimas (esterasas y peroxidasas) Molecular (RAPD)	Sun <i>et al.</i> (2005)
<i>Nicotiana tabacum</i> + <i>Nicotiana tabacum</i>	Morfología (tipo de hoja, flor) Molecular (RFLP) Complementación (deficiencia de nitrato reductasa + normal)	Belliard <i>et al.</i> (1978) Glimelius <i>et al.</i> (1978)
<i>Nicotiana tabacum</i> + <i>Petunia hybrida</i>	Complementación (nitrato reductasa deficiente-estreptomocina resistente + normal) Isoenzimas (peroxidasas, leucin-aminopeptidasas) Manual (diacetato de fluoresceína + clorofila) Molecular (RFLP)	Patnaik <i>et al.</i> (1982) Pental <i>et al.</i> (1986)
<i>Nicotiana tabacum</i> (mutantes) + <i>Solanum melongena</i>	Isoenzimas (peroxidasas) Resistencia a antibióticos (estreptomocina y kanamicina)	Toki <i>et al.</i> (1990)
<i>Onobrychis viciaefolia</i> + <i>Medicago sativa</i>	Manual (isotiocianato de fluoresceína + isotiocianato de rodamina B) Complementación (resistencia a hidroxiprolina + normal) Conteo de cromosomas (28 + 32) Isoenzimas (nopal sintetasas, peroxidasas, esterasas)	Xu y Jia (1997)
<i>Oryza sativa</i> + <i>Daucus carota</i>	Complementación (rayos X + iodoacetamina) Conteo de cromosomas (24 + 24) Isoenzimas (peroxidasas) Molecular (AFLP)	Kisaka <i>et al.</i> (1994)
<i>Oryza sativa</i> + <i>Glycine max</i>	Isoenzimas (esterasas, peroxidasas) Selección manual (pigmentos y consistencia)	Niizeki <i>et al.</i> (1985)

Tabla 1. Híbridos somáticos simétricos o asimétricos identificados mediante diferentes métodos de selección. Continuación...

Híbrido somático	Método de selección	Referencia
<i>Oryza sativa</i> + <i>Hordeum vulgare</i>	Manual (incoloros + clorofila) Morfología (crecimiento, tipo y color de hoja) Conteo de cromosomas (24 + 14) Molecular (RFLP)	Kisaka <i>et al.</i> (1998)
<i>Oryza sativa</i> + <i>Zizania latifolia</i>	Morfología (crecimiento, tipo y color de hoja) Complementación (iodoacetamina + rayos γ) Conteo de cromosomas (24 + 24) Molecular (RFLP)	Liu <i>et al.</i> (1999)
<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> + <i>Passiflora cincinnata</i>	Conteo de cromosomas Molecular (RFLP)	Barbosa <i>et al.</i> (2007)
<i>Pennisetum americanum</i> + <i>Panicum maximum</i>	Complementación (AEC + iodoacetato) Isoenzimas (alcohol deshidrogenasas, aminopeptidasas, shiquimato deshidrogenasas y 6-fosfogluconato deshidrogenasas) Molecular (RFLP)	Ozias-Akins <i>et al.</i> (1986)
<i>Petunia hybrida</i> + <i>Petunia parodii</i>	Complementación (albino + medio de cultivo) Complementación (resistencia a D-actinomicina) Complementación (albino + normal)	Power <i>et al.</i> (1976) Cocking <i>et al.</i> (1977) Power <i>et al.</i> (1979)
<i>Petunia parodii</i> + <i>Petunia inflata</i>	Morfología (tipo de hoja, tamaño y color de la flor) Complementación (albino + medio de cultivo) Conteo de cromosomas (14 + 14)	Power <i>et al.</i> (1979)
<i>Pisum sativum</i> + <i>Glycine max</i>	Manual (clorofila + incoloros) Morfología (crecimiento, tipo de hoja)	Kao <i>et al.</i> (1974)
<i>Pisum sativum</i> + <i>Vicia hajastana</i>	Manual (clorofila + incoloros) Morfología (crecimiento, tipo de hoja)	Kao <i>et al.</i> (1974)
<i>Poncirus trifoliata</i> + <i>Fortunella hindsii</i>	Manual (clorofila + incoloros) Morfología (tipo y color de hoja) Citometría de flujo Molecular (RFLP)	Miranda <i>et al.</i> (1997)
<i>Raphanus sativus</i> + <i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	Morfología (tamaño y color de la flor) Manual (clorofila + incoloro) Complementación (incompatibilidad con el medio + iodoacetato)	Kameya <i>et al.</i> (1989)
<i>Raphanus sativus</i> + <i>Isatis indigotica</i>	Morfología (hoja, flor) Conteo de cromosomas Molecular (AFLP y GISH)	Tu <i>et al.</i> (2008)
<i>Saccharum officinarum</i> + <i>Pennisetum americanum</i>	Complementación (iodoacetato + Aet-Cys) Isoenzimas (fosfogluconato deshidrogenasas) Molecular (RFLP)	Tabaeizadeh <i>et al.</i> (1986)

Tabla 1. Híbridos somáticos simétricos o asimétricos identificados mediante diferentes métodos de selección. Continuación...

Híbrido somático	Método de selección	Referencia
<i>Solanum acaule</i> + <i>Solanum tuberosum</i>	Conteo de cromosomas (48 + 48) Molecular (RFLP)	Yamada <i>et al.</i> (1998)
<i>Solanum bulbocastanum</i> + <i>Solanum tuberosum</i>	Morfología (crecimiento, tipo y color de hoja) Complementación (normal + resistencia a <i>Phytophthora infestans</i>) Conteo de cromosomas (24 + 48) Molecular (RFLP, RAPD) Citometría de flujo	Helgeson <i>et al.</i> (1998) Greplová <i>et al.</i> (2008)
<i>Solanum chacoense</i> + <i>Solanum phureja</i>	Citometría de flujo Molecular (SSR)	Johnson (1998)
<i>Solanum integrifolium</i> + <i>Solanum sanitwongsei</i>	Morfología (altura, diámetro del tallo, tipo de hoja, color de la flor, inflorescencia) Complementación (luz UV + iodoacetamida) Isoenzimas (shiquimato deshidrogenasas, isocitrato deshidrogenasas, fosfoglucomutasas) Conteo de cromosomas (24 + 24) Molecular (RAPD, GISH)	Iwamoto <i>et al.</i> (2007)
<i>Solanum integrifolium</i> + <i>Solanum violaceum</i>	Conteo de cromosomas Molecular (RAPD y RFLP)	Tamura <i>et al.</i> (2002)
<i>Solanum melongena</i> + <i>Solanum marginatum</i>	Conteo de cromosomas Molecular (ISSR)	Borgato <i>et al.</i> (2007)
<i>Solanum melongena</i> + <i>Solanum sisymbriifolium</i>	Citometría de flujo Morfología (tamaño, forma y color de hojas, forma de flores y frutos) Conteo de cromosomas Isoenzimas (malato deshidrogenasas e isocitrato deshidrogenasas) Molecular (RAPD, GISH)	Collonnier <i>et al.</i> (2003)
<i>Solanum nigrum</i> + <i>Solanum tuberosum</i>	Morfología de hoja y flor Citometría de flujo Molecular (RAPD)	Szczerbakowa <i>et al.</i> (2003)
<i>Solanum pinnatisectum</i> + <i>Solanum tuberosum</i>	Citometría de flujo Molecular (RAPD)	Greplová <i>et al.</i> (2008)
<i>Solanum tuberosum</i> + <i>Solanum americanum</i>	Morfología (tipo y densidad de tricomas) Citometría de flujo Conteo de cromosomas (48 + 72) Isoenzimas (6-fosfogluconato deshidrogenasas)	Horsman <i>et al.</i> (1997)

Tabla 1. Híbridos somáticos simétricos o asimétricos identificados mediante diferentes métodos de selección. Continuación...

Híbrido somático	Método de selección	Referencia
<i>Solanum tuberosum</i> + <i>Solanum brevidens</i>		Fish <i>et al.</i> (1987)
	Morfología (crecimiento, tipo de hoja)	Pehu <i>et al.</i> (1989)
	Complementación (resistencia a <i>Erwinia</i> + normal); (rayos X + resistencia a kanamicina)	Fehér <i>et al.</i> (1992)
	Conteo de cromosomas (48 + 24)	Williams <i>et al.</i> (1993)
	Molecular (RAPD, RFLP)	Rokka <i>et al.</i> (1994)
		McGrath <i>et al.</i> (1994, 1996)
		Polgar <i>et al.</i> (1999)
<i>Solanum tuberosum</i> + <i>Solanum chenopodioides</i>	Morfología (tipo y densidad de tricomas)	
	Citometría de flujo	
	Conteo de cromosomas (48 + 24)	Horsman <i>et al.</i> (1997)
	Isoenzimas (6-fosfogluconato deshidrogenasas)	
<i>Solanum tuberosum</i> + <i>Solanum commersonii</i>	Morfología (crecimiento, tipo y color de hoja)	
	Citometría de flujo	Cardi <i>et al.</i> (1993)
	Conteo de cromosomas	Bastia <i>et al.</i> (2000)
	Molecular (RAPD)	
<i>Solanum tuberosum</i> + <i>Solanum etuberosum</i>	Conteo de cromosomas (48 + 48)	
	Moleculares (RFLP, GISH)	Dong <i>et al.</i> (1999)
<i>Solanum tuberosum</i> + <i>Solanum tarnii</i>	Morfología (crecimiento, tipo y color de hoja)	
	Citometría de flujo	
	Conteo de cromosomas (48 + 24)	Thieme <i>et al.</i> (2008)
	Molecular (AFLP, SSR)	
<i>Solanum tuberosum</i> + <i>Solanum nigrum</i>	Morfología (tipo y densidad de tricomas)	
	Citometría de flujo	
	Conteo de cromosomas (48 + 72)	Horsman <i>et al.</i> (1997)
	Isoenzimas (6-fosfogluconato deshidrogenasas)	
<i>Solanum tuberosum</i> + <i>Solanum tuberosum</i>	Molecular (RAPD)	Takemori <i>et al.</i> (1994)
<i>Solanum tuberosum</i> + <i>Solanum villosum</i>	Morfología (tipo y densidad de tricomas)	
	Citometría de flujo	
	Conteo de cromosomas (48 + 48)	Horsman <i>et al.</i> (1997)
	Isoenzimas (6-fosfogluconato deshidrogenasas)	
<i>Tanacetum vulgare</i> + <i>Tanacetum cinerariifolium</i>	Citometría de flujo	
	Moleculares (RAPD)	Keskitalo <i>et al.</i> (1999)
<i>Thlaspi caerulescens</i> + <i>Brassica napus</i>	Complementación (tolerancia a zinc + normal) Molecular (AFLP)	Brewer <i>et al.</i> (1999)
<i>Trachystoma ballii</i> + <i>Brassica juncea</i>	Morfología (tipo de hoja y flor)	
	Conteo de cromosomas (16 + 36)	Kirti <i>et al.</i> (1992b)
	Molecular (RFLP)	

Tabla 1. Híbridos somáticos simétricos o asimétricos identificados mediante diferentes métodos de selección. Continuación...

Híbrido somático	Método de selección	Referencia
<i>Triticum aestivum</i> + <i>Agropyron elongatum</i>	Morfología (tipo de hoja, tallo e inflorescencia) Complementación (normal + UV) Conteo de cromosomas (21-29 + 58-64) Isoenzimas (esterasas, peroxidadas) Molecular (RAPD, RFLP)	Cheng <i>et al.</i> (2004)
<i>Triticum aestivum</i> + <i>Haynaldia villosa</i>	Conteo de cromosomas Isoenzimas (esterasas, shikimato deshidrogenasas) Molecular (GISH, RFLP)	Zhou y Xia (2005)
<i>Triticum aestivum</i> + <i>Lolium multiflorum</i>	Conteo de cromosomas Isoenzimas (esterasas y peroxidadas) Molecular (RFLP y AFLP)	Ge <i>et al.</i> (2006)
<i>Triticum aestivum</i> + <i>Psathyrostachys juncea</i>	Conteo de cromosomas (27 + 27) Isoenzimas (peroxidadas) Molecular (RAPD, GISH, SSR)	Li <i>et al.</i> (2004)
<i>Triticum aestivum</i> + <i>Setaria italica</i>	Citología Isoenzimas (esterasas, peroxidadas y malato deshidrogenadas) Molecular (RAPD, secuencia de lespaciador del ADNr 5S, GISH)	Xiang <i>et al.</i> (2004)
<i>Triticum aestivum</i> + <i>Zea mays</i>	Complementación (incompatibilidad con el medio + albino) Citometría de flujo (bromuro de etidio + normal) Molecular (RAPD, GISH)	Göntér <i>et al.</i> (2002)
<i>Vicia hajastana</i> + <i>Glycine max</i>	Manual (clorofila + incoloros) Morfología (crecimiento, tipo de hoja)	Kao y Michayluk (1974)
<i>Vicia hajastana</i> + <i>Pisum sativum</i>	Manual (clorofila + incoloros) Morfología (crecimiento, tipo de hoja)	Kao y Michayluk (1974)
<i>Zea mays</i> + <i>Glycine max</i>	Manual (clorofila + incoloros) Morfología (crecimiento, tipo de hoja)	Kao <i>et al.</i> (1974)

CONSIDERACIONES FINALES

Los programas de mejoramiento genético convencionales se limitan al intercambio genético entre especies sexualmente compatibles. Mediante la fusión de protoplastos, la información genética puede intercambiarse sobrepasando las barreras de incompatibilidad naturales. Diferentes trabajos han demostrado que los porcentajes de formación y regeneración de híbridos somáticos son bajos (Cocking 1979; Blackhall *et al.*, 1994; Lindsay *et al.*, 1995). El principal reto para mejorar las técnicas de

hibridación somática, además de aumentar la eficiencia de fusión, es disponer de métodos de detección que permitan una selección y caracterización rápida y eficiente de los híbridos somáticos simétricos o asimétricos (Cocking, 1979). Mediante mejoras en los procesos de identificación será posible incrementar la frecuencia de éxito.

REFERENCIAS

Afonso, CL, Harkins KR, Thomas-Compton MA, Krejci AE, Galbraith DW (1985) Selection of somatic hybrid plants in

- Nicotiana* through fluorescence-activated sorting of protoplasts. *Bio/Technology* 3: 811-816
- Alexander, RG, Cocking EC, Jackson PJ, Jett JH (1985) The characterization and isolation of plant heterokaryons by flow cytometry. *Protoplasma* 128: 52-58
- Assani, A, Chabane D, Haïcour R, Bakry F, Wenzel G, Foroughi-Wehr B (2005) Protoplast fusion in banana (*Musa* spp.): comparison of chemical (PEG: polyethylene glycol) and electrical procedure. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 83: 145-151
- Aziz, MA, Chand PK, Power JB, Davey MR (1990) Somatic hybrids between the forage legumes *Lotus corniculatus* L. and *L. tenuis* Waldst et Kit. *Journal of Experimental Botany* 41: 471-479
- Baird, E, Cooper-Bland S, Waugh R, DeMaine M, Powell W (1992) Molecular characterization of inter-and intra-specific somatic hybrids of potato using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Molecular and General Genetics* 233: 469-475
- Barbosa, LV, Mondin M, Oliveira CA, Souza AP, Vieira MLC (2007) Cytological behaviour of the somatic hybrids *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* + *P. cincinnata*. *Plant Breeding* 126: 323-238
- Barsby, TL, Yarrow SA, Shepard JF (1984) Heterokaryon identification through simultaneous fluorescence of tetramethylrhodamine isothiocyanate and fluorescein isothiocyanate labeled protoplasts. *Stain Technology* 59: 217-220
- Bastia, T, Carotenuto N, Basile B, Zoina A, Cardi T (2000) Induction of novel organelle DNA variation and transfer of resistance to frost and Verticillium wilt in *Solanum tuberosum* through somatic hybridization with 1EBN *S. commersonii*. *Euphytica* 116: 1-10
- Belliard, G, Pelletier G, Vedel F, Quetier F (1978) Morphological characteristics and chloroplast DNA distribution in different cytoplasmic para-sexual hybrids of *Nicotiana tabacum*. *Molecular and General Genetics* 165: 231-237
- Bengochea, T, Dodds JH (1987) Plant protoplasts – A biotechnological tool for plant improvement. Chapman and Hall, Cambridge
- Binding, H, Bünning D, Görschern E, Jörgensen J, Kollmann R, Krumbiegel-Schroeren G, Ling HQ, Monzer J, Mordhorst G, Rudnick J, Sauer A, Witt D, Zuba M (1988) Uniparental, fusant, and chimeric plants regenerated from protoplasts after streak plating in agarose gels. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 12: 133-135
- Blackhall, NW, Davey MR, Power JB (1994) Applications of protoplast technology. En: Dixon, R y Gonzáles, R (Eds) *Plant cell culture*, 2 ed, pp. 41-48. Oxford Press, Nueva York
- Borgato, L, Conicella C, Pisani F, Furini A (2007) Production and characterization of arboreous and fertile *Solanum melongena* + *Solanum marginatum* somatic hybrid plants. *Planta* 226: 961-969
- Brewer, EP, Saunders JA, Angle JS, Chaney RL, McIntosh MS (1999) Somatic hybridization between the zinc accumulator *Thlaspi caerulescens* and *Brassica napus*. *Theoretical and Applied Genetics* 99: 761-771
- Buiteveld, J, Suo Y, van Lookeren Campagne MM, Creemers-Molenaar J (1998) Production and characterization of somatic hybrid plants between leek (*Allium ampeloprasum* L.) and onion (*Allium cepa* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 96: 765-775
- Cai, Y, Xiang F, Zhi D, Liu H, Xia G (2007) Genotyping of somatic hybrids between *Festuca arundinacea* Schreb. and *Triticum aestivum* L. *Plant Cell Reports* 26: 1809-1819
- Cappelle, C, Mörchen M, Hilbert J-L, Rambaud C (2007) Regeneration and molecular characterization of a male sterile interspecific somatic hybrid between *Cichorium intybus* and *C. endivia*. *Plant Science* 172: 596-603
- Cardi, T, D'Ambrosio F, Consoli D, Puite KJ, Ramulu KS (1993) Production of somatic hybrids between frost-tolerant *Solanum commersonii* and *S. tuberosum*: characterization of hybrid plants. *Theoretical and Applied Genetics* 87: 193-200
- Cella, R, Carbonera D, Iadarola P (1983) Characterization of intraspecific somatic hybrids of carrot obtained by fusion of iodoacetate-inactivated A2CA-resistant and sensitive protoplasts. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 112: 449-457
- Cheng, AX, Xia GM, Zhi DY, Chen, HM (2004) Intermediate fertile *Triticum aestivum* (+) *Agropyron elongatum* somatic hybrids are generated by low doses of UV irradiation. *Cell Research* 14: 86-91
- Cocking, EC (1979) Parasexual reproduction in flowering plants. *New Zealand Journal of Botany* 17: 665-671
- Cocking, EC, George D, Price-Jones MJ, Power, JB (1977) Selection procedures for the production of inter-species somatic hybrids of *Petunia hybrida* and *Petunia parodii* II. Albino complementation selection. *Plant Science Letters* 10: 7-12
- Collonnier, C, Fock I, Daunay M-C, Servaes A, Vedel F, Siljak-Yakovlev S, Souvannavong V, Sihachakr, D (2003) Somatic hybrids between *Solanum melongena* and *S. sisymbirifolium*, as a useful source of resistance against bacterial and fungal wilts. *Plant Science* 164: 849-861
- Cui, H, Yu Z, Deng J, Gao X, Sun Y, Xia G (2009) Introgression of bread wheat chromatin into tall wheatgrass via somatic hybridization. *Planta* 229: 323-330
- Dabauza, M, González-Candelas L, Bordas M, Roig LA, Ramón D, Moreno V (1998) Regeneration and characterization of *Cucumis melo* L. (+) *Cucumis anguria* L. var. *longipes* (Hook. fil.) Meeuse somatic hybrids. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 52: 123-131
- Deak, M, Donn G, Fehér A, Dudits D (1988) Dominant expression of a gene amplification-related herbicide resistance in *Medicago* cell hybrids. *Plant Cell Reports* 7: 158-161
- Dong, F, Novy RG, Helgeson JP, Jiang J (1999) Cytological characterization of potato-*Solanum etuberosum* somatic hybrids and their backcross progenies by genomic *in situ* hybridization. *Genome* 42: 987-992
- Douglas, GC, Wetter LR, Keller WA, Setterfield G (1981) Somatic hybridization between *Nicotiana rustica* and *N. tabacum*. IV. Analysis of nuclear and chloroplast genome expression in somatic hybrids. *Canadian Journal of Botany* 59: 1509-1513
- Du, X-z, Ge X-h, Yao X-c, Zhao Z-g, Li Zy (2009) Production and cytogenetic characterization of intertribal somatic hybrids between *Brassica napus* and *Isatis indigotica* and backcross progenies. *Plant Cell Reports* 28: 1105-1113
- Dudits, D, Hadlaczký G, Lévi E, Fejér O, Haydu Z, Lázár G (1977) Somatic hybridisation of *Daucus carota* and *D. capillifolius* by protoplast fusion. *Theoretical and Applied Genetics* 51: 127-132
- Eeckhaut, T, Leus L, Van Heylenbroeck J (2005) Exploitation of flow cytometry for plant breeding. *Acta Physiologiae Plantarum* 27: 743-750

- Evans, DA (1983) Agricultural applications of plant protoplast fusion. *Bio/Technology* 1: 253-261
- Evans, DA, Wetter LR, Gamburg OL (1980) Somatic hybrid plants of *Nicotiana glauca* and *Nicotiana tabacum* obtained by protoplast fusion. *Physiologia Plantarum* 48: 225-230
- Fahleson, J, Råhlén L, Glimelius, K (1988a) Analysis of plants regenerated from protoplast fusions between *Brassica napus* and *Eruca sativa*. *Theoretical and Applied Genetics* 76: 507-512
- Fahleson, J, Dixelius J, Sundberg E, Glimelius K (1988b) Correlation between flow cytometric determination of nuclear DNA content and chromosome number in somatic hybrids within *Brassicaceae*. *Plant Cell Reports* 7: 74-77
- Fehér, A, Preiszner J, Litkey Z, Csanadi G, Dudits D (1992) Characterisation of chromosome instability in interspecific somatic hybrids obtained by X-ray fusion between potato (*Solanum tuberosum*) and *S. brevidens*. *Theoretical and Applied Genetics* 84: 880-890
- Fish, N, Karp A, Jones MGK (1987) Improved isolation of dihaploid *Solanum tuberosum* protoplasts and the production of somatic hybrids between dihaploid *S. tuberosum* and *S. brevidens*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 23: 575-580
- Furuta, H, Shinoyama H, Nomura Y, Maeda M, Makara K (2004) Production of intergeneric somatic hybrids of chrysanthemum [*Dendranthema x grandiflorum* (Ramat.) Kitamura] and wormwood (*Artemisia sieversiana* J.F. Ehrh. ex. Willd) with rust (*Puccinia horiana* Henning) resistance by electrofusion of protoplasts. *Plant Science* 166: 695-702
- Ge, TM, Lin XH, Qin FL, Yu SW, Yu YJ (2006) Protoplast electrofusion between common wheat (*Triticum aestivum* L.) and Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) and regeneration of mature cybrids. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 12: 179-187
- Geerts, P, Duart P, Ochatt S, Baudoin J-P (2008) Protoplast fusion technology for somatic hybridisation in *Phaseolus*. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement* 12: 41-46
- Giles, KL (1972) Attempts to demonstrate genetic complementation by the technique of protoplast fusion. *Proceedings International Colloquium «Protoplasts and fusion of somatic cells»*. CNRS pp. 485-495
- Gilmour, DM, Dave MR, Cocking EC (1987) Isolation and culture of heterokaryons following fusion of protoplasts from sexually compatible and sexually incompatible *Medicago* species. *Plant Science* 53: 263-270
- Gilmour, DM, Davey MR, Cocking EC (1989) Production of somatic hybrid tissues following chemical and electrical fusion of protoplasts from albino cell suspensions of *Medicago sativa* and *M. borealis*. *Plant Cell Reports* 8: 29-32
- Gleddie, S, Keller WA, Setterfield G, Wetter LR (1983) Somatic hybridization between *Nicotiana rustica* and *N. sylvestris*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 2: 269-283
- Glimelius, K, Eriksson T, Grafe R, Müller AJ (1978) Somatic hybridization of nitrate reductase deficient mutants of *Nicotiana tabacum* by protoplast fusion. *Physiologia Plantarum* 44: 273-277
- Göntér, I, Szarka B, Lendvai Á, Molnár-Láng M, Mórocz S, Dudits D (2002) Problems and possibilities of wheat-maize somatic hybridization. *Acta Biologica Szegediensis* 46: 11-12
- Greplová, M, Polzerová H, Vlastníková H (2008) Electrofusion of protoplasts from *Solanum tuberosum*, *S. bulbocastanum* and *S. pinnatisectum*. *Acta Physiologiae Plantarum* 30: 787-796
- Grosser, JW, Gmitter FG (1990) Wide hybridization of *Citrus* via protoplasts fusion: Progress, strategies and limitations. En: Bennett, AB y O'Neill, SD (Eds) *Horticultural biotechnology, plant biology*, pp. 31-41. Wiley-Liss, Nueva York
- Grosser, JW, Gmitter FG, Louzada ES, Chandler JL (1992a) Production of somatic hybrid and autotetraploid breeding parents for seedless citrus development. *HortScience* 27: 1125-1127
- Grosser, JW, Gmitter FG, Sesto F, Deng XX, Chandler JL (1992b) Six new somatic citrus hybrids and their potential for cultivar improvement. *HortScience* 117: 169-173
- Grosser, JW, Gmitter FG, Tusa N, Recupero GR, Cucinotta P (1996) Further evidence of a cybridization requirement for plant regeneration from citrus leaf protoplasts following somatic fusion. *Plant Cell Reports* 15: 672-676
- Guo, WW, Cai XD, Grosser JW (2004) Somatic cell cybrids and hybrids in plant improvement. En: Daniell, H y Chase, CD (Eds) *Molecular biology and biotechnology of plant organelles*, pp. 635-659. Springer, Amsterdam
- Guo, JM, Liu QC, Zhai H, Wang YP (2006) Regeneration of plants from *Ipomoea cairica* L. protoplasts and production of somatic hybrids between *I. cairica* L. and sweetpotato, *I. batatas* (L.) Lam. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 87: 321-327
- Hall, RD, Rouwendal GJA, Krens FA (1992) Asymmetric somatic cell hybridization in plants I: the early effect of (sub) lethal doses of UV and gamma radiation on the cell physiology and DNA integrity of cultured sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) protoplasts. *Molecular and General Genetics* 234: 306-314
- Hammatt, N, Lister A, Blackhall NW, Gartland G, Ghose TK, Gilmour DM, Power JB, Davey MR, Cocking EC (1990) Selection of plant heterokaryons from diverse origins by flow cytometry. *Protoplasma* 154: 34-44
- Han, L, Zhou C, Shi J, Zhi D, Xia G (2009) Ginsenoside Rb, in asymmetric somatic hybrid calli of *Daucus carota* with *Panax quinquefolius*. *Plant Cell Reports* 28: 627-238
- Handley, LW, Nickels RL, Cameron MW, Moore PP, Sink KC (1986) Somatic hybrid plants between *Lycopersicon esculentum* and *Solanum lycopersicoides*. *Theoretical and Applied Genetics* 71: 691-697
- Hansen, LN (1998) Intertribal somatic hybridization between rapid cycling *Brassica oleracea* L. and *Camelina sativa* (L.) Crantz. *Euphytica* 104: 173-179
- Harkins, KR, Galbraith, DW (1984) Flow sorting and culture of plant protoplasts. *Physiologia Plantarum* 60: 43-52
- Helgeson, JP, Pohlman JD, Austin S, Habertlach GT, Wielgus SM, Ronis D, Zambolim L, Tooley P, McGrath JM, James RV, Stevenson WR (1998) Somatic hybrids between *Solanum bulbocastanum* and potato: a new source of resistance to late blight. *Theoretical and Applied Genetics* 96: 738-742
- Hoffmann, F, Adachi T (1981) Arabidobrassica: chromosomal recombination and morphogenesis in asymmetric intergeneric hybrid cells. *Planta* 153: 586-593
- Horn, ME, Kameya T, Brotherton JE, Widholm JM (1983) The use of amino acid analog resistance and plant regeneration ability to select somatic hybrids between *Nicotiana tabacum* and *N. glutinosa*. *Molecular and General Genetics* 192: 235-240
- Horsman, K, Bergervoet JEM, Jacobsen E (1997) Somatic hybridization between *Solanum tuberosum* and species of the *S. nigrum* complex: selection of vigorously growing and flowering plants. *Euphytica* 96: 345-352

- Hu, Q, Andersen SB, Dixelius C, Hansen LN (2002) Production of fertile intergeneric somatic hybrids between *Brassica napus* and *Sinapis arvensis* for the enrichment of the rapeseed gene pool. *Plant Cell Reports* 21: 147-152
- Iwamoto, Y, Hirai M, Ohmido N, Fukui K, Ezura H (2007) Fertile somatic hybrids between *Solanum integrifolium* and *S. sanitwongsei* (syn. *S. kurzii*) as candidates for bacterial wilt-resistant rootstock of eggplant. *Plant Biotechnology* 24: 179-184
- Johnson, AAT (1998) Protoplast fusion for the production of intermonoploid somatic hybrids in cultivated potato. Tesis de Maestría en Horticultura. Blacksburg, EUA, Instituto Politécnico de Virginia
- Kameya, T, Kanzaki H, Toki S, Abe T (1989) Transfer of radish (*Raphanus sativus* L.) chloroplasts into cabbage (*Brassica oleracea* L.) by protoplast fusion. *Japanese Journal of Genetics* 64: 27-34
- Kao, KN (1977) Chromosomal behaviour in somatic hybrids of soybean-*Nicotiana glauca*. *Molecular and General Genetics* 150: 225-230
- Kao, KN, Michayluk MR (1974) A method for high-frequency intergeneric fusion of plant protoplasts. *Planta* 115: 355-367
- Kao, KN, Constabel F, Michayluk MR, Gamburg OL (1974) Plant protoplast fusion and growth of intergeneric hybrid cells. *Planta* 120: 215-227
- Kao, HM, Keller WA, Gleddie S, Brown GG (1992) Synthesis of *Brassica oleracea*/*Brassica napus* somatic hybrid plants with novel organelle DNA composition. *Theoretical and Applied Genetics* 83: 313-320
- Keskitalo, M, Angers P, Earle E, Pehu E (1999) Chemical and genetic characterization of calli derived from somatic hybridization between tansy (*Tanacetum vulgare* L.) and pyrethrum (*Tanacetum cinerariifolium* (Trevir.) Schultz-Bip). *Theoretical and Applied Genetics* 98: 1335-1343
- Kirti, PB, Narasimhulu SB, Prakash S, Chopra VL (1992a) Somatic hybridization between *Brassica juncea* and *Moricandia arvensis* by protoplast fusion. *Plant Cell Reports* 11: 318-321
- Kirti, PB, Narasimhulu SB, Prakash S, Chopra VL (1992b) Production and characterization of intergeneric somatic hybrids of *Trachystoma ballii* and *Brassica juncea*. *Plant Cell Reports* 11: 90-92
- Kisaka, H, Kameya T (1994) Production of somatic hybrids between *Daucus carota* L. and *Nicotiana tabaccum*. *Theoretical and Applied Genetics* 88: 75-80
- Kisaka, H, Lee H, Kisaka M, Kanno A, Kang K, Kameya T (1994) Production and analysis of asymmetric hybrid plants between monocotyledon (*Oryza sativa* L.) and dicotyledon (*Daucus carota* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 89: 365-371
- Kisaka, H, Kisaka M, Kanno A, Kameya T (1997) Production and analysis of plants that are somatic hybrids of barley (*Hordeum vulgare* L.) and carrot (*Daucus carota* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 94: 221-226
- Kisaka, H, Kisaka M, Kanno A, Kameya T (1998) Intergeneric somatic hybridization of rice (*Oryza sativa* L.) and barley (*Hordeum vulgare* L.) by protoplast fusion. *Plant Cell Reports* 17: 362-367
- Krasnyanski, S, Ball TM, Sink KC (1998) Somatic hybridization in mint: identification and characterization of *Mentha piperita* (+) *M. spicata* hybrid plants. *Theoretical and Applied Genetics* 96: 683-687
- Li, C, Xia G, Xiang F, Zhou C, Cheng A (2004) Regeneration of asymmetric somatic hybrid plants from the fusion of two types of wheat with Russian wildrye. *Plant Cell Reports* 23: 461-467
- Lindsay, GC, Hopping ME, Binding H, Burge GK (1995) Graft chimeras and somatic hybrids for new cultivars. *New Zealand Journal of Botany* 33: 79-92
- Liu, KB, Li Y-M, Sink KC (1995) Asymmetric somatic hybrid plants between an interspecific *Lycopersicon* hybrid and *Solanum melongena*. *Plant Cell Reports* 14: 652-656
- Liu, B, Liu ZL, Li XW (1999) Production of a highly asymmetric somatic hybrid between rice and *Zizania latifolia* (Griseb): evidence for inter-genomic exchange. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 1099-1103
- Liu, J, Xu X, Deng X (2005) Intergeneric somatic hybridization and its application to crop genetic improvement. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 82: 19-44
- Liu, F, Ryschka U, Marthe F, Klocke E, Schumann G, Zhao H (2007) Culture and fusion of pollen protoplasts of *Brassica oleracea* L. var. *italica* with haploid mesophyll protoplasts of *B. rapa* L. ssp. *pekinensis*. *Protoplasma* 231: 89-97
- Louzada, ES, Grosser JW, Gmitter FG, Nielsen B, Chandler JL (1992) Eight new somatic hybrid citrus rootstocks with potential for improved disease resistance. *HortScience* 27: 1033-1036
- Maliga, P, Lázár G, Joó F, Nagy AH, Menczel L (1977) Restoration of morphogenic potential in *Nicotiana* by somatic hybridisation. *Molecular and General Genetics* 157: 291-296
- Matsumoto, K, Vilarinhos AD, Oka S (2002) Somatic hybridization by electrofusion of banana protoplasts. *Euphytica* 125: 317-324
- McGrath, JM, Wielgus SM, Uchytel TF, Kim-Lee H, Haberlach GT, Williams CE, Helgeson JP (1994) Recombination of *Solanum brevidens* chromosomes in the second backcross generation from a somatic hybrid with *S. tuberosum*. *Theoretical and Applied Genetics* 88: 917-928
- McGrath, JM, Wielgus SM, Helgeson JP (1996) Segregation and recombination of *Solanum brevidens* synteny groups in progeny of somatic hybrids with *S. tuberosum*: intragenomic equals or exceeds intergenomic recombination. *Genetics* 142: 1335-1348
- Melchers, G, Mohri Y, Watanabe K, Wakabayashi S, Harada K (1992) One-step generation of cytoplasmic male sterility by fusion of mitochondrial-inactivated *Solanum* protoplasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89: 6832-6836
- Menczel, L, Lázár G, Maliga P (1978) Isolation of somatic hybrids by cloning *Nicotiana* heterokaryons in nurse cultures. *Planta* 143: 29-32
- Mendis, MH, Power JB, Davey MR (1991) Somatic hybrids of the forage legumes *Medicago sativa* L. and *M. falcata* L. *Journal of Experimental Botany* 42: 1565-1574
- Miranda, M, Motomura T, Ikeda F, Ohgawara T, Saito W, Endo T, Omura M, Moriguchi T (1997) Somatic hybrids obtained by fusion between *Poncirus trifoliata* (2x) and *Fortunella hindsii* (4x) protoplasts. *Plant Cell Reports* 16: 401-405
- Navrátilová, B (2004) Protoplast cultures and protoplast fusion focused on *Brassicaceae* – a review. *Horticultural Science (Praga)* 31: 140-157
- Navrátilová, B, Bůšek J, Šíroky J, Havránek P (1997) Construction of intergeneric somatic hybrids between *Brassica oleracea* and *A Armoracia rusticana*. *Biologia Plantarum* 39: 531-541

- Negrutiu, I, De Brouwer D, Watts JW, Sidorov VI, Dirks R, Jacobs M (1986) Fusion of plant protoplasts: a study using auxotrophic mutants of *Nicotiana plumbaginifolia*, Viviani. *Theoretical and Applied Genetics* 72: 279-286
- Niizeki, M, Tanaka M, Akada S, Hirai A, Saito K (1985) Callus formation of somatic hybrids of rice and soybean and characteristics of the hybrid callus. *Japanese Journal of Genetics* 60: 81-92
- O'Connell, MA, Hanson MR (1985) Somatic hybridization between *Lycopersicon esculentum* and *Lycopersicon pennellii*. *Theoretical and Applied Genetics* 70: 1-12
- Ozias-Akins, P, Ferl RJ, Vasil IK (1986) Somatic hybridization in the gramineae: *Pennisetum americanum* (L.) K. Schum. (pearl millet) + *Panicum maximum* Jacq. (ginea grass). *Molecular and General Genetics* 203: 365-370
- Patnaik, G, Cocking EC, Hamill J, Pental D (1982) A simple procedure for the manual isolation and identification of plant heterokaryons. *Plant Science Letters* 24: 105-110
- Pauls, KP (2005) Protoplasts: consequences and opportunities of cellular nudity. En: Murch, SJ y Saxena PK (Eds) *Journey of a single cell to a plant*, pp. 91-132. Science Publishers, Enfield, New Hampshire
- Pehu, E, Karp A, Moore K, Steele S, Dunckley R, Jones MGK (1989) Molecular, cytogenetic and morphological characterisation of somatic hybrids of dihaploid *Solanum tuberosum* and diploid *S. brevidens*. *Theoretical and Applied Genetics* 78: 969-703
- Pental, D, Hamill JD, Cocking EC (1984) Somatic hybridisation using a double mutant of *Nicotiana tabacum*. *Heredity* 53: 79-83
- Pental, D, Hamill JD, Pirrie A, Cocking EC (1986) Somatic hybridization of *Nicotiana tabacum* and *Petunia hybrida*. *Molecular and General Genetics* 202: 342-347
- Polgar, Z, Wielgus SM, Horvath S, Helgeson JP (1999) DNA analysis of potato + *Solanum brevidens* somatic hybrid lines. *Euphytica* 105: 103-107
- Potrykus, I, Jia J, Lazar G, Saul M (1984) *Hyoscyamus muticus* + *Nicotiana tabacum* fusion hybrids selected via auxotroph complementation. *Plant Cell Reports* 3: 68-71
- Power, JB, Fearson EM, Hayward D, George P, Evans S, Berry SF, Cocking EC (1976) Somatic hybridization of *Petunia hybrida* and *P. parodii*. *Nature* 263: 500-502
- Power, JB, Berry SF, Chapman JV, Cocking EC, Sink KC (1979) Somatic hybrids between unilateral cross-incompatible *Petunia* species. *Theoretical and Applied Genetics* 54: 97-99
- Raikaar, SV, Bryant C, Braun R, Conner AJ, Christey MC (2007) Whole genome amplification from plant cell colonies of somatic hybrids using strand displacement amplification. *Plant Biotechnology Reports* 1: 175-177
- Ren, JP, Dickson MH, Earle ED (2000) Improved resistance to bacterial soft rot by protoplast fusion between *Brassica rapa* and *B. oleracea*. *Theoretical and Applied Genetics* 100: 810-819
- Rokka, WM, Xu YS, Kankila J, Kuuseal A, Pulli S, Pehu E (1994) Identification of somatic hybrids of dihaploid *Solanum tuberosum* lines and *S. brevidens* by species specific RAPD patterns and assessment of disease resistance of the hybrid. *Euphytica* 80: 207-217
- Saha, T, Majumdar S, Banerjee NS, Sen SK (2001) Development of interspecific somatic hybrid cell lines in cultivated jute and their early characterization using jute chloroplast RFLP marker. *Plant Breeding* 120: 439-444
- Sakomoto, K, Taguchi T (1991) Regeneration of intergeneric somatic hybrid plants between *Lycopersicon esculentum* and *Solanum muricatum*. *Theoretical and Applied Genetics* 81: 509-513
- Sala, C, Biasini MG, Morandi C, Nielsen E, Parisi B, Sala F (1985) Selection and nuclear DNA analysis of cell hybrids between *Daucus carota* and *Oryza sativa*. *Journal of Plant Physiology* 118: 409-419
- Saul, MW, Potrykus I (1984) Species-specific repetitive DNA used to identify interspecific somatic hybrids. *Plant Cell Reports* 3: 65-67
- Schieder, O (1977) Hybridisation experiments with protoplasts from chlorophyll-deficient mutants of some Solanaceae species. *Planta* 137: 253-257
- Schieder, O (1978) Somatic hybrids of *Datura innoxia* Mill + *Datura discolor* and of *Datura innoxia* Mill + *Datura stramonium* L. var *tutula*. 1. Selection and characterisation. *Molecular and General Genetics* 162: 113-119
- Shimizu, K, Miyabe Y, Nagaike H, Yabuya T, Adachi T (1999) Production of somatic hybrid plants between *Iris ensata* Thunb. and *I. germanica* L. *Euphytica* 107: 105-113
- Sigareva, MA, Earle ED (1997) Direct transfer of a cold-tolerant *Ogura* male-sterile cytoplasm into cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) via protoplast fusion. *Theoretical and Applied Genetics* 94: 213-220
- Sigareva, MA, Earle ED (1999) Regeneration of plants from protoplasts of *Capsella bursapastoris* and somatic hybridization with rapid cycling *Brassica oleracea*. *Plant Cell Reports* 18: 412-417
- Smith, HM, Kao KN, Combatti NC (1976) Interspecific hybridization by protoplast fusion of *Nicotiana*. *The Journal of Heredity* 67: 123-128
- Sonntag, K, Ruge-Wehling B, Wehling P (2009) Protoplast isolation and culture for somatic hybridization of *Lupinus angustifolius* and *L. subcarinosus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 96: 297-305
- Sun, Y-H, Xue Q-Z, Ding C-M, Zhang X-Y, Zhang L-L, Want W-F, Ali S (2005) Somatic cybridization between *Nicotiana tabacum* and *N. repanda* based on a single inactivation procedure of nuclear donor parental protoplasts. *Plant Science* 168: 303-308
- Sun, Y, Nie Y, Guo X, Huang C, Zhang X (2006) Somatic hybrids between *Gossypium hirsutum* L. (4x) and *G. davidsonii* Kellogg (2x) produced by protoplast fusion. *Euphytica* 151: 393-400
- Szczerbakowa, A, Maciejewska U, Zimnoch-Guzowska E, Wielgat B (2003) Somatic hybrids *Solanum nigrum* (+) *S. tuberosum*: morphological assessment and verification of hybridity. *Plant Cell Reports* 21: 577-584
- Tabaeizadeh, Z, Ferl RJ, Vasil IK (1986) Somatic hybridization in the gramineae: *Saccharum officinarum* L. (sugarcane) and *Pennisetum americanum* (L.) K. Schum. (pearl millet). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83: 5616-5619
- Takemori, N, Shinoda K, Kadotani N (1994) RAPD markers for confirmation of somatic hybrids in the dihaploid breeding of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Cell Reports* 13: 367-371
- Tamura, M, Tao R, Sugiura A (1998) Production of somatic hybrids between *Diospyros glandulosa* and *D. kaki* by protoplast fusion. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 54: 85-91

- Tamura, N, Murata Y, Mukaihara T (2002) A somatic hybrid between *Solanum integrifolium* and *Solanum violaceum* that is resistant to bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. *Plant Cell Reports* 21: 353-358
- Taski-Ajdukovic, K, Vasic D, Nagl N (2006) Regeneration of interspecific somatic hybrids between *Helianthus annuus* L. and *Helianthus maximiliani* (Schrader) via protoplast electrofusion. *Plant Cell Reports* 25: 698-704
- Thieme, R, Rakosy-Tican E, Gavrilenko T, Antonova O, Schubert J, Nachtigall M, Heimbach U, Thieme T (2008) Novel somatic hybrids (*Solanum tuberosum* L. + *Solanum tarnii*) and their fertile BC₁ progenies express extreme resistance to potato virus Y and late blight. *Theoretical and Applied Genetics* 116: 691-700
- Tian, D, Rose RJ (1999) Asymmetric somatic hybridisation between the annual legumes *Medicago truncatula* and *Medicago scutellata*. *Plant Cell Reports* 18: 989-996
- Toki, S, Kameya T, Abe T (1990) Production of a triple mutant, chlorophyll-deficient, streptomycin-, and kanamycin-resistant *Nicotiana tabacum*, and its use in intergeneric somatic hybrid formation with *Solanum melongena*. *Theoretical and Applied Genetics* 80: 588-592
- Tu, Y, Sun J, Liu Y, Ge X, Zhao Z, Yao X, Li Z (2008) Production and characterization of intertribal somatic hybrids of *Raphanus sativus* and *Brassica rapa* with dye and medicinal plant *Isatis indigotica*. *Plant Cell Reports* 27: 873-883
- Tusa, N, Grosser JW, Gmitter FG, Louzada ES (1992) Production of tetraploid somatic hybrid breeding parents for use in lemon cultivar improvement. *HortScience* 27: 445-447
- Uchimiya, H, Ohgawara T, Kato H, Akiyama T, Harada H, Sugiura M (1983) Detection of two different nuclear genomes in parasexual hybrids by ribosomal RNA gene analysis. *Theoretical and Applied Genetics* 64: 117-118
- Vlahova, M, Hinnisdaels S, Frulleux F, Claeys M, Atanassov A, Jacobs M (1997) UV irradiation as a tool for obtaining asymmetric somatic hybrids between *Nicotiana plumbaginifolia* and *Lycopersicon esculentum*. *Theoretical and Applied Genetics* 94: 184-191
- Waara, S, Glimelius K (1995) The potential of somatic hybridization in crop breeding. *Euphytica* 85: 217-233
- Wang, YP, Sonntag K, Rodloff E, Groeneveld I, Gramenz J, Chu CC (2006) Production and characterization of somatic hybrids between *Brassica napus* and *Raphanus sativus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 86: 279-283
- Wang, M, Zhao J, Peng Z, Guo W, Wang Y, Wang L, Xia G (2008) Chromosomes are eliminated in the symmetric fusion between *Arabidopsis thaliana* L. and *Bupleurum scorzonerifolium* Willd. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 92: 121-130
- White, DWR, Vasil IK (1979) Use of amino acid analogue-resistant cell lines for selection of *Nicotiana sylvestris* somatic cell hybrids. *Theoretical and Applied Genetics* 55: 107-112
- Wijbrandi, J, Postuma A, Kok JM, Rijken R, Vos JGM, Koornneef M (1990a) Asymmetric somatic hybrids between *Lycopersicon esculentum* and irradiated *Lycopersicon peruvianum*. 1. Cytogenetics and morphology. *Theoretical and Applied Genetics* 80: 305-312
- Wijbrandi, J, Wolters AMA, Koornneef M (1990b) Asymmetric somatic hybrids between *Lycopersicon esculentum* and irradiated *Lycopersicon peruvianum*. 2. Analysis with marker genes. *Theoretical and Applied Genetics* 80: 665-672
- Williams, CE, Wielgus SM, Haberlach GT, Guenther C, Kim-Lee H, Helgeson JP (1993) RFLP analysis of chromosomal segregation in progeny from an interspecific hexaploid somatic hybrid between *Solanum brevidens* and *Solanum tuberosum*. *Genetics* 135: 1167-1173
- Wolters, AM, Jacobsen E, O'Connell M, Bonnema G, Sree Ramulu K, de Jong H, Schoenmakers H, Wijbrandi J, Koornneef M (1994) Somatic hybridization as a tool for tomato breeding. *Euphytica* 79: 265-27
- Wright, RL, Somers DA, McGraw RL (1987) Somatic hybridization between birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus* L.) and *L. conimbricensis* Willd. *Theoretical and Applied Genetics* 75: 151-156
- Xiang, F, Xia G, Zhi D, Wang J, Nie H, Chen H (2004) Regeneration of somatic hybrids in relation to the nuclear and cytoplasmic genomes of wheat and *Setaria italica*. *Genome* 47: 680-688
- Xiao, W, Huang X, Gong Q, Dai X-M, Zhao J-T, Wei Y-R, Huang X-L (2009) Somatic hybrids obtained by asymmetric protoplast fusion between *Musa Silk* cv. Guoshanxiang (AAB) and *Musa acuminata* cv. Mas (AA). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 97: 313-321
- Xu, YS, Clark, MS, Pehu E (1993) Use of RAPD markers to screen somatic hybrids between *Solanum tuberosum* and *S. brevidens*. *Plant Cell Reports* 12: 107-109
- Xu, Z, Jia J (1997) Regeneration of intergeneric somatic hybrids by protoplast fusion between *Onobrychis viciaefolia* and *Medicago sativa*. *Science in China* 40: 363-370
- Yamada, T, Hosaka K, Kaide N, Nakagawa K, Misoo S, Kamijima O (1998) Cytological and molecular characterization of BC₁ progeny from two somatic hybrids between dihaploid *Solanum acaule* and tetraploid *S. tuberosum*. *Genome* 41: 743-750
- Yamagishi, H, Glimelius K (2003) Somatic hybrids between *Arabidopsis thaliana* and cytoplasmic male-sterile radish (*Raphanus sativus*). *Plant Cell Reports* 22: 52-58
- Yamagishi, H, Landgren M, Forsberg J, Glimelius K (2002) Production of asymmetric hybrids between *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* utilizing an efficient protoplast culture system. *Theoretical and Applied Genetics* 104: 959-964
- Yan, Z, Tian Z, Huang B, Huang R, Meng J (1999) Production of somatic hybrids between *Brassica oleracea* and the C₃-C₄ intermediate species *Moricandia nitens*. *Theoretical and Applied Genetics* 99: 1281-1286
- Zhao, Z-g, Hu T-t, Ge X-H, Du X-z, Ding L, Li Z-y (2008) Production and characterization of intergeneric somatic hybrids between *Brassica napus* and *Orychophragmus violaceus* and their backcrossing progenies. *Plant Cell Reports* 27: 1611-1621
- Zhou, A, Xia G (2005) Introgression of the *Haynaldia villosa* genome into g-ray-induced asymmetric somatic hybrids of wheat. *Plant Cell Reports* 24: 289-296