

Trasformación Genética con Protoplastos

La transformación genética implica que el ADN de una planta donante sea absorbido por una célula receptora o protoplasto e incorporado por ella en forma estable, y que la información genética codificada en el ADN foráneo se exprese como una característica nueva y estable. La transferencia de orgánulos portadores de ADN, así como el ADN purificado de la planta o los genes clonados de la planta en las moléculas vectoras de ADN, ofrecen enfoques nuevos y efectivos para la transferencia de genes.

Trasferencia de orgánulos

Se han descrito varios métodos para aislar, de protoplastos intactos, los siguientes orgánulos: cloroplastos (Horvath et al., 1978; Rathnam et al., 1976; Nishimura et al., 1976), núcleos (Hadlaczy et al., 1983; Ohyama et al., 1977) y cromosomas (Griesbach et al., 1982; Hadlaczy et al., 1983; Szabados et al., 1981; Malmberg y Griesbach, 1983).

La captación de los orgánulos aislados por los protoplastos receptores es posible en la endocitosis, fenómeno que ocurre naturalmente en las células (Ueda et al., 1978). El tratamiento con PEG o PVA (alcohol polivinílico) puede aumentar la frecuencia de captación que sin esos compuestos sería baja, pero presenta también los problemas inherentes a todo procedimiento similar a la fusión.

Varios autores han informado sobre la transferencia de cloroplastos aislados (Potrykus, 1973; Davey et al., 1976). Un estudio detallado ha mostrado que no sólo los procesos endocitóticos sino también los de fusión son responsables de la transferencia de cloroplastos (Davey et al., 1976). Mientras que las frecuencias de captación de cloroplastos fluctuaron alrededor del 20%, la transferencia nuclear, empleando métodos similares, fue menor del 5% (Lorz, 1978; Potrykus y Hoffmann, 1973).

El tratamiento con PEG facilitó la captación de cromosomas aislados por los protoplastos receptores (Szabados et al., 1981). El porcentaje relativamente alto de dicariontes que contenían cromosomas transferidos indica que existe una fuerte asociación entre los procesos de captación y los de fusión (Szabados et al., 1981). Griesbach (1983) desarrolló un sistema de microinyección para introducir los cromosomas aislados en los protoplastos de plantas superiores, con miras a evitar los problemas que resultarían si ocurriera un proceso de fusión; encontró este autor que la microinyección es un sistema de suministro altamente eficiente para la transferencia

cromosómica. El sistema, con leves modificaciones, podría utilizarse fácilmente para inyectar una amplia gama de objetos y productos químicos en los protoplastos. Por otra parte, el fraccionamiento de los cromosomas aislados permite la transferencia de cromosomas específicos (Malmberg et al., 1983).

Es de esperar que la transferencia cromosómica, un sistema bien establecido y ampliamente utilizado en experimentos de transformación celular en los mamíferos (Klobutcher y Ruddle, 1981), desempeñe un papel importante en el futuro de la genética somaticocelular de las plantas.

Captación de ADN purificado

Existen claras evidencias de que los protoplastos de las plantas superiores pueden captar ADN (Kado et al, 1980) siendo Ohyama et al. (1972) los primeros en informar sobre la captación exitosa del ADN de *E. coli* por los protoplastos de las plantas superiores.

La captación de ADN es estimulada por policationes como poli-L-lisina, poli-L-ornitina y DEAE-dextrano; por iones de Ca^{++} , Mg^{++} o Zn^{++} ; o por un tratamiento similar a la fusión con PEG y, opcionalmente, con CaCl_2 y pH alto (Ohyama et al., 1972; Lurquin et al., 1977; Lurquin et al., 1980; Suzuki et al., 1978). Los protoplastos tienen una fuerte actividad enzimática (ADN-asa) que puede despolimerizar el ADN añadido al medio de incubación antes de que éste llegue hasta ellos. La estabilidad del ADN donante depende de la configuración del mismo ADN y de las condiciones de incubación; además, se encontró que las moléculas superenrolladas y los plásmidos cerrados covalentemente eran más resistentes a la digestión que el ADN lineal. Los cationes bivalentes y polivalentes actúan como agentes protectores porque estimulan la compactación y agregación del ADN. Un pH alto (pH 10.5), en presencia de CaCl_2 , contribuye a la adecuada conservación del ADN donante tanto en el medio como en el protoplasto (Lurquin et al., 1977; Hughes et al., 1977; Lurquin y Marton, 1980).

Liposomas

Las vesículas lípidas (liposomas) han sido propuestas como valiosas herramientas para evitar la degradación de las moléculas de ADN y para llevarlas hasta los protoplastos. Varios métodos se han utilizado para la preparación de liposomas; tal vez el más eficiente es la evaporación de fase invertida (REV) desarrollado por Szoka et al., (1978). Los liposomas REV

pueden prepararse con muchos tipos de lípidos y presentan una gran capacidad de encapsulación. Se ha demostrado que los liposomas pueden proteger eficientemente el ADN y el ARN de la acción de las nucleasas presentes en las suspensiones de protoplastos, y que los liposomas que contienen ADN o ARN encapsulados pueden transferir los ácidos nucleicos a los protoplastos de las plantas (Uchimiya et al., 1981; Rollo et al., 1981; Fraley et al., 1982; Lurquin, 1979). Lurquin y Sheehy (1982) han sugerido que la transferencia ocurre durante la fusión entre los liposomas y la membrana plasmática.

Fukunaga et al. (1983) demostraron que los protoplastos de los cultivos de suspensión de *Vinca* sp. captaban los liposomas en la endocitosis. Según este método, el PEG favorece la adhesión primaria de los liposomas a los protoplastos, y un pH alto junto con un alto contenido de Ca^{++} la estabilizan y promueven la captación endocitótica de la vesícula. No se ha observado aquí ningún evento de fusión. Aunque la fusión puede efectuarse en otros sistemas liposomas/protoplastos, se supone que la captación endocitótica de los liposomas es común en los protoplastos vegetales.

Christen y Lurquin (1983) demostraron por su parte que el ARN del virus del moteado clorótico del caupí, encapsulado en los liposomas REV, podía infectar los protoplastos del mesófilo del caupí.

Esferoplastos

Hasezawa et al. (1983) describieron la introducción de esferoplastos de *Agrobacterium tumefaciens* en protoplastos de *Vinca rosea*. Cuando se añadió PEG o PVA, los esferoplastos se adhirieron fuertemente a la superficie de los protoplastos, y después de 10 minutos fueron absorbidos por endocitosis. Más tarde, los esferoplastos absorbidos perdieron su integridad y sus componentes parecían dispersarse en el citoplasma de los protoplastos.

La introducción de genes clonados en los protoplastos de las plantas por medio de los esferoplastos bacterianos parece un método nuevo y poderoso de transformación genética.

Vectores moleculares de las plantas

El ADN foráneo que ha sido introducido en los protoplastos de las plantas debería integrarse establemente en el ADN del núcleo (o en el de los orgánulos), y los genes contenidos en ese ADN, mediante sus códigos,

deberían expresarse. Se ha tratado además de transformar las células de las plantas o los protoplastos con ADN purificado, pero se observó que, para lograr una modificación genética exitosa, era preciso contar con vectores moleculares especiales y con cierto número de copias de los genes introducidos. Los siguientes son algunos de los vectores potenciales (Howell, 1982): plásmidos (plasmidios) de bacterias patógenas (*Agrobacterium* sp.), el ADN o el ARN de los virus de las plantas (caulimovirus, geminivirus, virus ARN, viroides), o los componentes de genomas inestables de las plantas (por ejemplo, elementos extracromosómicos de las mitocondrias del maíz).

Plásmidos Ti de *Agrobacterium* sp.

Los plásmidos Ti, inductores del tumor de *A. tumefaciens*, son los vectores más promisorios que se conocen actualmente para las plantas. *A. tumefaciens* promueve en varias dicotilodóneas la formación de tumores conocidos como agalla de la corona; el plásmido Ti de esta bacteria es el responsable de la tumogénesis (van Larebeke et al., 1974). Una porción específica del plásmido Ti, el ADN-T, se trasfiere al núcleo de la célula de la planta huésped y se integra mediante unión covalente a los cromosomas de las plantas; contiene este fragmento los genes responsables del crecimiento del tumor y de la síntesis de metabolitos especiales, los opinos: octopina, nopalina y agropina (Bevan y Chilton, 1982, Depicker et al., 1983).

Varios trabajos se han publicado sobre la transformación de las células vegetales in vitro. Marton et al. (1979) informaron sobre la transformación de células de tabaco derivadas de protoplastos, en un cocultivo con la bacteria *A. tumefaciens*. En un experimento similar, Hanold (1983) transformó células derivadas de protoplastos de *Hyoscyamus muticus* por medio de la bacteria *A. tumefaciens*. Los protoplastos de *Petunia* sp. y de tabaco fueron transformados con plásmidos Ti aislados, por medio de un tratamiento con poli-L-ornitina (Davey et al., 1980), o con PEG y alto contenido de Ca^{++} (Krens et al., 1982). Se logró también alta frecuencia de transferencia a los protoplastos de *Vinca* por medio de esferoplastos de *Agrobacterium* junto con un tratamiento de PEG o PVA (Hasezawa et al., 1981). En estos experimentos, el crecimiento tumoral, sin mencionar la hormona (auxina) y la síntesis de diferentes opinos, indicaron la transformación genética.

Existe la posibilidad de manipular genes en la región T sin que se altere el potencial de transferencia de ADN-T del plásmido. Cuando se producen

genes quiméricos, mediante la utilización de secuencias promotoras reconocibles por el sistema de transcripción de la planta y de secuencias de codificación de cualquier gen foráneo, los genes manipulados no sólo son trasferidos sino que se expresan funcionalmente en las células de las plantas, después de la transformación (Herrera-Estrella et al., 1983a; 1984; Broglie et al., 1984).

El objetivo final es la regeneración de las plantas modificadas genéticamente; se ha comprobado que es posible lograrlo, ya que ninguno de los genes de la región T es esencial para la trasferencia del ADN-T. Hóekema et al. (1983) han informado sobre la separación de la región 'vir' (inducción del tumor) y el ADN-T. Plantas fértiles de tabaco podrían regenerarse partiendo de tejidos tumorales, y las plantas regeneradas podrían transmitir los marcadores ligados al ADN-T a la progenie F1 con los coeficientes de segregación de Mendel. Así, el ADN-T se mantendría establemente integrado en los procesos de regeneración y propagación sexual (Wullems et al., 1981; Memelink et al., 1983). La Figura 34.4 ilustra los diferentes pasos para la transformación genética de las plantas mediante la utilización de *A. tumefaciens*. Otras especies de *Agrobacterium*, además del *A. tumefaciens*, podrían utilizarse en la manipulación genética de las plantas superiores. *A. rhizogenes* induce en varias plantas una enfermedad de las raíces caracterizada por la presencia de pilosidad ('raíces pilosas'). Esta enfermedad es análoga a los tumores de la agalla de la corona (Bevan et al., 1982). Estas bacterias tienen un plásmido inductor de raíces (Ri) y por lo menos una parte del ADN-T del plásmido Ri se trasfiere, se mantiene estable, y se expresa en los tejidos de las plantas como raíces pilosas (Chilton et al., 1982). Además, es posible lograr la regeneración de las plantas a partir de cultivos de callo de raíz inducidos por *A. rhizogenes* (Spano y Constantino, 1982).

Aplicaciones Agrícolas de la Genética de Células Somáticas

Aunque los métodos clásicos seguirán siendo la base del fitomejoramiento, varias técnicas nuevas de manipulación genética somátocelular son aplicables en diversas situaciones. Estas técnicas pueden suministrar una reserva nueva de genes como una base para el desarrollo de nuevas variedades. Las aplicaciones agrícolas exitosas de la genética somátocelular dependen de la solución de las siguientes limitaciones (Evans et al., 1983; Schieder, 1982):

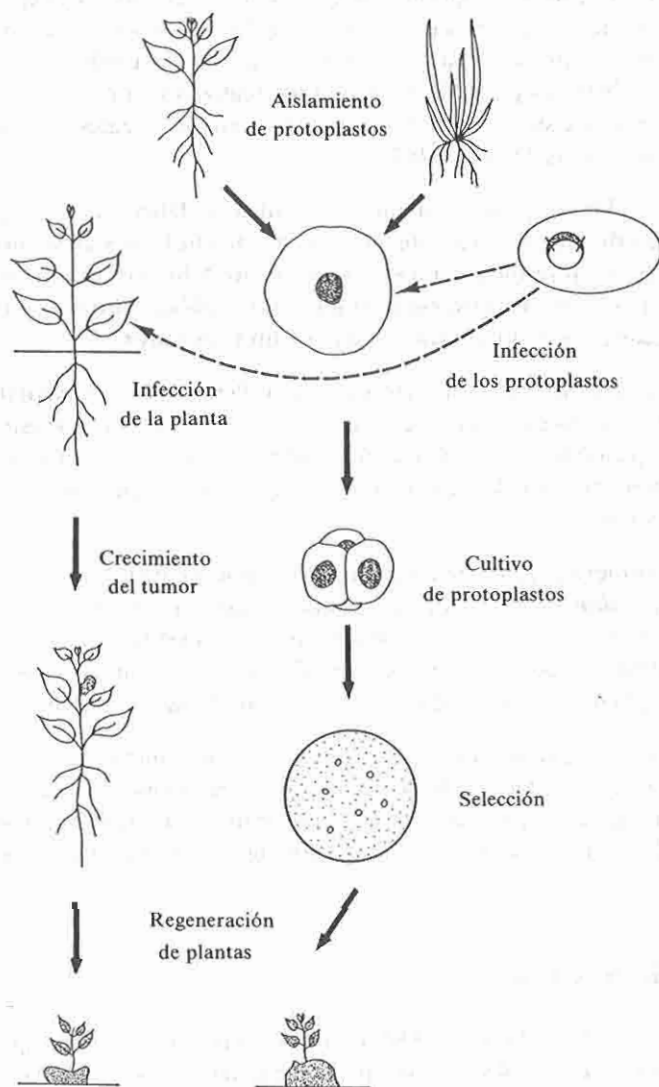


Figura 34.4. Trasformación genética de plantas con *Agrobacterium tumefaciens*.

1. Deberían desarrollarse, para todas las especies vegetales de importancia agronómica, sistemas eficientes de regeneración de plantas partiendo de los protoplastos. Hay sistemas adecuados de regeneración para muchas plantas de la familia de las Solanáceas (petunia, papa, tomate, tabaco) y para algunas plantas de las Umbelíferas y de las Crucíferas. A pesar de los esfuerzos realizados, prácticamente no se dispone de sistemas de regeneración para los cereales y para muchas leguminosas (Vasil, 1983).
2. Las plantas genéticamente manipuladas deberían ser capaces de reproducirse sexualmente para que puedan utilizarse en los programas de fitomejoramiento. La esterilidad de los híbridos somáticos intergenéricos deberá superarse mediante retrofusión, cultivo de embriones, o reduciendo el material genético a un progenitor.
3. Es necesario, para transferir los genes útiles, lograr una recombinación intergenómica, o sustitución cromosómica, entre las dos especies. La inducción de la recombinación mitótica puede ser necesaria antes de la regeneración de la planta para asegurar la transferencia del gen intergenómico.
4. El número cromosómico aneuploide o poliploide no es tolerable en un buen número de plantas propagadas sexualmente. La manipulación del número cromosómico de los híbridos somáticos podría ser necesaria; un ejemplo de ella es el cultivo de anteras que puede reducir el nivel de ploidía y estabilizar las nuevas combinaciones cromosómicas.

Cuando se supone que se ha construido un nuevo genotipo en un programa de fitomejoramiento, las diferentes técnicas genéticas somático-celulares pueden contribuir a la generación de nuevas combinaciones genómicas, o a la introducción de nuevos genes específicos (Sybenga, 1983).

Variación protoclonal

Chaleff (1983) y Maliga (1984) han analizado la importancia que tienen los cultivos celulares de plantas para el aislamiento de mutantes agrónomicamente útiles. Tal vez la demostración más significativa del valor potencial de la variación que ocasiona el cultivo de protoplastos fue presentada por Shepard et al. (1980) en la papa. Estos investigadores seleccionaron más de 1000 clones regenerados de protoplastos foliares de la variedad Russet Burbank y encontraron en ellos una variación significativa y estable en el hábito de crecimiento, la fecha de madurez, la uniformidad de los

tubérculos, el color de la piel del tubérculo, la respuesta del clon al fotoperíodo, y el rendimiento. Algunas características nuevas aportaron mejoras agronómicas en comparación con el progenitor.

En otros experimentos se encontró también una variación en los clones de papa procedentes de protoplastos (Karp et al., 1982; Bokelman et al., 1983; Thomas et al., 1982; Secor et al., 1981; Ramulu et al., 1983).

Trasferencia de información genética en la hibridación somática

En los experimentos de hibridación somática se han utilizado sólo pocas plantas de cultivos importantes. La hibridación somática intraespecífica puede emplearse para el fitomejoramiento de especies de plantas propagadas vegetativamente. Wenzel et al. (1979) propusieron un esquema de fitomejoramiento para la papa que combina los métodos clásicos con la reducción partenogenética y androgenética de los cromosomas, al cual debe seguir la hibridación somática. El esquema se basa en la fusión de los protoplastos de plantas diploides; ésta conduce a la combinación de diferentes genomas que contienen varios genes de resistencia.

La papa también se ha utilizado en algunos experimentos de hibridación somática interespecífica. Melchers y sus colaboradores fusionaron protoplastos de tomate y de papa y obtuvieron la regeneración de los primeros híbridos somáticos que, por otra parte, no se pueden producir sexualmente (Melchers et al., 1978). Investigaron además, entre otras características, la tolerancia al frío de los híbridos y encontraron que su comportamiento era intermedio entre el tomate susceptible y la papa resistente. Llegaron a la conclusión de que estos híbridos somáticos podían servir para transferir al tomate los genes de resistencia al frío (Smillie et al., 1979).

Se pueden obtener híbridos somáticos partiendo de protoplastos fusionados de la papa y de *Solanum brevidens*, una especie que aunque no forma tubérculos, interesa como donante potencial de resistencia a las enfermedades de la papa cultivada. Estas dos especies son sexualmente incompatibles, lo que constituye un obstáculo para la obtención de cruza-mientos; ahora bien, la hibridación somática es una interesante alternativa para lograr su combinación (Barsby et al., 1984).

Se ha estudiado la hibridación somática en el género *Medicago* con miras a la introducción de variabilidad en la alfalfa. Los híbridos somáticos se produjeron mediante la fusión interespecífica de protoplastos de *Medicago sativa* y *M. falcata*. Estos resultados indican que las técnicas

genéticas somátocelulares se están incorporando en los programas de fitomejoramiento de plantas que no pertenecen a la familia de las Solanáceas (Teoulé, 1983).

La fusión sería muy útil para la transferencia de genes individuales o de pequeños bloques de genes estrechamente ligados. La incorporación de la resistencia a enfermedades es de especial importancia cuando no se puede lograr la hibridación sexual convencional. Evans et al. (1981) produjeron híbridos somáticos de *Nicotiana nesophila* y *N. stocktonii* con *N. tabacum* (tabaco cultivado). Además, encontraron que la resistencia al virus del mosaico del tabaco derivada de *N. nesophila* se expresaba en los híbridos somáticos.

Uchimiya (1982) creó un nuevo híbrido somático entre *N. tabacum* con esterilidad masculina y *N. glutinosa* resistente al virus del mosaico del tabaco (TMV). Encontró que en las plantas híbridas regeneradas se mantenía tanto la esterilidad masculina como la resistencia al TMV. Estos resultados muestran que diferentes caracteres agrónomicamente importantes pueden combinarse mediante hibridación somática.

La transferencia de mitocondrias o cloroplastos de plantas donantes a las receptoras y, por consiguiente, la obtención de nuevas combinaciones de características citoplásmicas es muy promisoría para la agricultura. Varias características conocidas y controladas por los genomas de cloroplastos o mitocondrias, como la esterilidad masculina, la resistencia a fitotoxinas o a los pesticidas, tienen importancia para el fitomejoramiento.

Algunos resultados obtenidos mediante hibridación citoplásmica en el fitomejoramiento son los siguientes: la exitosa transferencia de la característica ECM en las especies de *Nicotiana* (Zelcer et al., 1978; Uchimiya, 1982), de *Raphanus* y de *Brassica* (Pelletier et al., 1983); la restauración de la fertilidad en el tabaco que presenta esterilidad citoplásmica masculina (Aviv y Galun, 1980); la transferencia de la resistencia a la triazina en *Brassica* (Pelletier et al., 1983); y la resistencia a la atrazina en algunas especies de papa.

En los experimentos de Pelletier et al. (1983) se crearon nuevas combinaciones de citoplasmas mediante fusión de protoplastos. Estos híbridos combinan un tipo superior de cloroplasto de *Brassica napus* y la característica ECM de *Raphanus sativus*. En otro experimento, los cloroplastos de *Brassica campestris* resistentes a la triazina se combinaron con *Raphanus sativus* (portador de ECM) y se asociaron con el núcleo de una tercera especie, *B. napus*. Estas plantas pueden ser muy útiles en la estrategia del control de malezas y en la producción de semilla híbrida.

Trasformación de plantas para el mejoramiento de los cultivos

La transformación celular de las plantas puede facilitar la transferencia de genes de una especie a otra en un solo paso. Es posible transferir solamente el gen elegido sin que se presenten efectos nocivos para los otros genes. Además, es posible producir genes híbridos con métodos bioquímicos y transferir estos genes para permitir su expresión correcta en la planta receptora.

Diferentes características deben diseñarse; las más importantes, cuando se consideran experimentos de transformación que respondan a las necesidades de un futuro cercano, son éstas (Barton y Brill, 1983):

- la transferencia de la resistencia a los herbicidas;
- el mejoramiento de la calidad de la proteína de la semilla, enriqueciendo el contenido de ésta con aminoácidos; y
- la resistencia a ciertas plagas y enfermedades.

Conclusiones

Las perspectivas de la utilización de técnicas de manipulación genética con protoplastos para el fitomejoramiento son enormes. La mayor parte de las técnicas de ingeniería genética requieren etapas de cultivo de protoplastos y por ello la regeneración se ha vuelto necesaria.

El sistema de protoplastos unicelulares constituye el vínculo entre la biología molecular moderna y la planta, y hace posible la adaptación de los métodos genéticos microbianos a las plantas para contribuir al fitomejoramiento con métodos no convencionales. No obstante, el cultivo de protoplastos y la eficiencia de la regeneración alcanzan niveles adecuados sólo en pocos modelos de sistemas de plantas. Por tal razón, estas técnicas no son aplicables todavía a todas las especies vegetales de interés económico.

Procedimientos

Fusión de protoplastos

Hay diferentes procedimientos para fusionar protoplastos utilizando PEG (polietilenglicol). Aquí se describirá una técnica basada en el tratamiento de los protoplastos en una monocapa con una solución de PEG; aquéllos se diluyen luego empleando una alta concentración de Ca^{++} y un pH alto (Kao et al., 1974). La dilución con una solución modificada que contenga de 5% a 10% de DMSO (dimetilsulfóxido) puede aumentar la frecuencia de fusión (Menczel et al., 1981).

La técnica para la identificación de los heterocariontes requiere la utilización de protoplastos verdes aislados de las hojas y de protoplastos incoloros aislados de cultivos de suspensiones celulares.

Procedimiento de fusión. Operando como se indica en el Capítulo 10, aisle protoplastos de mesófilo foliar y de suspensiones celulares; luego proceda de la siguiente manera:

- 1) Suspenda de nuevo los protoplastos lavados en una solución A_3 y mezcle los protoplastos del mesófilo con los protoplastos del cultivo celular en una proporción 1:1.
- 2) Vierta con una pipeta gotas de 150-200 μl de la suspensión de protoplastos en una caja Petri (3-4 gotas/placa), o en las tapas estériles del portaobjetos colocadas en la caja.
- 3) Permita que los protoplastos se asienten y formen una monocapa (aproximadamente 5 minutos).
- 4) Añada lentamente 0.5 ml de la solución de PEG (Cuadro 34.4) en el borde de la gota, e incube los protoplastos durante 10-20 minutos.
- 5) Remueva cuidadosamente una parte de la solución de PEG (0.3-0.5 ml), añada 0.5 ml de la solución W_1 (Cuadro 34.4) a las gotas, e incube los protoplastos durante otros 5-10 minutos. La solución W_2 puede remplazar la W_1 en este paso de dilución; sin embargo, el uso de W_2 deberá someterse a monitoría cuidadosa ya que el DMSO puede dañar fácilmente los protoplastos.
- 6) Añada 2 ml de medio de cultivo de protoplastos y lave los protoplastos 4-5 veces cuidadosamente con alícuotas de 2 ml de medio de cultivo fresco. Cultive los productos de la fusión en la misma caja Petri, según se describió anteriormente.

Cuadro 34.4. Soluciones para lograr la fusión de protoplastos.

A) Solución de PEG^a

Componente	Cantidad
PEG 1540 (peso molecular 1300-1600)	50 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	150 mg
KH ₂ PO ₄	10 mg
pH	5.5

B) Soluciones de lavado^a

Componente	Grupo a (cant.)	Grupo b (cant.)	Grupo c (cant.)
Glucosa	—	10.8 g	10.8 g
Glicina	750 mg	—	—
CaCl ₂ ·2H ₂ O	—	1.47 g	1.47 g
DMSO	—	—	10% v/v
pH	10.5	—	—

W₁ = Mezcla de grupo a + grupo b (1:1)

W₂ = Mezcla de grupo a + grupo c (1:1)

a. En 100 ml de agua bidestilada; cant. = cantidad.

Observe finalmente el proceso de fusión de los protoplastos bajo un microscopio invertido. La aplicación rutinaria de este procedimiento ha producido heterocariontes de varias especies vegetales con un eficiencia del 3%-5%. Los heterocariontes se reconocen fácilmente por su contenido de cloroplastos (originados en el mesófilo) y por la presencia de filamentos citoplásmicos (originados en la suspensión celular).

Métodos citológicos para protoplastos

Los protoplastos de las plantas son muy frágiles; por tanto, es preciso modificar las técnicas convencionales de coloración y fijación para conservar sus características estructurales. Kao (1982) ofrece el siguiente método sencillo para colorear el núcleo y los cromosomas de los protoplastos:

- 1) Mezcle 1 volumen de protoplastos purificados con 9 volúmenes de un fijador y deje los protoplastos en el fijador durante un día a 5 °C. (Se pueden conservar los protoplastos en este fijador hasta 2 semanas.)
- 2) Coloque una gota de 20 μl de protoplastos fijados en un portaobjeto del microscopio y añada lentamente 50 μl de la solución de fucsina modificada.

- 3) Coloque cuidadosamente un cubreobjeto sobre la gota y deje que se desarrolle la coloración durante un lapso de unos minutos hasta una hora.
- 4) Apriete cuidadosamente la preparación y selle el portaobjeto con cera viscosa.

Este método se consideró adecuado para colorear el núcleo y los cromosomas de diferentes especies. La intensidad de la coloración en el núcleo varía de una especie vegetal a otra y permite diferenciar el núcleo y los cromosomas de los heterocariontes (Constabel et al., 1975; Szabados et al., 1981).

Referencias

- Akada S.; Hirai, A. y Uchimiya, H. 1983. Studies on mode of separation of chloroplast genomes in parasexual hybrid calli; 1: Fraction I protein composition in unseparated hybrid callus. *Plant Sci. Lett.* 31:223-230.
- Altman, A.; Kaur-Sawhney, R. y Galston, A. V. 1977. Stabilization of oat leaf protoplasts through polyamine mediated inhibition of senescence. *Plant Physiol.* 60:570-574.
- Ashmore S. E. y Gould A. R. 1982. Protoplast fusion and the cell cycle. *Plant Cell Reports* 1:225-228.
- Aviv, D. y Galun, E. 1980. Restoration of fertility in cytoplasmic male sterile (CMS) *Nicotiana glauca* by fusion with X-irradiated *N. tabacum* protoplasts. *Theor. Appl. Genet.* 58:121-127.
- Barsby T. L.; Shepard, J. F.; Kemble, R. Y. y Wong, R. 1984. Somatic hybridization in the genus *Solanum*: *S. tuberosum* and *S. brevifolium*. *Plant Cell Reports* 3:165-167.
- Barton, K. A. y Brill, W. J. 1983. Prospects in plant genetic engineering. *Science* 219:671-676.
- Bayliss, M. W. 1980. Chromosomal variation in plant tissues in culture. *Int. Rev. Cytol. Suppl.* 11A:113-144.
- Belliard, G.; Pellieter, G.; Vedel, F. y Quatier, F. 1978. Morphological characteristics and chloroplast DNA distribution in different cytoplasmic para-sexual hybrids of *Nicotiana glauca*. *Mol. Gen. Genet.* 165:231-237.
- ; Vedel, F. y Pelletier, G. 1979. Mitochondrial recombination in cytoplasmic hybrids of *Nicotiana glauca* by protoplast fusion. *Nature* 218:401-403.

- Bevan, M. W. y Chilton, M. D. 1982. T-DNA of the *Agrobacterium* Ti and Ri plasmids. *Ann. Rev. Genet.* 16:357-384.
- Binding, H.; Jaim, S. M.; Finger, J.; Mordhorst, G.; Nehls, R. y Gressel, J. 1982. Somatic hybridization of an atrazine resistant biotype of *Solanum nigrum* with *Solanum tuberosum*; 1: Clonal variation in morphology and in atrazine sensitivity. *Theor. Appl. Genet.* 63:273-277.
- Boeshore, M. L.; Lifshitz, I.; Hansen, M. R. e Izhar, S. 1983. Novel composition of mitochondrial genomes in *Petunia* somatic hybrids derived from cytoplasmic male sterile and fertile plants. *Mol. Gen. Genet.* 190:459-467.
- Bokelman, G. S. y Roest, S. 1983. Plant regeneration from protoplasts of potato (*Solanum tuberosum* cv. Bintyc). *Z. Pflanzenphysiol.* 109:259-265.
- Bourgin, J. P. 1978. Valine-resistant plants from *in vitro* selected tobacco cells. *Mol. Gen. Genet.* 161:225-230.
- ; Chupeau, M. C. y Missonier, C. 1980. Aminoacid resistant plants from tobacco cells selected *in vitro*. En: Proceedings of the Centre National pour la Recherche Scientifique-National Science Foundation (CNRS-NSF) Workshop, Orsay, Francia.
- Brogie, R.; Conezzi, G.; Fraley, R. T.; Rogers, S. G.; Horsch, R. B.; Niedermeyer, J. G.; Finck, J. S. y Caua, N. H. 1984. Light-regulated expression of a pea ribulose-1,5-biphosphate carboxilase small subunit gene in transformed plant cells. *Science* 224:838-843.
- Burgess, J. y Fleming, E. N. 1974a. Ultrastructural studies of the aggregation and fusion of plant protoplasts. *Planta* 118:183-193.
- y ———. 1974b. Ultrastructural observations of cell wall regeneration around isolated tobacco protoplasts. *J. Cell Sci.* 14:439-449.
- Carlson, P. S.; Smith, H. H. y Dearing, R. D. 1972. Parasexual interspecific plant hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. (E.U.)* 69:2292-2294.
- Cella, R.; Carbonera, D. E. e Iadarola, P. 1983. Characterization of intraspecific somatic hybrids of carrot obtained by fusion of iodoacetate-inactivated A2CA-resistant and sensitive protoplasts. *Z. Pflanzenphysiol.* 112:449-457.
- Chaleff, R. S. 1983. Isolation of agronomically useful mutants from plant cell cultures. *Science* 219:676-682.
- Chien, Y. C.; Kao, K. N. y Wetter, L. R. 1982. Chromosomal and isozyme studies of *Nicotiana tabacum*-*Glycine max* hybrid cell lines. *Theor. Appl. Genet.* 62:301-304.
- Chilton, M. D.; Tepfer, D. A.; Petit, A.; David, C.; Casse-Delbart, F. y Tempé, J. 1982. *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genomes of the host plant root cells. *Nature* 295:432-434.

- Christen, A. A. y Lurquin, P. F. 1983. Infection of cowpea mesophyll protoplasts with Cowpea Chlorotic Mottle Virus (CCMV) RNA encapsulated in large liposomes. *Plant Cell Reports* 2:43-46.
- Constabel, F.; Dudits, D.; Gamborg, O. L. y Kao, K. N. 1975. Nuclear fusion in intergeneric heterokaryons: A note. *Can. J. Bot.* 53:2092-2095.
- ; Weber, G. y Kirkpatrick, J. W. 1977. Sur la compatibilité des chromosomes dans les hybrides intergénériques de cellules de *Glycine max* x *Vicia hajastana*. *C. R. Acad. Sci. Paris* 285 Série D:319-322.
- Cséplo, A. y Maliga, P. 1982. Lincomycin resistance, a new type of maternally inherited mutation in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Current Genetics* 6:105-109.
- Davey, R. M.; Fearson, E. M. y Power, J. B. 1976. Polyethylene glycol induced transplantation of chloroplasts into protoplasts: An ultrastructural assessment. *Plant Sci. Lett.* 7:7-16.
- ; Clothier, R. H.; Balls, M. y Cocking, E. C. 1978. An ultrastructural study of the fusion of cultured amphibian with higher plant protoplasts. *Protoplasma* 96:157-172.
- ; Cocking, E. C.; Freeman, J.; Pearce, N. y Tudor, I. 1980. Transformation of *Petunia* protoplasts by isolated *Agrobacterium* plasmids. *Plant Sci. Lett.* 18:307-313.
- Depicker, A.; van Montagu, M. y Schell, J. 1983. Plant cell transformation by *Agrobacterium* plasmids. En: Kosuge, T.; Meredith, C. P. y Hollaender, A. (eds.). *Genetic engineering of plants*. Plenum Press. p. 143-176.
- Douglas, G. C.; Keller, W. A. y Setterfield, G. 1981a. Somatic hybridization between *Nicotiana rustica* and *N. tabacum*; II: Protoplast fusion selection, and regeneration of hybrid plants. *Can. J. Bot.* 59:220-227.
- ; Wetter, L. R.; Nakamura, C.; Keller, W. A. y Setterfield, G. 1981b. Somatic hybridization between *Nicotiana rustica* and *N. tabacum*; II: Biochemical, morphological and cytological analysis of somatic hybrids. *Can. J. Bot.* 59:228-230.
- Dudits, D.; Raskó, I.; Hadlaczky, Gy y Lima-de-Faria, A. 1976. Fusion of human cells with carrot protoplasts induced by polyethylene glycol. *Hereditas* 82:121-124.
- ; Hadlaczky, Gy; Levi, E.; Fejer, O.; Hajdu, Zs y Lázár, G. 1977. Somatic hybridization of *Daucus carota* and *D. capillifolius* by protoplast fusion. *Theor. Appl. Genet.* 51:127-132.
- ; Hadlaczky, Gy; Bajszár, Gy; Koncz, Cs; Lázár, G. y Horváth, G. 1979. Plant regeneration from intergeneric cell hybrids. *Plant Sci. Lett.* 15:101-112.

- ; Fejér, O.; Hadlaczký, Gy.; Koncz, Cs.; Lázár, G. y Horváth, G. 1980a. Intergeneric gene transfer mediated by plant protoplast fusion. *Mol. Gen. Genet.* 179:283-288.
- ; Hadlaczký, Gy.; Lázár, G. y Hajdu, Zs. 1980b. Increase in genetic variability through somatic cell hybridization of distantly related plant species. En: Sala, F.; Parisi, B.; Cella, R. y Ciferi, O. (eds.). *Plant cell cultures: Results and perspectives*. Elsevier, North Holland Biomedical Press. p. 207-214.
- ; Szabados, L. y Hadlaczký, Gy. 1982. Premature chromosome condensation in plant cells and its potential use in genetic manipulation. En: Rao, P. N.; Johnson, R. T. y Sperling, K. (eds.). *Premature chromosome condensation*. Academic Press, New York. p. 359-369.
- Evans, D. A. y Flick, C. E. 1983. Protoplast fusion: Agricultural applications of somatic hybrid plants. En: Kosuge, T.; Meredith, C. P. y Hollaender, A. (eds.). *Genetic engineering of plants*. Plenum Press. p. 271-288.
- ; —— y Jensen, R. A. 1981. Disease resistance: Incorporation into sexually incompatible somatic hybrids of the genus *Nicotiana*. *Science* 213:907-909.
- ; Wetter, L. R. y Gamburg, O. L. 1980. Somatic hybrid plants of *Nicotiana glauca* and *Nicotiana tabacum* obtained by protoplast fusion. *Physiol. Plant.* 48:225-230.
- ; Bravo, J. E.; Kut, S. A. y Flick, C. E. 1983. Genetic behaviour of somatic hybrids in the genus *Nicotiana*: *N. otophora* + *N. tabacum* and *N. silvestris* + *N. tabacum*. *Theor. Appl. Genet.* 65:93-101.
- ; Flick, C. E.; Kut, S. A. y Reed, S. M. 1982. Comparison of *Nicotiana tabacum* and *Nicotiana mesophylla* hybrids produced by ovule culture and protoplast fusion. *Theor. Appl. Genet.* 62:193-198.
- Evola, S. V. 1983. Chlorate-resistant variants of *Nicotiana tabacum* L. I. Selection *in vitro* and phenotypic characterization of cell lines and generated plants. *Molec. Gen. Genet.* 189:447-454.
- ; Earle, E. D. y Chaleff, R. S. 1983. The use of genetic markers selected *in vitro* for the isolation and genetic verification of intraspecific somatic hybrids of *Nicotiana tabacum* L. *Mol. Gen. Genet.* 189:441-446.
- Fluhr, R.; Aviv, D.; Edelman, M. y Galun, E. 1983. Hybrids containing mixed and sorted-out chloroplast following interspecific somatic fusions in *Nicotiana*. *Theor. Appl. Genet.* 65:289-294.
- Fraley, R. y Papahadjopoulos, D. 1982. Liposomes: The development of a new carrier system for introducing nucleic acids into plant and animal cells. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 96:171-191.

- ; Dellaporta, S. L. y Papahadjopoulos, D. 1982. Liposome-mediated delivery of tobacco mosaic virus RNA into tobacco protoplast: A sensitive assay for monitoring liposome-protoplast interactions. Proc. Natl. Acad. Sci. (E.U.) 79:1859-1863.
- Fukunaga, J.; Nagata, T.; Takebe, I.; Kakehi, T. y Matsui, C. 1983. An ultrastructural study of the interaction of liposomes with plant protoplasts. Exp. Cell. Res. 144:181-189.
- Galun, E. 1982. Somatic cell fusion for inducing cytoplasmic exchange: A new biological system for cytoplasmic genetics in higher plants. En: Vasil, I. K.; Scowcroft, W. R. y Frey, K. J. (eds.). Plant improvement and somatic cell genetics. Academic Press. p. 205-219.
- ; Arzee-Gonen, D.; Flecher, R.; Edelman, M. y Aviv, D. 1982. Cytoplasmic hybridization in *Nicotiana*: Mitochondrial DNA analysis in progenies resulting from fusion between protoplast having different organelle constitutions. Mol. Gen. Genet. 186:50-56.
- Gebhardt, C.; Schnebli, V. y King, P. J. 1981. Isolation of biochemical mutants using haploid mesophyll protoplasts of *Hyoscyamus muticus*; 2: Auxotrophic and temperature-sensitive clones. Planta 153:81-89.
- Gleba, Y. Y. y Hoffmann, F. 1978. Hybrid cell lines *Arabidopsis thaliana*-*Brassica campestris*: No evidence for specific chromosome elimination. Mol. Gen. Genet. 165:257-264.
- y ———. 1979. 'Arabidobrassica': Plant-genome engineering by protoplast fusion. Naturwissenschaften 66:547-554.
- ; Momot, V. P.; Cherep, M. V. y Skorzhinskaya. 1982. Intergeneric hybrid cell lines of *Atropa belladonna* x *Nicotiana chinensis* obtained by cloning individual protoplast fusion products. Theor. Appl. Genet. 62:75-79.
- ; ———; Okolot, A. N.; Cherep, N. N.; Skarzhinskaya, M. V. y Kotov, V. 1983. Genetic processing in intergeneric cell hybrids *Atropa-Nicotiana*; 2: Genetic constitution of cells of different clonal origin grown *in vitro*. Theor. Appl. Genet. 65:269-276.
- Glimelius, K.; Eriksson, T.; Grafe, R. y Muller, A. J. 1978. Somatic hybridization of nitrate reductase-deficient mutants of *Nicotiana tabacum* by protoplast fusion. Physiol. Plant. 44:273-277.
- y Bonnett, H. T. 1981. Somatic hybridization in *Nicotiana*: Restoration of photoautotrophy to an albino mutant with defective plastids. Planta 153:497-503.
- ; Chen, K. y Bonnet, H. T. 1981. Somatic hybridization of *Nicotiana*: Segregation of organellar traits among hybrid and cybrid plants. Planta 153:504-510.

- Gould, A. R. y Ashmore, S. E. 1982. Interaction of purified ADN with plant protoplasts of different cell cycle stage: The concept of a competent phase for plant cell transformation. *Theor. Appl. Genet.* 64:7-12.
- Griesbach, R. J. 1983. Protoplast microinjection. *Plant Mol. Biol. Reporter* 1:32-37.
- ; Malmberg, R. L. y Carlson, P. S. 1982. An improved technique for the isolation of higher plant chromosomes. *Plant Sci. Lett.* 24:55-60.
- Gupta, P. P.; Gupta, M. y Schieder, O. 1982. Correction of nitrate reductase defect in auxotrophic plant cells through protoplast-mediated intergeneric gene transfers. *Mol. Gen. Genet.* 188:378-383.
- Hadlaczky, Gy; Burg, K.; Mároy, P. y Dudits, D. 1980. DNA synthesis and division in interkingdom heterokaryons. *In Vitro* 16:647-650.
- ; Bistroy, Gy; Praznovszky, T. y Dudits, D. 1983. Moss isolation of plant chromosomes and nuclei. *Planta* 157:278-285.
- Hain, R.; Steinbis, H.-H. y Schell, J. 1984. Fusion of *Agrobacterium* and *E. coli* spheroplasts with *Nicotiana tabacum* protoplasts: Direct gene transfer from microorganism to higher plant. *Plant Cell Reports* 3:60-64.
- Hanold, D. 1983. In vitro transformation of protoplast-derived *Hyoscyamus muticus* cells by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Sci. Lett.* 30:177-183.
- Harms, C. T.; Potrykus, I. y Widholm, J. M. 1981. Complementation and dominant expression of amino acid analogue resistance markers in somatic hybrid clones from *Daucus carota* L. after protoplast fusion. *Z. Pflanzenphysiol.* 101:377-390.
- ; Oertli, J. J. y Widholm, J. M. 1982. Characterization of amino acid analogue resistant somatic hybrid cell lines of *Daucus carota* L. *Z. Pflanzenphysiol.* 106:239-249.
- Hasezawa, S.; Nagata, T. y Syono, K. 1981. Transformation of *Vinca* protoplasts mediated by *Agrobacterium* spheroplasts. *Mol. Gen. Genet.* 182:206-210.
- ; Matsui, C.; Nagata, T. y Syono, K. 1983. Cytological study of the introduction of *Agrobacterium tumefaciens* spheroplasts into *Vinca rosea* protoplasts. *Can. J. Bot.* 61:1052-1057.
- Herrera-Estrella, L.; Depicker, A.; van Montagu, M. y Schell, J. 1983a. Expression of chimeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector. *Nature* 303:209-213.
- ; De Block, M.; Messens, E.; Hernalsteens, J. P.; van Montagu, M. y Schell, J. 1983b. Chimeric genes as dominant selectable markers in plant cells. *The EMBO Journal* 2:987-995.

- ; van den Broeck, G.; Macenhant, R.; van Montagu, M.; Schell, J.; Tienko, M. y Cashmore, A. 1984. Light-inducible and chloroplast associated expression of a chimeric gene introduced into *Nicotiana tabacum* using a Ti-plasmid vector. *Nature* 310:115-120.
- Hóekema, A.; Hirsch, P. R.; Hooykaas, P. J. J. y Schilperoort, R. A. 1983. A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature* 303:179-180.
- Hoffmann, F. y Adachi, T. 1981. 'Arabidobrassica': Chromosomal recombination and morphogenesis in assymmetric intergeneric hybrid cells. *Planta* 153: 586-593.
- Horn, M. E.; Kameya, T.; Brothertan, J. E. y Widholm, J. M. 1983. The use of aminoacid analog resistance and plant regeneration ability to select somatic hybrids between *Nicotiana tabacum* and *N. glutinosa*. *Mol. Gen. Genet.* 192:135-240.
- Horvath, G.; Droppa, M.; Mustordy, L. A. y Faludi-Daniel, A. 1978. Functional characteristics of intact chloroplasts isolated from mesophyll protoplast and bundle sheath cells of maize. *Planta* 141:239-244.
- Howell, S. H. 1982. Plant molecular vehicles: Potential vectors for introducing foreign DNA into plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 33:609-650.
- Hughes, B. G.; White, F. G. y Smith, M. A. 1979. Fate of bacterial plasmid DNA during uptake by barley and tobacco protoplasts; 2: Protection by poly-L-ornithine. *Plant Sci. Lett.* 14:303-310.
- Izhar, S. y Tabib, Y. 1980. Somatic hybridization in *Petunia*; 2: Heteroplasmic state in somatic hybrids followed by cytoplasmic segregation into male sterile and male fertile lines. *Theor. Appl. Genet.* 57:241-246.
- ; Schlichter, M.; Schwartzberg, D. 1983. Sorting out of cytoplasmic elements in somatic hybrids of *Petunia* and the prevalence of the heteroplasmon through several meiotic cycles. *Mol. Gen. Genet.* 190:468-474.
- Kado, C. I. y Klrinhofs, A. 1980. Genetic modification of plant cells through uptake of foreing DNA. *Int. Rev. Cytol. Suppl.* 11B.
- Kameya, T.; Horn, M. E. y Widholm, J. M. 1981. Hybrid shoot formation from fused *Daucus carota* and *D. capillifolius* protoplasts. *Z. Pflanzenphysiol.* 104:459-466.
- Kao, K. N. 1977. Chromosomal behaviour in somatic hybrids of soybean *Nicotiana glauca*. *Mol. Gen. Genet.* 150:225-230.
- . 1982. Plant protoplast fusion and isolation of heterokaryocytes. En: Wetter, L. R. y Constabel, F. (eds.). *Plant tissue culture methods*. National Research Council of Canada. p. 49-56.

- y Michayluk, M. R. 1974. A method for high frequency intergeneric fusion of plant protoplasts. *Planta* 115:355-367.
- ; Constabel, F.; Michayluk, M. R. y Gamborg, O. L. 1974. Plant protoplast fusion and growth of intergeneric hybrid cells. *Planta* 120:215-227.
- Karp, A.; Nelson, R. S.; Thomas, E. y Bright, S. W. J. 1982. Chromosome variation in protoplast derived potato plants. *Theor. Appl. Genet.* 63: 265-272.
- Keller, W. A. y Melchers, G. 1973. The effect of high pH and calcium on tobacco leaf protoplast fusion. *Z. Naturforsch.* 280:737-741.
- Klobutcher, L. A. y Ruddle, F. H. 1981. Chromosome mediated gene transfer. *Ann. Rev. Biochem.* 50:533-554.
- Koblitz, H. 1980. The physiology of fusion in isolated higher plant protoplasts as a basis for somatic cell genetics. En: Ferenczy, L. y Farkas, G. L., (eds.). *Advances in protoplast research: Proceedings of the Fifth International Protoplast Symposium, Szeged. Akadémiai Kiadó, Budapest, Hungría.* p. 383-387.
- Krens, F. A.; Molendijk, L.; Wullems, G. J. y Schilperoort, R. A. 1982. In vitro transformation of plant protoplasts with Ti-plasmid DNA. *Nature* 296: 72-74.
- Krumbiegel, G. y Schieder, O. 1979. Selection of somatic hybrids after fusion of protoplasts from *Datura innoxia* Mill. and *Atropa belladonna* L. *Planta* 145:371-375.
- Kung, S. D.; Gray, J. C.; Wildman, S. G. y Carlson, P. S. 1975. Polypeptide composition of fraction I protein from parasexual hybrid plants in the genus *Nicotiana*. *Science* 187:353-355.
- Lázár, G. B.; Dudits, D. y Sung, Z. R. 1981. Expression of cycloheximide resistance in carrot somatic hybrids and their segregants. *Genetics* 98: 347-356.
- Lorz, H. y Potrykus, I. 1978. Investigation on the transfer of isolated nuclei into plant protoplasts. *Theor. Appl. Genet.* 53:251-256.
- ; Paszkowski, J.; Dierks-Ventling, C. y Potrykus, I. 1981. Isolation and characterization of cytoplasts and miniprotoplasts derived from protoplasts of cultured cells. *Physiol. Plant.* 53:384-391.
- Lurquin, P. F. y Kado, C. I. 1977. *Escherichia coli* plasmid pBR313 insertion into plant protoplasts and into their nuclei. *Mol. Gen. Genet.* 154:113-121.
- . 1979. Entrapment of plasmid DNA by liposomes and their interactions with plant protoplasts. *Nucleic Acids Research* 6:3773-3784.

- y Márton, L. 1980. DNA transfer experiments with plant protoplasts and bacterial plasmids. En: Frenczy, L., y Farkas, G. L., (eds.). Advances in protoplast research: Proceedings of the Fifth International Protoplast Symposium, Szeged. Akadémiai Kiadó, Budapest, Hungría. p. 387-405.
- y Sheehy, R. E. 1982. Binding of large liposomes to plant protoplasts and delivery of encapsulated DNA. *Plant Sci. Lett.* 25:133-146.
- Maliga, P. 1984. Isolation and characterization of mutant in plant cell culture. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 35:519-542.
- ; Lázár, G.; Joo, F.; Nagy, A. H. y Menczel, L. 1977. Restoration of morphogenetic potential in *Nicotiana* by somatic hybridization. *Mol. Gen. Genet.* 157:291-296.
- ; Menczel, L.; Sidorov, V.; Márton, L.; Cséplő, A.; Medgyesy, P.; Dung, T. M.; Lázár, G. y Nagy, F. 1982a. Cell culture mutants and their uses. En: Vasil, I. K.; Scowcroft, W. R. y Frey, K. J. (eds.). Plant improvement and somatic cell genetics. Academic Press, Nueva York. p. 221-237.
- ; Lorz, H.; Lázár, G. y Nagy, F. 1982b. Cytoplasm-protoplast fusion for interspecific chloroplast transfer in *Nicotiana*. *Mol. Gen. Genet.* 185: 211-215.
- Malmberg, R. L. y Griesbach, R. J. 1983. Chromosomes from protoplasts isolation, fractionation and uptake. En: Kosuge, T.; Meredith, C. P. y Hollaender, A. (eds.). Genetic engineering of plants. Plenum Press. p. 195-201.
- Marton, L.; Wullems, G. J.; Molendijk, L. y Schilperoort, L. A. 1979. In vitro transformation of cultured cells from *Nicotiana tabacum* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature* 277:129-131.
- ; Dung, T. M.; Mendel, R. R. y Maliga, P. 1982a. Nitrate reductase deficient lines from haploid protoplast cultures of *Nicotiana plumbaginifolia*. *Mol. Gen. Genet.* 182:301-304.
- ; Sidorov, V.; Biasini, G. y Maliga, P. 1982b. Complementation in somatic hybrids indicates four types of nitrate reductase deficient lines in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Mol. Gen. Genet.* 187:1-3.
- Matthews, B. F. y Cress, D. E. 1981. Liposome-mediated delivery of DNA to carrot protoplasts. *Planta* 153:90-94.
- Matzke, M. A.; Susani, M.; Binns, A. N.; Lewis, E. D.; Rubinstein, I. y Matzke, A. J. M. 1984. Transcription of a zein gene introduced into semiflower using a Ti-plasmid vector. *The EMBO Journal* 3:1525-1531.

- Medgyesy, P.; Menczel, L. y Maliga, P. 1980. The use of cytoplasmic streptomycin resistance: Chloroplast transfer from *Nicotiana tabacum* into *Nicotiana silvestris* and isolation of their somatic hybrids. *Mol. Gen. Genet.* 179: 693-698.
- Melchers, G. y Labib, G. 1974. Somatic hybridization of plant by fusion of protoplasts; I: Selection of light resistant hybrids of 'haploid' light sensitive varieties of tobacco. *Mol. Gen. Genet.* 153:277-294.
- ; Sacristán, D. y Holders, A. A. 1978. Somatic hybrid plants potato and tomato regenerated from fused protoplasts. *Carlsberg Res. Commun.* 43:203-218.
- Memelink, J.; Wullems, G. J. y Schilperoort, R. A. 1983. Nopaline T-DNA is maintained during regeneration and generative propagation of transformed tobacco plants. *Mol. Gen. Genet.* 190:516-522.
- Menczel, L.; Lázár, G. y Maliga, P. 1978. Isolation of somatic hybrids by cloning *Nicotiana* heterokaryons in nurse cultures. *Planta* 143:29-32.
- ; Nagy, F.; Kiss, Z. R. y Maliga, P. 1981. Streptomycin resistant and sensitive somatic hybrids of *Nicotiana tabacum*-*Nicotiana knightiana*: Correlation of resistant to sensitive *N. tabacum* plastids. *Theor. Appl. Genet.* 59:191-195.
- ; Nagy, F.; Lázár, G. y Maliga, P. 1983. Transfer of cytoplasmic male sterility by selection for streptomycin resistance after protoplast fusion in *Nicotiana*. *Mol. Gen. Genet.* 189:365-369.
- y Wold, K. 1984. High frequency of fusion induced in freely suspended protoplast mixtures by polyethyleneglycol and dimethylsulfoxide at high pH. *Plant Cell Reports* 3:196-198.
- Murai, N.; Sutton, D. W.; Murray, M. G.; Slightom, J. L.; Merlo, D. J.; Reichert, Na.; Sengupta-Gopalan, C.; Stock, C. A.; Baker, R. F.; Kemp, J. D. y Hall, T. C. 1983. Phaseolin gene from bean is expressed after transfer to sunflower via tumor-inducing plasmid vectors. *Science* 222:474-482.
- Nagata, T.; Okada, K.; Takebe, I. y Matsui, C. 1981. Delivery of tobacco mosaic virus RNA into plant protoplasts mediated by reverse-phase evaporation vesicles (liposomes). *Mol. Gen. Genet.* 184:161-165.
- Nagy, F.; Torok, I. y Maliga, P. 1981. Extensive rearrangements in the mitochondrial DNA in somatic hybrids of *Nicotiana tabacum* and *N. knightiana*. *Mol. Gen. Genet.* 183:437-439.
- Negrutiu, I. 1981. Improved conditions for large scale culture, mutagenesis, and selection of haploid protoplasts of *Nicotiana plumbaginifolia* Viviani. *Z. Pflanzenphysiol.* 104:431-442.

- ; Jacobs, M. y Caboche, M. 1984. Advances in somatic cell genetics in plants: The protoplast approach in basic studies on mutagenesis and isolation of biochemical mutants. *Theor. Appl. Genet.* 67:289-304.
- Nehls, R. 1978. The use of metabolic inhibitors for the selection of fusion products of higher plant protoplasts. *Mol. Gen. Genet.* 166:117-118.
- Nishimura, M. D.; Graham, D. y Akasama, T. 1976. Isolation of intact chloroplasts and other cell organelles from spinach leaf protoplasts. *Plant Physiol.* 58:309-314.
- Ohshima, K. 1982. Mutagenesis and isolation of 5-bromodeoxyuridine-resistant cells from soybean protoplasts. En: Wetter, L. R. y Constabel, F. (eds.). *Plant tissue culture methods*. Research Council of Canada. p. 101-104.
- ; Gamburg, O. L. y Miller, R. A. 1972. Uptake of exogenous DNA by plant protoplasts. *Can. J. Bot.* 50:2077-2080.
- ; Pelcher, L. E. y Horn, D. 1977. A rapid simple method for nuclei isolation from protoplasts. *Plant Physiol.* 60:179-181.
- Patnaik, G.; Cocking, E. C.; Hamill, J. y Pentall, D. 1982. A simple procedure for the manual isolation and identification of plant heterokaryons. *Plant Sci. Lett.* 24:105-110.
- Pelletier, G.; Primard, C.; Vedel, F.; Chetrit, P.; Remy, R.; Rouselle, B. y Renard, M. 1983. Intergeneric cytoplasmic hybridization in *Cruciferae* by protoplast fusion. *Mol. Gen. Genet.* 191:244-250.
- Potrykus, I. 1973. Transplantation of chloroplasts into protoplasts of *Petunia*. *Z. Pflanzenphysiol.* 70:364-366.
- y Hoffmann, F. 1973. Transplantation of nuclei into protoplasts of higher plants. *Z. Pflanzenphysiol.* 69:287-289.
- ; Jia, J.; Lázár, G. B. y Saul, M. 1984. *Hyoscyamus muticus* + *Nicotiana tabacum* fusion hybrids selected via auxotroph complementation. *Plant Cell Reports* 3:68-71.
- Power, J. B.; Cummins, S. E. y Cocking, E. C. 1970. Fusion of isolated plant protoplasts. *Nature* 225:1016.
- ; Frearson, E. M.; Hayunard, C.; George, D.; Evans, P. K.; Berry, S. F. y Cocking, E. C. 1976. Somatic hybridization of petunia hybrids and *Petunia parodii*. *Nature* 263:500-502.
- Ramulu, K. S.; Dijkhuis, P. y Roest, S. 1983. Phenotypic variation and ploidy level of plants regenerated from protoplasts of tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L. Bintje). *Theor. Appl. Genet.* 65:329-338.

- Rathnam, C. K. M. y Edwards, G. E. 1976. Protoplasts as a tool for isolating functional chloroplasts from leaves. *Plant Cell Physiol.* 17:177-186.
- Rollo, F.; Galli, M. G. y Parisi, B. 1981. Liposome-mediated transfer of DNA to carrot protoplasts; A biochemical and autoradiographic analysis. *Plant Sci. Lett.* 20:347-354.
- Saul, M. W. y Potrykus, P. 1984. Species repetitive DNA used to identify interspecific somatic hybrids. *Plant Cell Reports* 3:65-67.
- Schieder, O. 1980. Somatic hybrids of *Datura innoxia* Mill x *Datura discolor* Beruh. and of *Datura innoxia* Mill x *Datura stramonium* L. var. Tatule. *Mol. Gen. Genet.* 179:387-390.
- . 1982. Somatic hybridization: a new method for plant improvement. En: Scowcroft, W. R. y Frey, K. J. (eds.). *Plant improvement and somatic cell genetics.* Academic Press, Nueva York. p. 239-253.
- Secor, G. A. y Shepard, J. F. 1981. Variability of protoplast-derived potato clones. *Crop Science* 21:102-105.
- Senda, M.; Morikawa, H.; Katagi, H.; Takada, T. y Yamada, Y. 1980. Effect of temperature on membrane fluidity and protoplast fusion. *Theor. Appl. Genet.* 57:33-35.
- Shepard, J. F.; Bidney, D. y Shalin, N. 1980. Potato protoplasts in crop improvement. *Science* 208:17-24.
- Shimamoto, K. y King, P. J. 1983. Isolation of a histidine auxotroph of *Hyoscyamus muticus* during attempts to apply BUdR enrichment. *Mol. Gen. Genet.* 189:69-72.
- Sidorov, V. A.; Mencil, L. y Maliga, P. 1981a. Isoleucin-requiring *Nicotiana* plant deficient in threonin deaminase. *Nature* 294:87-88.
- ; Mencil, L.; Nagy, F. y Maliga, P. 1981b. Chloroplast transfer in *Nicotiana* based on metabolic complementation between irradiated and iodoacetate treated protoplasts. *Planta* 152:341-345.
- Smillie, R. M.; Melchers, G. y von Wettstein, D. 1979. Chilling resistance of somatic hybrids of tomato and potato. *Carlsberg Res. Commun.* 44:127-132.
- Spano, L. y Constantino, P. 1982. Regeneration of plants from callus cultures of roots induced by *Agrobacterium rhizogenes* on tobacco. *Z. Pflanzenphysiol.* 106:87-92.
- Strauss, A.; Bucher, F. y King, P. J. 1981. Isolation of biochemical mutants using haploid mesophyll protoplasts of *Hyoscyamus muticus*; 1: A NO₃⁻ nonutilizing clone. *Planta* 153:75-80.
- Suzuki, M. y Takebe, I. 1978. Uptake of double-stranded bacteriophage DNA by isolated tobacco leaf protoplasts. *Z. Pflanzenphysiol.* 87:297-311.

- Sybinga, J. 1983. Genetic manipulation in plant breeding: Somatic versus generative. *Theor. Appl. Genet.* 66:179-201.
- Szabados, L. y Dudits, D. 1980. Fusion between interphase and mitotic plant protoplasts: Induction of premature chromosome condensation. *Exp. Cell. Res.* 127:442-446.
- ; Hadlaczy, Gy y Dudits, D. 1981. Uptake of isolated plant chromosomes by plant protoplasts. *Planta* 151:141-145.
- Szoka, F. y Papahadjopoulos, D. 1978. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. *Proc. Natl. Acad. Sci. (E.U.)* 74:4194-4198.
- Teoulé, E. 1983. Hybridation somatique entre *Medicago sativa* L. et *Medicago falcata* L. *C. R. Acad. Sc. Paris* 297 Série 111:13-16.
- Thomas, E.; King, P. J. y Potrykus, I. 1979. Improvement of crop plants via single cells *in vitro*: An assessment. *Z. Pflanzenzuchtung.* 82:1-30.
- ; Bright, S. W. J.; Franklin, J.; Lancaster, V. A.; Mifflin, B. J. y Gibson, R. 1982. Variation amongst protoplast-derived potato plants (*Solanum tuberosum* cv. Maris Bard). *Theor. Appl. Genet.* 62:65-68.
- Uchimiya, H. 1982. Somatic hybridization between male sterile *Nicotiana tabacum* and *N. glutinosa* through protoplast fusion. *Theor. Appl. Genet.* 61:69-72.
- y Harada, H. 1981. Transfer of liposome-sequestering plasmid DNA into *Daucus carota* protoplasts. *Plant Physiol.* 68:1027-1030.
- ; Ohgawara, T.; Kato, H.; Akiyama, T.; Harada, H. y Sugiura, M. 1983. Detection of two different nuclear genomes in parasexual hybrids by ribosomal RNA gene analysis. *Theor. Appl. Genet.* 64:117-118.
- Ueda, K.; Tan, K.; Sato, F. y Yamada, Y. 1978. Phagocytosis in plant protoplasts. *Cell Structure and Function* 3:25-30.
- Van Larebeke, N.; Engler, G.; Holsters, M.; van den Elsacker, S.; Zaenen, I.; Schilperoort, R. A. y Schell, J. 1974. Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall inducing ability. *Nature* 252:169-170.
- Vasil, I. K. 1983. Regeneration of plants from single cells of cereal and grasses. En: Lurquin, P. F. y Kleinhofs, R. (eds.). *Genetic engineering in eukaryotes*. Plenum Publ. Corp. p. 233-252.
- Wallin, A.; Glimelius, K. y Eriksson, T. 1974. The induction of aggregation and fusion of *Daucus carota* protoplasts by polyethylene glycol. *Z. Pflanzenphysiol.* 74:64-80.
- ; ——— y ———. 1978. Enucleation of plant protoplasts by cytochalasin. *Z. Pflanzenphysiol.* 87:333-340.

- Wenzel, G.; Schieder, O.; Przewozny, T.; Sopory, S. K. y Melchers, G. 1979. Comparison of single cell culture derived *Solanum tuberosum* L. plants and a model for their application in breeding programs. Theor. Appl. Genet. 55:49-55.
- Wullems, G. J.; Molendijk, L.; Ooms, G. y Schilperoort, R. A. 1981. Retention of tumor markers in F1 progeny plants from in vitro induced octopine and nopaline tumor tissues. Cell 24:719-727.
- Zachrisson, A. y Bornmann, C. H. 1984. Application of electric field fusion in plant tissue culture. Physiol. Plant. 61:314-320.
- Zelcer, A.; Aviv, D. y Galun, E. 1978. Interspecific transform of cytoplasmic male sterility by fusion between protoplasts of normal *Nicotiana glauca* and X-ray irradiated protoplasts of male sterile *N. glauca*. Z. Pflanzenphysiol. 90:397-407.
- Zimmermann, U. 1982. Electric field-mediated fusion and related electrical phenomena. Biochim. Biophys. Acta 694:227-277.
- y Scheurich, P. 1981. High frequency fusion of plant protoplasts by electric fields. Planta 151:26-32.