

UTILIZACIÓN DE PLANTAS PUENTE EN EL MEJORAMIENTO DEL COMPLEJO *Calibrachoa* – *Petunia*

USE OF BRIDGING PLANTS FOR THE IMPROVEMENT OF THE COMPLEX *Calibrachoa* – *Petunia*

Víctor José Milicia^{1a*}, María Fabiana Rodríguez^{1b}, Juan Carlos Hagiwara^{2a}, María Silvina Soto^{2b}

^{1a} Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Lomas de Zamora, Ruta provincial N° 4 y Juan XXXIII, (B1832) Lomas de Zamora, Buenos Aires, Argentina <https://orcid.org/0000-0003-1450-1570>

^{1b} Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Lomas de Zamora, Ruta provincial N° 4 y Juan XXXIII, (B1832) Lomas de Zamora, Buenos Aires, Argentina <https://orcid.org/0000-0003-0256-7134>

^{2a} Instituto de Floricultura, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Nicolas Repetto y De los Reseros, (B1712) Hurlingham, Buenos Aires, Argentina <http://orcid.org/0000-0003-1472-9516>

^{2b} Instituto de Floricultura, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Nicolas Repetto y De los Reseros, (B1712) Hurlingham, Buenos Aires, Argentina <https://orcid.org/0000-0002-0407-9567>

* Autor para correspondencia E-mail: victormilicia@hotmail.com

RESUMEN

La técnica de hibridación a través de plantas puentes, utiliza cruzamientos indirectos o intermedios como instrumento para cruzar parentales con diferente nivel de ploidía. El objetivo de este trabajo fue obtener híbridos que puedan ser utilizados como puentes en cruzamientos con especies ornamentales del género *Petunia* y/o *Calibrachoa*. Lo anterior permite sortear las barreras de incompatibilidad que surgen cuando la hibridación es directa entre especies. Para la obtención de híbridos se realizaron cruzamientos dirigidos entre: *P. integrifolia*, *P. inflata*, *P. interior* y *P. axillaris* subespecie *axillaris*; con *C. linoides*, *C. ovalifolia*, *C. thymifolia*, *C. caesia*, *C. x hybrida* var. *Kabloom blue* y *C. x hybrida* var. *Kabloom yellow*. El primer paso fue la detección de combinaciones putativas, para lo cual se comparó la tasa de fructificación definida como la formación de frutos cada 10 cruzamientos intergenéricos, encontrando resultados variables para cada combinación. Se obtuvo una planta híbrida entre *P. inflata* x *C. x hybrida* 'Kabloom yellow', en que los estudios morfológicos, de viabilidad del polen y meióticos confirman su naturaleza. Con el híbrido puente obtenido se realizaron cruzamientos recíprocos con todas de las especies de *Petunia* y *Calibrachoa* involucradas, obteniendo 31 plantas híbridas que comparten características morfológicas de ambos géneros en las combinaciones con *P. inflata* y *P. integrifolia*. La identificación de cruzamientos intergenéricos con alto porcentaje de fructificación abre una ventana para futuros estudios sobre el desarrollo de los embriones híbridos. Esto permitirán conocer el momento oportuno para aplicar técnicas de rescate embrionario con el objeto de aumentar el número de plantas híbridas puentes.

Palabras clave: polen, plantas ornamentales, mejoramiento, meiosis, plantas nativas.

ABSTRACT

The hybridization technique through bridging plants uses indirect or intermediate crosses as an instrument to cross parents with different levels of ploidy. The objective of this work is to obtain hybrids that can be used as bridges in crosses with ornamental species of the genus *Petunia* and/or *Calibrachoa*. This can overcome the incompatibility barriers that arise when hybridization is direct between species. To obtain hybrids, directed crosses were carried out between: *P. integrifolia*, *P. inflata*, *P. interior* and *P. axillaris* subspecies *axillaris*; with *C. linoides*, *C. ovalifolia*, *C. thymifolia*, *C. caesia*, *C. x hybrida* var. Kabloom blue and *C. x hybrida* var. Kabloom yellow. The first step was the detection of putative combinations. In order to do so, the fruiting rate, which was defined as the formation of fruits every 10 intergeneric crosses, was compared, and variable results were found for each combination. A hybrid plant was obtained between *P. inflata* x *C. x hybrida* 'kabloom yellow', where morphological, pollen viability and meiotic studies confirm its nature. With the bridge hybrid obtained, reciprocal crosses were carried out with all of the *Petunia* and *Calibrachoa* species involved, obtaining 31 hybrid plants sharing morphological characteristics of both genera in combinations with *P. inflata* and *P. integrifolia*. The identification of intergenetic crosses with a high fruiting rate opens doors for future studies on the development of hybrid embryos. This would allow determining the optimum time to apply embryo rescue techniques in order to increase the number of hybrid bridging plants.

Key words: pollen, ornamental plants, breeding, meiotic, native plants.

INTRODUCCIÓN

En los cultivos ornamentales la hibridación interespecífica e intergenérica es considerada como el recurso más importante para la obtención de variación genética (Afkhani-Sarvestani et al., 2012). En efecto, los cruzamientos interespecíficos fueron herramientas básicas en programas de mejoramiento de cultivos, tales como *Rosa*, *Chrysanthemum*, *Lilium*, *Gladiolus*, *Delphinium*, *Antirrhinum*, *Hippeastrum* y *Bougainvillea*, entre otros (Datta, 2019). Si bien la hibridación se presenta como una técnica utilizada en mejoramiento, la obtención de híbridos interespecíficos, y en mayor medida intergenéricos, ha estado muchas veces limitada por diferentes barreras de incompatibilidad (De Souza et al., 2017), las cuales han sido identificadas primero y superadas después produciendo exitosamente germoplasma mejorado (Perschina y Trubacheeva, 2017).

Particularmente la familia Solanaceae ha sido muy estudiada en aspectos vinculados con las barreras de incompatibilidad para la obtención de numerosos híbridos interespecíficos e intergenéricos (Milicia et al, 2016; Cremona et al., 2018; Piosik et al., 2019; Cara et al., 2019). Para el mejoramiento genético del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), se utilizaron géneros vinculados a la especie que fueron hibridizados exitosamente con la utilización de diferentes técnicas, como polinización en estado de botón floral y cultivo *in vitro* de embriones (Sharma et al., 2019). Asimismo, en la hibridación entre *Nierembergia* y *Calibrachoa*, estudios de compatibilidad

estigma-estilo-grano de polen permitieron la utilización de técnicas para superar barreras de incompatibilidad precigóticas logrando identificar padres putativos para la obtención de híbridos (Milicia et al., 2016).

Otra herramienta útil para superar barreras de incompatibilidad consiste en la utilización de plantas puente (Khrustaleva y Kik, 2000; Jansky y Hamernik, 2009). Esta técnica utiliza un híbrido obtenido entre los géneros de interés para ser empleado como parental en cruzamientos futuros con especies de ambos géneros que en forma directa son incompatibles, y que generalmente presentan diferente nivel de ploidía. Dicha técnica fue utilizada exitosamente en el mejoramiento de *Solanum tuberosum* L., *Tulipa gesneriana* L., *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertner y *Allium cepa* L., entre otras especies de interés (Estrada, 1990; Van Eijk et al., 1991; Wang et al., 2002; Messmer et al., 2015). Los antecedentes de trabajos sobre hibridación intergenérica a través de plantas puente, plantean dicha herramienta como una posibilidad para conjugar características favorables de los géneros *Petunia* ($2n=2x=14$) y *Calibrachoa* ($2n=2x=18$) (Chu et al., 2014). En este marco, el primer paso a realizar es el estudio de la compatibilidad entre los géneros en la búsqueda de al menos una combinación que genere híbridos fértiles para ser utilizados como plantas puentes en cruzamientos con el resto de las especies.

Otro de los aspectos importantes a considerar en cruzamientos interespecíficos o intergenéricos es el relativo a las similitudes genómicas entre las especies parentales. En el híbrido se van a encontrar los genomas de ambas especies,

y durante la profase meiótica se darán los procesos de apareamiento y recombinación entre cromosomas homeólogos (parcialmente homólogos), que posteriormente aparecerán asociados formando quiasmas en metafase-I. El nivel de apareamiento homeólogo entre los géneros *Petunia* y *Calibrachoa* va a depender de las relaciones evolutivas entre ellos. Así, es más frecuente que se produzca transferencia e introgresión entre especies que comparten altos niveles de similitud (Ortega albero, 2018; Ferrari et al., 2019). Otro paso necesario para que el proceso de transferencia se produzca con éxito es la formación de gametos funcionales. Normalmente los híbridos son estériles debido a las aberraciones meióticas que llevan a la formación de gametos aneuploides y/o desequilibrios en su dotación cromosómica. La producción de polen fértil depende de procesos fisiológicos y bioquímicos controlados genéticamente donde disrupciones en la diferenciación del tejido esporógeno, en la meiosis, en el desarrollo de las micrósporas y del polen pueden resultar en la esterilidad masculina del híbrido puente (Mendes Bonato et al., 2007; Díaz et al., 2015). Sin embargo, existen mecanismos de formación de gametos genéticamente equilibrados que hacen que la tasa de fertilidad no sea completamente nula. Una manera de analizar la afinidad genómica en los híbridos puente es la inferencia de relaciones entre complementos cromosómicos básicos en base al grado de su sinapsis (apareamiento cromosómico) y es generalmente estudiado en la metafase I meiótica, en células madre del polen del híbrido. En estos estudios, se considera que los cromosomas que aparean entre sí se encuentran relacionados mientras que los que no se reconocen serían más distantes (Grusz et al., 2017). Sobre esta base, los cromosomas pueden considerarse homólogos, parcialmente homólogos (homeólogos) o no homólogos. La posibilidad de hibridación, por lo tanto, es una medida indirecta del grado de relación genómica entre las especies parentales. El análisis del comportamiento meiótico de los híbridos puente putativos determinan el número y los tipos de asociaciones cromosómicas (uni, bi, tri, tetravalentes, etc.) y las irregularidades que se presentan en las células estudiadas, constituye una valiosa herramienta para esclarecer las relaciones filogenéticas y taxonómicas, haciendo valiosos aportes al conocimiento de los mecanismos de aislamiento reproductivo y modos de especiación en estas plantas.

El objetivo de este trabajo fue obtener y estudiar híbridos intermedios que puedan ser utilizados como puentes para cruzar especies de *Petunia* y *Calibrachoa* que no se cruzan en forma directa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cruzamientos intergenéricos

Para la obtención de híbridos fueron realizados cruzamientos intergenéricos dirigidos entre cuatro especies correspondientes al género *Petunia*: *P. integrifolia* (Hook.) Schinz & Thell, *P. inflata* R.E. Fr, *P. interior* Ando & Hashim y *P. axillaris* subespecie *axillaris* (Lam.) Britton et al., y cuatro especies correspondientes al género *Calibrachoa*: *C. linoides* (Hook.), *C. ovalifolia* (Miers) Stehmann & Semir, *C. thymifolia* (A. St.-Hill.) Stehmann & Semir y *C. caesia* (Sendth.) Wijsmann, y dos variedades comerciales *C. x hybrida* var. *Kabloom blue* y *C. x hybrida* var. *Kabloom yellow*, como parentales para la obtención de híbridos que puedan ser evaluados como puente.

Para cada combinación evaluada se efectuaron al menos 10 cruzamientos, utilizando las especies de *Petunia* como parentales femeninos y las especies de *Calibrachoa* como parentales masculinos debido a que presentan compatibilidad unilateral (Olschowski et al., 2012). Los cruzamientos se llevaron a cabo utilizando gineceos provenientes de botones florales emasculados y polen fresco. La emasculación fue realizada previa a la polinización. Los botones florales fueron abiertos con una pinza, extrayendo las anteras conjuntamente con la corola. El polen, extraído de flores en antesis del progenitor masculino, fue inmediatamente depositado sobre el estigma. La polinización fue realizada durante el mediodía.

La compatibilidad entre cada combinación fue evaluada a través de la Tasa de Fructificación (TF) definida como el porcentaje de frutos obtenidos cada diez flores polinizadas. Como testigos se utilizaron cruzamientos intraespecíficos compatibles. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba de diferencia de proporciones basadas en la distribución exacta del estadístico de Fisher, según corresponde con el paquete estadístico Infostat (Di Rienzo et al., 2008). Las pruebas estadísticas que mostraron valor $P < 0,05$ fueron consideradas como estadísticamente significativas.

Los cruzamientos se realizaron en los invernaderos del Instituto de Floricultura del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Hurlingham (34°36' Sur, 58°40' Oeste) durante la primavera-verano del año 2018-2019.

Para la siembra de las semillas obtenidas en los cruzamientos mencionados se realizó un tratamiento con ácido giberélico (100 mg L⁻¹) durante 12 horas y luego se sembraron con sustrato desinfectado a base de turba:perlita:vermiculita (2:1:1) en contenedores de 8 cm de diámetro. Una vez formadas las plántulas fueron trasplantadas a macetas de 10 cm de diámetro con el mismo tipo de sustrato.

Descripción de híbridos y evaluación de fertilidad del polen

Se realizó el conteo de semillas germinadas a los 25 días, los híbridos obtenidos fueron cultivados en invernáculos. Alcanzado el estado de floración se describieron morfológicamente y se estudió la fertilidad de las plantas mediante la observación de granos de polen abortados. Para el recuento de la cantidad de polen abortado y no abortado fue realizada una tinción diferencial (Alexander, 1969). Para el análisis se colectaron granos de polen provenientes de flores en estado de anthesis. Los mismos fueron colocados sobre un porta-objeto con una gota de la solución de tinción durante 15 minutos. La esterilidad del polen está asociada a granos de polen teñidos de color verde claro y la viabilidad a granos de polen teñidos de color rojo. El porcentaje de polen fértil se determinó sobre un total de 400 granos.

Estudios de cromosomas meióticos

Para los estudios de meiosis en las plantas híbridas, se recolectaron botones florales de 3 mm de longitud. Inmediatamente después de su recolección, el material biológico fue fijado en una solución de etanol a 96° y ácido acético glacial 3:1 v/v, y conservado en la misma solución en la heladera (5°C). Posteriormente los botones florales fueron colocados en microtubos con una solución de ácido acético 45% durante 30 minutos, para luego colocarlos en porta-objetos donde se aislaron las anteras bajo lupa trinocular (marca Biotraza modelo XTD-317T, Buenos Aires, Argentina). Las anteras se tiñeron con una gota de colorante orceína 2%, para posteriormente machacarlas con un mango macizo de metal de 5 mm de diámetro por 10 cm de largo para separar las células madres de las micrósporas y eliminar el tejido de la cubierta. El producto de las anteras machacadas y teñidas se cubrió con un cubre-objetos. Seguidamente el porta-objeto con la preparación se calentó durante 30 segundos con un calentador a base de alcohol, cuidando de no llegar a la ebullición del preparado. Luego se procedió a su aplastado manual. Los meiocitos se analizaron en diacinesis, metafase uno y anafase uno. El estudio de comportamiento meiótico se llevó a cabo en 40 células. Se tomaron microfotografías a las células meióticas a través de un microscopio óptico binocular (marca Biotraza modelo NLCD-307B, Buenos Aires, Argentina) acoplado en forma integral con una cámara táctil.

Cruzamientos puentes

Con los híbridos obtenidos se realizaron cruzamientos con el resto de las especies involucradas durante el año 2020, utilizando los materiales híbridos como parentales masculinos y

femeninos. Dichos cruzamientos se realizaron con la misma metodología descrita anteriormente, se observó la tasa de fructificación y la germinación de las semillas obtenidas.

RESULTADOS

Tasa de fructificación en cruzamientos intergenéricos

La tasa de fructificación definida como la formación de frutos cada 10 cruzamientos intergenéricos realizados mostró resultados variables para cada combinación. La tasa de fructificación se expresa en porcentaje:

Cruzamientos utilizando *Petunia integrifolia* como parental femenino

Los mejores resultados se obtuvieron de los cruzamientos *P. integrifolia* x *C. caesia*, *P. integrifolia* x *C. x hybrida* 'Kabloom yellow' y 'Kabloom blue', donde no se mostraron diferencias significativas con el testigo, presentando un 80% de tasa de fructificación en la primera combinación y 100% de tasa de fructificación en las dos últimas (Tabla 1) (Fig. 1). La combinación de *P. integrifolia* x *C. thymifolia* presentó diferencias significativas con el testigo, presentando un 50% de tasa de fructificación (Tabla 1) (Fig. 1).

No se obtuvo producción de frutos en la combinación de *P. integrifolia* x *C. ovalifolia* y *P. integrifolia* x *C. linoides* por lo que la tasa de fructificación expresada en porcentaje fue 0%, en comparación con la combinación utilizada como testigo de *P. integrifolia* x *P. integrifolia* donde la tasa de fructificación fue de 100% (Tabla 1).

Cruzamientos utilizando *Petunia inflata* como parental femenino

En las combinaciones de *P. inflata* x *C. x hybrida* 'Kabloom yellow', *P. inflata* x *C. x hybrida* 'Kabloom blue' y *P. inflata* x *C. caesia* no se encontraron diferencias significativas con el testigo, debido a que la tasa de fructificación fue de 100% en los primeros dos casos y 90% en el tercero (Tabla 1) (Fig. 2).

El cruzamiento de *P. inflata* x *C. thymifolia* presentó diferencias significativas con el testigo, presentando un 40% de tasa de fructificación (Tabla 1).

No se produjo formación de frutos en las combinaciones de *P. inflata* x *C. ovalifolia* y *P. inflata* x *C. linoides*, por lo que el porcentaje de tasa de fructificación fue 0% en comparación con la combinación utilizada como testigo de *P. inflata* x *P. inflata* donde el porcentaje de tasa de fructificación fue 100% (Tabla 1).

Tabla 1. Tasa de fructificación (porcentaje de frutos obtenidos cada diez flores polinizadas) en cruzamientos dirigidos utilizando *Petunia integrifolia* (Hook.) Schinz & Thell, *Petunia inflata* R.E. Fr II y *Petunia interior* Ando & Hashim como parental femenino.

Table 1. Fruiting rate (percentage of fruits obtained for every ten pollinated flowers) in directed crosses using *Petunia integrifolia* (Hook.) Schinz & Thell, *Petunia inflata* R.E. Fr II and *Petunia interior* Ando & Hashim as female parent.

<i>P. integrifolia</i> x <i>C. ovalifolia</i>	0% a
<i>P. integrifolia</i> x <i>C. linoides</i>	0% a
<i>P. integrifolia</i> x <i>C. thymifolia</i>	50% a
<i>P. integrifolia</i> x <i>C. caesia</i>	80% b
<i>P. integrifolia</i> x <i>C. x hybrida yellow</i>	100% b
<i>P. integrifolia</i> x <i>C. x hybrida blue</i>	100% b
<i>P. integrifolia</i> x <i>P. integrifolia</i>	100% b
<i>P. inflata</i> x <i>C. ovalifolia</i>	0% a
<i>P. inflata</i> x <i>C. linoides</i>	0% a
<i>P. inflata</i> x <i>C. thymifolia</i>	40% a
<i>P. inflata</i> x <i>C. caesia</i>	90% b
<i>P. inflata</i> x <i>C. x hybrida yellow</i>	100% b
<i>P. inflata</i> x <i>C. x hybrida blue</i>	100% b
<i>P. inflata</i> x <i>P. inflata</i>	100% b
<i>P. interior</i> x <i>C. ovalifolia</i>	0% a
<i>P. interior</i> x <i>C. linoides</i>	0% a
<i>P. interior</i> x <i>C. thymifolia</i>	0% a
<i>P. interior</i> x <i>C. caesia</i>	100% b
<i>P. interior</i> x <i>C. x hybrida yellow</i>	100% b
<i>P. interior</i> x <i>C. x hybrida blue</i>	80% b
<i>P. interior</i> x <i>P. interior</i>	100% b

Letras diferentes indican diferencias significativas según análisis de proporciones por el estadístico Fisher ($p < 0,05$).

Cruzamientos utilizando *Petunia axillaris* como parental femenino

La producción de frutos para los cruzamientos de *P. axillaris* con *C. ovalifolia*, *C. linoides*, *C. thymifolia*, *C. caesia* y *C. x hybrida* 'Kabloom yellow' y 'Kabloom blue' fue nula en comparación con la combinación utilizada como testigo de *P. axillaris* x *P. axillaris*, por lo que el porcentaje de tasa de fructificación fue 0%.

Cruzamientos utilizando *Petunia interior* como parental femenino

Los mejores resultados se obtuvieron de los cruzamientos *P. interior* x *C. caesia*, *C. x hybrida* 'Kabloom yellow' y 'Kabloom blue' donde no se encontraron diferencias significativas con el testigo de *P. interior* x *P. interior*, presentando un 100% de tasa de fructificación en los primeros dos casos y 80% en el tercero (Fig. 3).

Para las combinaciones de *P. interior* x *C. ovalifolia*, *C. linoides* y *C. thymifolia* no se observó desarrollo de frutos (Tabla 1).

Obtención de plantas híbridas

Producto de la siembra de las semillas conseguidas en los cruzamientos intergenéricos mencionados, se obtuvo una única plántula híbrida en la combinación de *P. inflata* x *C. x hybrida* 'Kabloom yellow'.

Descripción morfológica del híbrido puente y sus parentales

El híbrido obtenido entre *Petunia* y *Calibrachoa* (HPC) presenta las siguientes características morfológicas: hierba anual de hasta de 40 cm de alto, erecta al inicio del desarrollo luego presenta ramificaciones basales con tallos decumbentes y ascendentes; tallos cilíndricos,



Fig. 1. Formación de frutos en especies nativas de *Petunia* utilizadas en los cruzamientos intergenéricos. a- *Petunia integrifolia* x *Calibrachoa thymifolia*. b- *Petunia integrifolia* x *Calibrachoa caesia*. c- *Petunia integrifolia* x *Calibrachoa x hybrida* 'kabloom yellow'.

Fig. 1. Fruit formation in native *Petunia* species used in intergeneric crosses. a- *Petunia integrifolia* x *Calibrachoa thymifolia*. b- *Petunia integrifolia* x *Calibrachoa caesia*. c- *Petunia integrifolia* x *Calibrachoa x hybrida* 'kabloom yellow'.



Fig. 2. Formación de frutos en especies nativas de *Petunia* utilizadas en los cruzamientos intergenéricos. a- Frutos de *Petunia inflata* x *Calibrachoa caesia*. b- Fruto con dehiscencia de *Petunia inflata* en cruzamiento testigo (*P. inflata* x *P. inflata*). Aumento: barra = 4 ml

Fig. 2. Fruit formation in native *Petunia* species used in intergeneric crosses. a- Fruits of *Petunia inflata* x *Calibrachoa caesia*. b- Fruit with dehiscence of *Petunia inflata* in control cross (*P. inflata* x *P. inflata*). Increase: bar = 4 ml



Fig. 3. Formación de frutos en especies nativas de *Petunia* utilizadas en los cruzamientos intergenéricos. a- Frutos con dehiscencia de *Petunia interior* x *Calibrachoa caesia*. b- Fruto inmaduro de *Petunia interior* x *Calibrachoa hybrida* 'kabloom yellow'. Aumento: barra = 3 ml
Fig. 3. Fruit formation in native *Petunia* species used in intergeneric crosses. a- Fruits with dehiscence of inner *Petunia* x *Calibrachoa caesia*. b- Immature fruit of *Petunia interior* x *Calibrachoa x hybrida* 'kabloom yellow'. Increase: bar = 3 ml

glanduloso-pilosos. Hojas basales con pecíolo de hasta 15 mm, tornándose más cortos o sésiles hacia el ápice; láminas de 34-55 x 15-35 mm, elípticas, angostamente-elípticas u ovadas, ápice agudo, base atenuada, decurrente formando un falso pecíolo, densamente glandular-pilosa, membranácea, con nervadura primaria evidente, secundarias poco evidentes. Flores axilares con pedicelos de 28-33 mm, ascendentes, glandular-pilosos; cáliz formado por cinco sépalos con lóbulos de 8-10 x 2 mm, verdosos, linear-oblongos, ápice obtuso, glandular-piloso; corola de 25-30 mm de longitud, acampanulada-infundibuliforme, ligeramente zigomorfa, purpúrea, con garganta purpúrea-clara hacia el interior del tubo, algo reticulada, limbo de 28-33 mm de diámetro, con lóbulos suborbiculares, ápices obtusos; filamentos adnatos 2,5-4,5 mm a la base de la corola, el menor de 7-10 mm, el par mediano de 11-13 mm y el par mayor de 12-15 mm, anteras de 1-1,5 mm, abriéndose completamente, polen amarillo; ovario de 1.8-2,2 mm, cónico, estilo de 9-11 mm, estigma dilatado, obcónico (Fig. 4 y 5).

El híbrido HPC presenta características morfológicas compartidas con *Petunia inflata* y *Calibrachoa x hybrida* 'Kabloom yellow'. Los rasgos correspondientes a *Petunia* refieren a características del vástago, color de flor púrpura y su tamaño, hábito de crecimiento herbáceo con ciclo anual en clima templado. Por otro lado, se observa características del género *Calibrachoa* en

lo referente a las anteras de color amarillo los estambres adnatos a la corola y los lóbulos de la corola con ápice obtuso.

Estudios de viabilidad de polen en híbridos

La tinción de los granos de polen del híbrido HPC mostró un 5% de granos de polen viables, teñidos de color rojo y un 95% de polen abortado teñido de color verde. Por otro lado, las especies parentales del híbrido, *P. inflata* y *C. x hybrida* 'Kabloom yellow', mostraron 96% y 94% de granos de polen viables teñidos de color rojo. Esto se debe a que, dentro de los componentes de esta solución, el colorante verde de malaquita tiñe específicamente la pared celular, mientras el ácido fucsínico penetra las células vivas y colorea el citoplasma de rojo. El polen abortado aparece de color verde ya que sólo retiene su pared celular, al tiempo que los granos de polen viables presentan además una coloración rojiza en su interior (Fig. 6).

Estudios de cromosomas meióticos del híbrido intergenérico HPC

El apareamiento cromosómico en la meiosis del híbrido fue irregular en las 40 células analizadas. Se observaron univalentes y bivalentes heteromórficos en distintas combinaciones encontrando 7 células con 7 bivalentes y 2 univalentes, 7 células con 4 bivalentes y 8 univalentes y 18 células con 6 bivalentes y 4 univalentes. Otro tipo de irregularidad meiótica



Fig. 4. Morfología del híbrido entre *Petunia* y *Calibrachoa* (HPC). a- Vástago con flores. b y d- Detalle de la flor. c- Planta cultivada en cantero al aire libre. Aumento: barra = 20 ml

Fig. 4. Morphology of the *Petunia* and *Calibrachoa* hybrid (HPC). a- Stem with flowers. b and d- Flower detail. c- Plant cultivated in flowerbed outdoors. Increase: bar = 20 ml

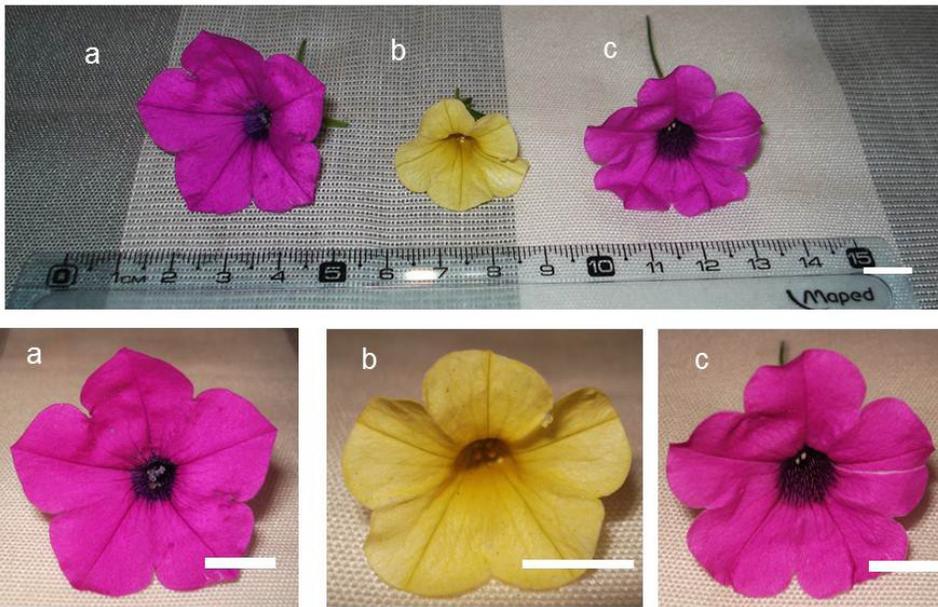


Fig. 5. Características morfológicas de la flor del híbrido HPC y sus parentales. a- Detalle de la flor de *Petunia inflata*. b- Detalle de la flor de *Calibrachoa hybrida* 'kabloom yellow'. c- Detalle de la flor de HPC. Aumento: barra = 10 ml

Fig. 5. Morphological characteristics of the flower of the HPC hybrid and its parents. a- Detail of the flower of *Petunia inflata*. b- Detail of the flower of *Calibrachoa x hybrida* 'kabloom yellow'. c- Detail of the HPC flower. Increase: bar = 10 ml

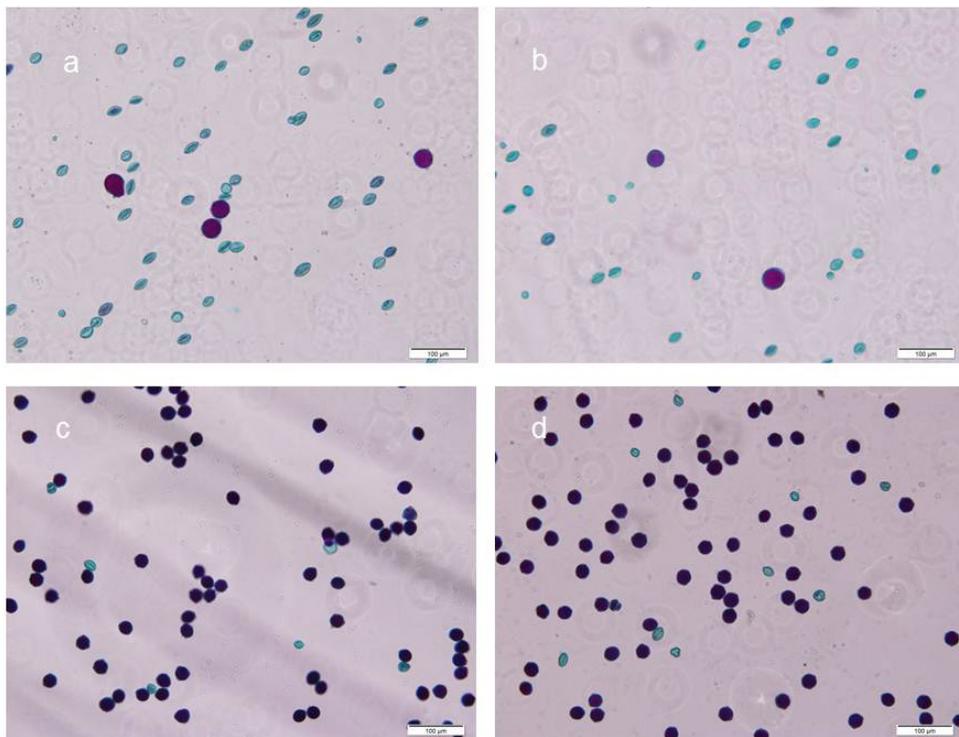


Fig. 6. Tinción de granos de polen por método de Alexander. a y b.- granos de polen del híbrido HPC. c- Granos de polen de tales *Calibrachoa hybrida* 'kabloom yellow'. d- Granos de polen de *Petunia inflata*.

Aumento: barra = 100 µm

Fig. 6. Pollen grain staining by Alexander method. a and b.- pollen grains of the HPC hybrid. c- Pollen grains of such *Calibrachoa x hybrida* 'kabloom yellow'. d- Pollen grains of *Petunia inflata*. Increase: bar = 100 µm

encontrada en 8 meiocitos fue la formación de huso acromático tripolar (Fig. 7).

Cruzamientos puentes con el género *Petunia*

La tasa de fructificación en los cruzamientos puentes mostró resultados variables para cada combinación. La producción de frutos en la combinación de *Petunia integrifolia* y *Petunia inflata* con HPC fue exitosa presentando porcentajes de tasa de fructificación del 90% y 100%, respectivamente. Mientras que no fue exitosa para la combinación de *Petunia axillaris* x HPC y *Petunia interior* x HPC cuyo porcentaje de tasa de fructificación fue 0% (Tabla 2).

Cuando HPC fue utilizado como parental femenino se obtuvieron porcentajes de tasa de fructificación del 70% y 100% para las combinaciones de HPC x *Petunia inflata* y HPC x *Petunia integrifolia*. Por el contrario, no fue exitosa la producción de frutos para la combinación de HPC x *Petunia axillaris* y HPC x *Petunia interior* donde la tasa de fructificación fue 0% (Tabla 3).

Cruzamientos puentes con el género *Calibrachoa*

En los cruzamientos puente entre el híbrido HPC y las distintas especies de *Calibrachoa* involucradas se observaron diferentes resultados en función de la utilización de HPC como parental masculino o femenino.

En las combinaciones de HPC como parental femenino y *Calibrachoa caesia*, *Calibrachoa x hybrida* var. yellow y var. Blue, se obtuvo 100% de tasa de fructificación. Por lo contrario, las combinaciones de HPC con *Calibrachoa ovalifolia*, *Calibrachoa linooides* y *Calibrachoa thymifolia* no obtuvo formación de frutos siendo su tasa de fructificación de 0% (Tabla 4).

El porcentaje de tasa de fructificación fue de 0% para todas las combinaciones de *Calibrachoa* con HPC como parental masculino.

Germinación de semillas obtenidas en cruzamientos puentes

La germinación de las semillas obtenidas en los cruzamientos anteriores mostró resultados variables. Se sembraron 50 semillas por cada

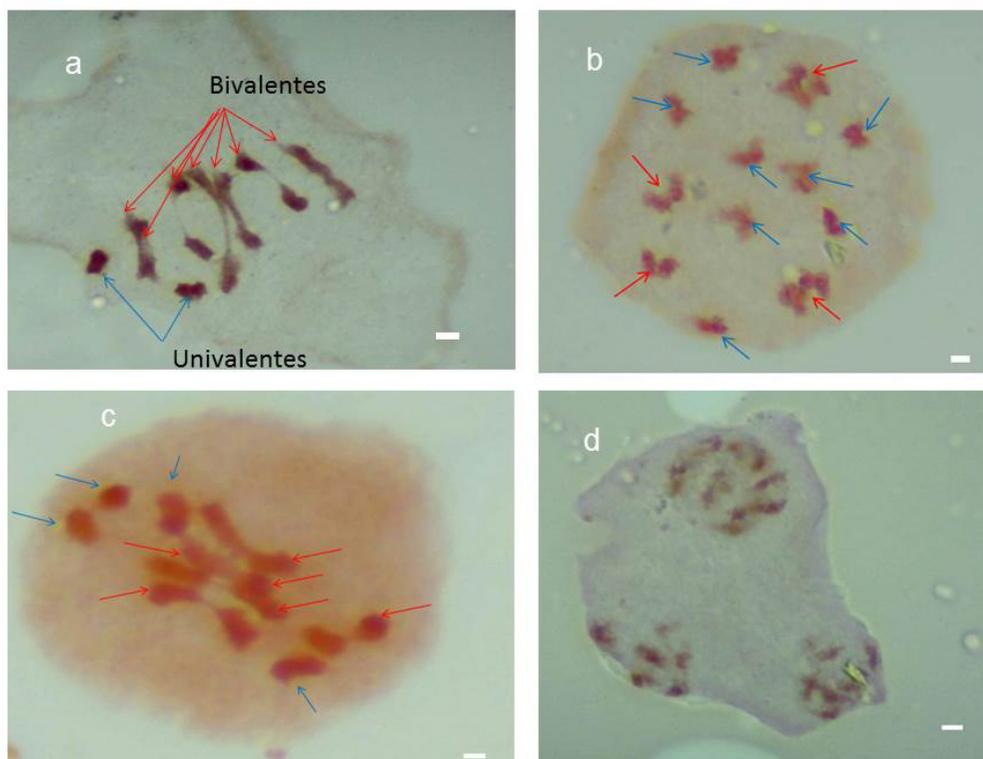


Fig. 7. Irregularidades meióticas en células madres del polen en híbrido entre *Petunia inflata* y *Calibrachoa x hybrida* 'kabloom yellow'. a- 7 bivalentes, 2 univalentes en metafase I. b- 4 bivalentes, 8 univalentes en diacinesis. c- 6 bivalentes, 4 univalentes en metafase I. d- Huso acromático tripolar. Flechas rojas indican bivalentes. Flechas azules indican univalentes. Aumento: barra = 100 µm

Fig. 7. Meiotic irregularities in hybrid pollen stem cells between *Petunia inflata* and *Calibrachoa x hybrida* 'kabloom yellow'. a- 7 bivalent, 2 univalent in metaphase I. b- 4 bivalent, 8 univalent in diakinesis. c- 6 bivalent, 4 univalent in metaphase I. d- tripolar achromatic spindle. Red arrows indicate bivalent. Blue arrows indicate univalents. Increase: bar = 100 µm

Tabla 2. Tasa de fructificación (porcentaje de frutos obtenidos cada diez flores polinizadas) en cruzamientos puentes utilizando el híbrido HPC (*P. inflata* x *C. hybrida* 'Kabloom yellow') como parental masculino con las especies de *Petunia* involucradas.

Table 2. Fruiting rate (percentage of fruits obtained for every ten pollinated flowers) in directed crosses using the HPC bridge hybrid (*P. inflata* x *C. hybrida* 'Kabloom yellow') as a male parent with the *Petunia* species involved.

Cruzamientos puentes	<i>Petunia integrifolia</i>	<i>Petunia inflata</i>	<i>Petunia axillaris</i>	<i>Petunia interior</i>
Híbrido HPC (<i>Petunia inflata</i> x <i>Calibrachoa x hybrida</i> var. Kabloom yellow)	90% a	100% a	0% b	0% b

Letras diferentes indican diferencias significativas según análisis de proporciones por el estadístico Fisher ($p < 0,05$).

Tabla 3. Tasa de fructificación (porcentaje de frutos obtenidos cada diez flores polinizadas) en cruzamientos puentes utilizando el híbrido HPC (*P. inflata* x *C. hybrida* 'Kabloom yellow') como parental femenino con las especies de *Petunia* involucradas.

Table 3. Fruiting rate (percentage of fruits obtained for every ten pollinated flowers) in directed crosses using the HPC bridge hybrid (*P. inflata* x *C. hybrida* 'Kabloom yellow') as a female parent with the *Petunia* species involved.

Cruzamientos puentes	<i>Petunia integrifolia</i>	<i>Petunia inflata</i>	<i>Petunia axillaris</i>	<i>Petunia interior</i>
Híbrido HPC (<i>Petunia inflata</i> x <i>Calibrachoa</i> x <i>hybrida</i> var. Kabloom yellow)	100% a	70% a	0% b	0% b

Letras diferentes indican diferencias significativas según análisis de proporciones por el estadístico Fisher ($p < 0,05$).

Tabla 4. Tasa de fructificación (porcentaje de frutos obtenidos cada diez flores polinizadas) en cruzamientos puentes utilizando el híbrido HPC (*P. inflata* x *C. hybrida* 'Kabloom yellow') como parental femenino con las especies de *Calibrachoa* involucradas.

Table 4. Fruiting rate (percentage of fruits obtained for every ten pollinated flowers) in directed crosses using the HPC bridge hybrid (*P. inflata* x *C. hybrida* 'Kabloom yellow') as a female parent with the *Calibrachoa* species involved.

Cruzamientos puentes	<i>Calibrachoa ovalifolia</i>	<i>Calibrachoa caesia</i>	<i>Calibrachoa linooides</i>	<i>Calibrachoa thymifolia</i>	<i>Calibrachoa hybrida</i> var. yellow	<i>Calibrachoa hybrida</i> var. blue
Híbrido (<i>Petunia inflata</i> x <i>Calibrachoa</i> x <i>hybrida</i> var. Kabloom yellow)	0% b	100% a	0% b	0% b	100% a	100% a

Letras diferentes indican diferencias significativas según análisis de proporciones por el estadístico Fisher ($p < 0,05$).

combinación con tasa de fructificación mayor a cero y se obtuvo germinación y desarrollo de plántulas normales en las combinaciones de HPC x *Petunia integrifolia* donde se obtuvieron 10 plántulas, HPC x *Petunia inflata* se obtuvieron 9 plántulas y *Petunia inflata* x HPC se obtuvieron 12 plántulas (Tabla 5).

Las plantas obtenidas a través de los cruzamientos puentes presentan características morfológicas compartidas con los géneros *Petunia* y *Calibrachoa* (Tabla 6).

DISCUSIÓN

A partir de las 240 combinaciones de taxones ensayadas se obtuvieron frutos en 94 de ellas. La tasa de fructificación en todos los cruzamientos realizados demuestra el variable nivel de compatibilidad intergenérica entre las especies

involucradas de *Petunia* y *Calibrachoa*. Estos resultados indican que, si bien la hibridación intergenérica es una modalidad eficiente para generar variabilidad en el mejoramiento genético de estos géneros, la selección de los cruzamientos putativos adecuados es de gran importancia para la obtención de híbridos (Milicia et al., 2016).

En los cruzamientos entre *Petunia* y *Calibrachoa* el 39% del total de cruzamientos produjo frutos y semillas pero sólo en la combinación de *P. inflata* x *C. x hybrida* 'Kabloom yellow' se obtuvo la germinación y crecimiento de una planta híbrida. Resultados similares se obtienen en el mejoramiento genético de *Elaeis guineensis* Jacq., donde semillas híbridas obtenidas presentan problemas de baja germinación (Cuervo, 2006) o en cruzamientos interespecíficos entre *Solanum melongena* L. con *S. sisymbriifolium* Lam. y *S. torvum* Sw. donde no se desarrollaron embriones viables

Tabla 5. Tasa de fructificación (porcentaje de frutos obtenidos cada diez flores polinizadas) y número de plántulas obtenidas en cruzamientos dirigidos utilizando el híbrido HPC (*P. inflata* x *C. hybrida* 'Kabloom yellow') como parental femenino y masculino.

Table 5. Fruiting rate (percentage of fruits obtained per ten pollinated flowers) and number of seedlings obtained in directed crosses using the HPC hybrid (*P. inflata* x *C. hybrida* 'Kabloom yellow') as female and male parent.

Híbrido HPC como parental femenino			Híbrido HPC como parental masculino		
Cruzamientos puentes	Tasa de fructificación	Plántulas obtenidas	Cruzamientos puentes	Tasa de fructificación	Plántulas obtenidas
HPC x <i>P.integrifolia</i>	100%	10	<i>P. integrifolia</i> x HPC	90%	0
HPC x <i>P.inflata</i>	70%	9	<i>P. inflata</i> x HPC	100%	12
HPC x <i>C. caesia</i>	100%	0	<i>C. caesia</i> x HPC	0%	
HPC x <i>C. x hybrida</i> var. Kabloom yellow	100%	0	<i>C. hybrida</i> var. Kabloom yellow x HPC	0%	
HPC x <i>Calibrachoa x hybrida</i> var. Kabloom blue	100%	0	<i>C. hybrida</i> var. Kabloom blue x HPC	0%	

Tabla 6. Características morfológicas sobresalientes de los géneros *Petunia* y *Calibrachoa* observadas en el híbrido puente HPC (*P. inflata* x *C. hybrida* 'Kabloom yellow') y en las plantas obtenidas por los cruzamientos en que interviene.

Table 6. Main morphological characteristics of the *Petunia* and *Calibrachoa* genera observed in the HPC bridge hybrid (*P. inflata* x *C. hybrida* 'Kabloom yellow') and in the plants obtained by the crosses in which it is involved.

Características morfológicas de <i>Petunia</i>	Características morfológicas presentes en HPC y en las plantas obtenidas por cruzamientos puentes			
	HPC	<i>P. inflata</i> x HPC	HPC x <i>P. integrifolia</i>	HPC x <i>P. inflata</i>
Morfología del tallo y hojas	✓	✓	✓	✓
Flores de color púrpura	✓	✓	✓	✓
Hábito de crecimiento herbáceo	✓	✓	✓	✓
Anteras de color violáceo	x (amarillas)	x (amarillas)	✓	✓
Características morfológicas de <i>Calibrachoa</i>:				
Anteras de color amarillo	✓	✓	x (violáceas)	x (violáceas)
Estambres adnados a la corola	✓	✓	✓	✓
Lóbulos de la corola con ápice obtuso	✓	✓	✓	✓

en forma natural (Plazas et al., 2014). De igual modo, Bugallo (2017) realizando cruzamientos interespecíficos con especies nativas de *Passiflora*, encontró que, de un total de 24 cruzamientos, cinco no lograron producir híbridos por fallas en la germinación de las semillas. De nueve cruzamientos con *P. mooreana* Hook. f. 4x que produjeron semilla, sólo dos germinaron. Este defecto en la germinación denota la existencia de una barrera post-cigótica que puede provenir de diversos orígenes. Uno de ellos es la impronta genómica “genomic imprinting” que produce el “apagado” de una de las copias de varios genes y es fundamental en la función del endosperma para nutrir al embrión (Wolff et al., 2015). Otro, deriva de una falla en la etapa de celularización durante el desarrollo del endosperma que deja sin alimento al embrión. Un tercero se da en híbridos donde se observan endospermas defectuosos, pero este fenómeno ocurre independientemente del modo de desarrollo del endosperma (celular o nuclear) (Wolff et al., 2015).

Con respecto a la viabilidad de los granos de polen en HPC, por medio de métodos colorimétricos, se pueden identificar los granos de polen no viables (coloreados de verde) debido a defectos y/o insuficiencias de citoplasma o de sustancias de reservas. El bajo porcentaje de granos de polen viables se ha reportado tanto en cruzamientos intergenéricos como interespecíficos. Moyle y Graham (2005) al estudiar la base genética de la incompatibilidad de híbridos entre *Lycopersicon esculentum* Mill. y *L. hirsutum* M.F. Dun. encontraron reducción importante en la fertilidad del polen de las plantas híbridas en comparación con la de los progenitores. Híbridos interespecíficos de *Solanum melongena* con otras especies silvestres mostraron baja viabilidad, tal es el caso de híbridos con *S. tomentosum* L., donde el porcentaje de granos de polen viables es de 5,5%, valor similar al obtenido en HPC (Kouassi et al., 2016).

En muchos casos, la esterilidad en los híbridos se debe a los diferentes números de cromosomas mostrados por los padres que conducen a la generación de gametos desequilibrados en los híbridos (Gómez Martínez y Reyes Valdés, 2016). Además, el comportamiento cromosómico meiótico puede afectar la viabilidad del polen. Si la meiosis es irregular y los pares de cromosomas se segregan de manera anormal, se puede esperar esterilidad de polen (Fuchs et al., 2011). Li et al. (2017) demostraron la asociación entre la viabilidad del polen y la constitución cromosómica del híbrido intergenérico en cruzamientos entre *Brassica oleracea* L. y *Sinapis alba* L., donde casi todas las plantas F1 eran altamente masculinas estériles.

De los cruzamientos intergenéricos realizados en este trabajo, se obtiene el híbrido (HPC) utilizado como planta puente entre las especies empleadas dentro de cada género. De manera similar en tomate (*Lycopersicon esculentum*) al usar el híbrido F1 de *L. esculentum* x *L. chilense* como puente, *L. peruviianum* var. *humifusum* se hibridó con éxito con *L. esculentum* (Kalloo, 2012). De igual modo, la hibridación de la especie tetraploide *Solanum stoloniferum* Schlttdl. & Bouché con las especies diploides *S. phureja* Just et Buk., *S. brevidens* Phil., y *S. chacoense* Bitter, las cuales fueron utilizadas como plantas puentes, permitieron incorporar variadas y valiosas resistencias para los cruzamientos posteriores con *S. tuberosum* spp. *tuberosum* ó *S. tuberosum* spp. *Andigena* (Estrada, 1990; Yermishin et al., 2014).

El cruzamiento puente de *P. inflata* x HPC y su recíproco fueron exitosos en la formación de frutos y obtención de plantas híbridas a partir de sus semillas. La combinación de HPC x *P. integrifolia* produjo semillas viables que desarrollaron plantas híbridas cuando HPC fue utilizado como parental femenino. El cruzamiento de *P. integrifolia* x HPC produjeron frutos y semillas pero estas no germinaron, en este sentido, Vesperinas (1995) y Pignone y Gómez-Campo (2011) realizando cruzamientos entre *Eruca sativa* y *Eruca vesicaria* reportó la obtención de frutos y semillas aparentemente viables en ambos sentidos de cruzamiento, pero sólo se logró germinación en aquellas provenientes de los cruzamientos en que *E. sativa* fue utilizada como parental femenino.

Cruzamientos puentes entre HPC x *C. caesia*, *C. x hybrida* var. *yellow* y var. *Blue* produjeron frutos y semillas que no germinaron. Este defecto en la germinación denota nuevamente la posible existencia de una barrera post-cigótica que puede provenir de diversos orígenes como fallas en la impronta genómica o problemas en el desarrollo del endosperma (Wolff et al., 2015). Por otro lado, cruzamientos entre todas las combinaciones de *Calibrachoa* con HPC como parental masculino no mostraron formación de frutos debido a la presencia de compatibilidad unilateral, aspecto similar al encontrado por Olschowski et al. (2012) en cruzamientos entre petunias y calibrachoa comerciales.

CONCLUSIONES

La combinación de *P. inflata* x *C. x hybrida* ‘Kabloom yellow’ permitió la obtención de un híbrido intergenérico que puede utilizarse como planta puente para transferir caracteres entre las especies de los géneros *Petunia* y *Calibrachoa*.

La caracterización morfológica permitió identificar el híbrido que posteriormente fue corroborado por los estudios de viabilidad del polen y meióticos. En este trabajo se puede observar como el híbrido utilizado como puente aumenta el grado de compatibilidad entre ambos géneros, mediante cruzamientos exitosos con *P. inflata* y *P. integrifolia*, donde se obtuvieron 31 plantas híbridas con características morfológicas compartidas con los géneros *Petunia* y *Calibrachoa*.

La identificación de cruzamientos intergenéricos con alto porcentaje de fructificación abre una ventana para futuros estudios sobre el desarrollo de los embriones híbridos, que permitirán conocer el momento oportuno para aplicar técnicas de rescate embrionario con miras a aumentar el número de plantas híbridas puentes.

LITERATURA CITADA

- Afkhami-Sarvestani, R., M. Serek, and T. Winkelmann. 2012. Interspecific crosses within the *Streptocarpus* subgenus *Streptocarpella* and intergeneric crosses between *Streptocarpella* and *Saintpaulia ionantha* genotypes. *Scientia Horticulturae* 148:215-222.
- Alexander, M. P. 1969. Differential staining of aborted and nonaborted pollen. *Stain Technology* 44(3):117-122.
- Bugallo, V. 2017. Aspectos reproductivos, citogenéticos y evolutivos aplicados al mejoramiento en el género *Passiflora* L. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Argentina.
- Chu, Y., J. Pan, A. Wu., R. Cai, and H. Chen. 2014. Molecular cloning and functional characterization of dihydroflavonol-4-reductase gene from *Calibrachoa hybrida*. *Scientia Horticulturae* 165:398-403.
- Cara, N., M. Ferrer, R. Masuelli, E. Camadro, and C. Marfil. 2019. Epigenetic consequences of interploidal hybridisation in synthetic and natural interspecific potato hybrids. *New Phytologist* 222:1981-1993.
- Cremona, G., M. Iovene, G. Festa, C. Conicella, and M. Parisi. 2018. Production of embryo rescued hybrids between the landrace "Friariello" (*Capsicum annuum* var. *annuum*) and *C. baccatum* var. *pendulum*: phenotypic and cytological characterization. *Euphytica* 214(8):1-11.
- Cuervo, P. 2006. Avances en el rescate de embriones en palma de aceite: una herramienta eficiente en material genético de difícil germinación. Corporación Centro de Investigación en Palma de Aceite. Cenipalma N°139.
- Datta, S. 2019. Floriculture work at CSIR-National Research Institute, Lucknow. *Science and Culture* 85:265-274.
- De Souza, E., F. Souza, M. Rossi, M. Pereira de Carvalho Costa, and A. Pinheiro Martinelli. 2017. Interspecific and intergeneric hybridization in Bromeliaceae and their relationships to breeding systems. *Scientia Horticulturae* 223:53-61.
- Díaz, L.G., S. Morales., J. Guerra., y H. Castro. 2015. Detección de la fertilidad y compatibilidad cruzada entre cultivares de *Musa* spp. para la obtención de híbridos comerciales. *Centro Agrícola* 42(4):27-33.
- Di Rienzo, J.A., F. Casanoves, M.G. Balzarini, L. Gonzalez, M. Tablada, y C.W. Robledo. 2008. InfoStat, versión 2008. Grupo InfoStat. FCA. Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.
- Estrada, N. 1990. Híbridos triploides derivados de *Solanum stolonifenum* y su valor en el mejoramiento de la papa. *Revista Latinoamericana de la Papa* 3(1):80-87.
- Ferrari, M., E. Greizerstein, and L. Poggio. 2019. Genome size in three species of *Glandularia* and their hybrids. *Journal of Basic & Applied Genetics* 30(2):47-54.
- Gómez Martínez, M., y M.H. Reyes Valdés. 2016. Irregularidades meióticas en híbridos intergenéricos *Helianthus annuus* L. x *Tithonia rotundifolia* (Mill.) SF Blake. *Revista Fitotecnia Mexicana* 39(2):117-121.
- Fuchs, M.C.P., S.M. De Sousa, I. Sanmartin Gajardo, y L.F. Viccini. 2011. Número de cromosomas en las células meióticas y la viabilidad del polen de *Vanhouttea hilariana* Chautems, *Vanhouttea brueggeri* Chautems y un híbrido interespecífico (Gesneriaceae). Servicio de Publicaciones, Universidad de Murcia. *Anales de Biología* 33:35-40.
- Grusz, A.L., E.M. Sigel, and C. Witherup. 2017. Homoeologous chromosome pairing across the eukaryote phylogeny. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 117:83-94.
- Jansky, S., and A. Hamernik. 2009. The introgression of 2x 1EBN *Solanum* species into the cultivated potato using *Solanum verrucosum* as a bridge. *Genetic Resources and Crop Evolution* 56(8):1107-1115.
- Kaloo, G. (ed.). 2012. Genetic improvement of tomato. Springer Science & Business Media, Berlin/Heidelberg, Germany.
- Khrustaleva, L., and C. Kik. 2000. Introgression of *Allium fistulosum* into *A. cepa* mediated by *A. roylei*. *Theoretical and Applied Genetics* 100:17-26.

- Kouassi, B., J. Prohens, P. Gramazio, A.B. Kouassi, S. Vilanova, S. Galán Ávila, et al. 2016. Development of backcross generations and new interspecific hybrid combinations for introgression breeding in eggplant (*Solanum melongena*). *Scientia Horticulturae* 213:199-207.
- Li, J., C. Zhang, C. Guan. C. Zhang, C. Guan, L. Luo, et al. 2017. Analysis of intergeneric sexual hybridization between transgenic *Brassica oleracea* and *Sinapis alba*. *Euphytica* 213: 271.
- Mendes Bonato, A., M. Pagliarini, and C. Valle. 2007. Meiotic arrest compromises pollen fertility in an interspecific hybrid between *Brachiaria ruziziensis* x *Brachiaria decumbens* (Poaceae: Paniceae). *Brazilian Archives of Biology and Technology* 50(5):831-837.
- Messmer, M., P. Wilbois., C. Baier., F. Schäfer., C. Arncken., D. Drexler., et al. 2015. Técnicas de mejora vegetal. Sociedad Española de Agricultura Ecológica, Valencia, España.
- Milicia, V., A. Coviella, M. Soto, y Á. Chiesa. 2016. Mejoramiento de plantas nativas sudamericanas: altas temperaturas como herramienta para superar barreras precigóticas en el complejo *Calibrachoa-Nierembergia*. *Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences* 32(2):85-93.
- Moyle, L., and E. Graham. 2005. Genetics of hybrid incompatibility between *Lycopersicon esculentum* and *L. hirsutum*. *Genetics* 169(1):355-373.
- Ortega Albero, N. 2018. Análisis del modelo de segregación cromosómica del mandarino Moncada tetraploide. Tesis de grado en Biotecnología. Universidad Politécnica de Valencia, España.
- Olschowski, S., L. Meyer., V. Mubmann., and M. Serek. 2012. Investigation of crossing barriers between *Calibrachoa* and *Petunia* species. pp. 765-769. In II All Africa Horticulture Congress 1007. South Africa.
- Perzhina, L., and N. Trubacheeva. 2017. Interspecific incompatibility in the wide hybridization of plants and ways to overcome it. *Russian Journal of Genetics: Applied Research* 7:358-368.
- Pignone, D., and C. Gómez-Campo. 2011. *Eruca*. p. 149-160. In *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources* Springer, Berlin, Germany.
- Piosik, L., M. Ruta-Piosik, M. Zenkteler, and E. Zenkteler. 2019. Development of interspecific hybrids between *Solanum lycopersicum* L. and *S. sisymbriifolium* Lam. via embryo calli. *Euphytica* 215:31.
- Plazas, M., S. Vilanova, I. Andújar, P. Gramazio, A. Rodríguez-Burruezo, E. Moreno, et al. 2014. Obtención de híbridos interespecíficos de berenjena con especies silvestres relacionadas. Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana, Universidad Politécnica de Valencia. Disponible en https://scholar.google.es/scholar?lookup=0&q=Obtenci%C3%B3n+de+h%C3%ADbridos+interespec%C3%A9dicos+de+berenjena+con+especies+silvestres+relacionadas&hl=es&as_sdt=0,5. (Consulta 06 mayo 2020).
- Sharma, P., S. Thakur, and R. Negi. 2019. Recent advances in breeding of tomato—a review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 8(3):1275-1283.
- Van Eijk, J., L. Van Raamsdonk, W. Eikelboom, and R. Bino. 1991. Interspecific crosses between *Tulipa gesneriana* cultivars and wild *Tulipa* species: a survey. *Sexual Plant Reproduction* 4(1):1-5.
- Vesperinas, E. S. 1995. Diferencias morfológicas e interfertilidad entre las especies arvenses *Eruca vesicaria* (L) Cav. y *E. sativa* Miller. p. 153-156. En *Actas Sociedad Española de Malherbología*. Congreso 1995. Huesca. España.
- Wang, Y., R. Scarth, and C. Campbell. 2002. Interspecific hybridization between *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn. and *F. esculentum* Moench. *Fagopyrum* 19:31-35.
- Wolff, P., H. Jiang, G. Wang, J. Santos-Gonzalez, and C. Köhler. 2015. Paternally expressed imprinted genes establish postzygotic hybridization barriers in *Arabidopsis thaliana*. *Elife* 4:10074.
- Yermishin, A., Y. Polyukhovich., E. Voronkova., and A. Savchuk (2014). Production of hybrids between the 2EBN bridge species *Solanum verrucosum* and 1EBN diploid potato species. *American Journal of Potato Research* 91(6):610-617.