

Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ciencias Naturales

Maestría en Ciencias Biológicas

Interacción polen-pistilo en dos especies de *Physalis* (Solanaceae)

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de

Maestra en Ciencias Biológicas

Presenta

Fátima Ojeda Flores

Dirigida por:

Dra. Mahinda Martínez y Díaz de Salas

Querétaro, Qro.

Agosto 2024

La presente obra está bajo la licencia:
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:



Atribución — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



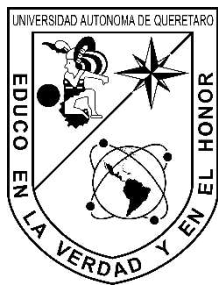
SinDerivadas — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Maestría en Ciencias Biológicas

Interacción polen-pistilo en dos especies de *Physalis* (Solanaceae)

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de

Maestra en Ciencias Biológicas

Presenta

Fátima Ojeda Flores

Dirigida por:

Dra. Mahinda Martínez y Díaz de Salas

Dra. Mahinda Martínez y Díaz de Salas
Presidente

Dra. Lislí Solís Montero
Secretario

Dra. Ofelia Vargas Ponce
Vocal

Dra. Olga Lidia Gómez Nucamendi
Suplente

Dr. Luis Gerardo Hernández Sandoval
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.

Agosto, 2024

México

A mi esposo, por su incondicional apoyo, amor y cariño

Gracias por todo

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Querétaro por continuar dándome la oportunidad para mi formación académica. A Conachyt que me brindo una beca para poder llevar a cabo este posgrado.

A LaniVeg por permitirme hacer uso del microscopio de fluorescencia que se encuentra en la Facultad de Ciencias Naturales.

A la Dra. Mahinda Martínez por darme la oportunidad de ser una de sus estudiantes y brindarme todo su apoyo con lo que hiciera falta para llevar a cabo este proyecto. Gracias por su tiempo, confianza y el gran asesoramiento que me dio.

A la Dra. Lislí por aceptar ser parte de mi comité y la guía que me brindo para llevar a cabo correctamente la parte experimental y estadística de mi proyecto. Fue una buena decisión integrarla a mi proyecto.

A la Dra. Ofelia por aceptar ser parte de mi comité, brindarme material y su asesoramiento en este proyecto.

A la Dra. Olga por apoyarme en el microscopio de fluorescencia, gracias por tu tiempo y paciencia para sacar las fotos.

Al Dr. Luis Hernández porque gracias a él sigo trabajando con polen, gracias por creer y confiar en mí y seguir asesorándome desde la licenciatura.

Al laboratorio de Botánica por siempre abrirme sus puertas.

A mi buen amigo Alan Herrera, por apoyarme mucho brindándome semillas de *Physalis*, orientarme a llevar a cabo la tinción de azul de anilina para el microscopio de fluorescencia, corregir mi traducción de inglés y por más cosas. Gracias infinitas.

A mis amigas del herbario por siempre escuchar mis quejas y frustraciones, pero sobre todo por las buenas risas y momentos. Las quiero mucho.

Por último, quiero agradecer a mis compañeros de la maestría, porque siempre nos brindamos apoyo. Fue un gusto coincidir.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	iii
ÍNDICE	iv
ÍNDICE DE CUADROS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
RESUMEN.....	viii
ABSTRACT	ix
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
2.1 Interacción polen-pistilo.....	3
2.1.1 Adhesión del polen al estigma	3
2.1.2 Hidratación y germinación del polen.....	3
2.1.3 Crecimiento del tubo polínico a través del estigma y el estilo	4
2.2 Sistemas de autoincompatibilidad	5
2.2.1 Ventajas y desventajas de un sistema autoincompatible	6
2.3 La familia Solanaceae y el género <i>Physalis</i>	8
2.3.1 <i>Physalis cinerascens</i> (Dunal) Hitchc.....	9
2.3.2 <i>Physalis nicandroides</i> Schltdl.....	9
2.4 Autoincompatibilidad en el género <i>Physalis</i>	10
2.5 Observación del crecimiento del tubo polínico a través de microscopía de fluorescencia.....	11
III. HIPÓTESIS	12
IV. OBJETIVOS	13
V. METODOLOGÍA	14
5.1 Material vegetal	14
5.2 Crecimiento de las plantas.....	14
5.3 Fenología de la floración y relación polen/óvulo	15
5.4 Experimento de cruce artificial y producción de frutos	16
5.5 Interacción polen-pistilo.....	17
5.6 Análisis estadísticos	17

VI. RESULTADOS	19
6.1 Fenología de la floración y relación polen/óvulo	19
6.2 Interacción polen-pistilo.....	22
6.3 Experimento de cruce artificial y producción de frutos	24
VII. DISCUSIÓN	27
7.1 Fenología de la floración y relación polen/óvulo	27
7.2 Interacción polen-pistilo.....	28
7.3 Experimento de cruce artificial y producción de frutos	29
VIII. CONCLUSIONES	32
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Datos de colecta de las semillas de <i>P. cinerascens</i> y <i>P. nicandroides</i>	14
Cuadro 2. Número de granos de polen, óvulos y relación polen/óvulo (P/O) $\pm$ error estándar en <i>P. cinerascens</i> y <i>P. nicandroides</i>	21
Cuadro 3. Producción de frutos maduros y promedio de semillas $\pm$ error estándar de los cinco tratamientos aplicados a dos especies de <i>Physalis</i> . Entre paréntesis, el número de las flores a las que se le aplicó el tratamiento y frutos a las que se les contó las semillas.	24

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Etapas de la interacción del polen con el pistilo. Modificado de Hiscock & Allen (2008).	4
Figura 2. Sistema de autoincompatibilidad gametofítica. Cuando el alelo S del polen es similar a los alelos del pistilo, el crecimiento del tubo polínico es inhibido (pistilo incompatible). Si al menos un alelo S del polen es diferente a los alelos del pistilo la mitad de los granos de polen serán compatibles (pistilo semi-compatible). El tubo polínico crece y llega a los óvulos cuando los alelos S del polen son diferentes a los del pistilo (pistilo compatible). Modificado de Silva & Goring (2001).	7
Figura 3. Sistema de autoincompatibilidad esporofítica. Los pistilos con los alelos S1S2 y S1S3 son incompatibles porque coinciden con los alelos del polen y la germinación del tubo polínico se detienen en el estigma. El pistilo S3S4 es compatible con los alelos alelos S del polen porque son diferentes, el tubo polínico crece y llega hasta los óvulos. Modificado de Silva & Goring (2001).	8
Figura 4. Aislamiento de flores para los tratamientos de cruce artificial con bolsas de tul y papel glassine en ambas especies.	18
Figura 5. Etapas de la fenología de floración en <i>P. cinerascens</i> . A) flor inaperturada, B-C) corola comienza su apertura, D) corola totalmente extendida con dos anteras dehiscentes, E) corola totalmente extendida con cinco anteras dehiscentes, F) flor senescente.	20
Figura 6. Etapas de la fenología de la floración en <i>P. nicandroides</i> . A) botón floral, B) flor al comienzo de su apertura con tres anteras dehiscentes, C) flor totalmente extendida con cinco anteras dehiscentes, D) flor senescente.	21
Figura 7. Imagen al microscopio de fluorescencia con filtro DAPI, de la interacción polen-pistilo en <i>P. cinerascens</i> . A) autopolinización manual por geitonogamia después de 96 h. B) y C) autopolinización manual por geitonogamia después de 120 h. D) Acercamiento a los tubos polínicos en C. CA= calosa; E= estigma; TE= tejido del estigma. Flechas rojas: señalan los granos de polen; flechas blancas: señalan los tubos polínicos.	22
Figura 8. Imagen al microscopio de fluorescencia con filtro DAPI, de la interacción polen-pistilo en <i>P. nicandroides</i> . A) polinización por geitonogamia después de 24 h. B-C) polinización por geitonogamia después de 48 h. D) polinización por geitonogamia después de 72 h. BE= base del estilo; E= estigma; TE= tejido del estigma; OV= óvulos. Flechas rojas: señalan los granos de polen; flechas blancas: señalan los tubos polínicos.	23
Figura 9. Frutos de <i>P. cinerascens</i> , A) fruto maduro, B) fruto inmaduro. La escala equivale a 1 cm.	25
Figura 10. Frutos de <i>P. nicandroides</i> . A) Fruto maduro, B) fruto abortado. La escala equivale a 1 cm.	26

RESUMEN

Las angiospermas han desarrollado sistemas de autoincompatibilidad para favorecer la polinización cruzada para que exista variabilidad genética y evitar los efectos negativos por la endogamia. La familia Solanaceae presenta un sistema de autoincompatibilidad gametofítica, que impide el crecimiento del tubo polínico hacia los óvulos en el estilo. Esta familia incluye muchas especies agrícolas con importancia económica; por ejemplo, el género *Physalis* (tomate de cáscara) tiene un amplio uso en la alimentación mexicana. Dos miembros de este género *P. cinerascens* y *P. nicandroides* tienen diferentes usos en la alimentación y medicina. Se conoce que *P. cinerascens* requiere de polinizadores para la producción de frutos y de *P. nicandroides* no se tienen estudios al respecto. El objetivo de este trabajo fue conocer como ocurre la interacción polen-pistilo en estas dos especies para determinar si son plantas autoincompatibles o compatibles. En ambas especies se analizó la fenología floral a través de observaciones de apertura y senescencia floral, se evaluó la relación polen/óvulo y tiempo de la receptividad del estigma. Para conocer la interacción polen-pistilo las flores se polinizaron por geitonogamia (el polen proviene de otra flor del mismo individuo), los pistilos se colectaron pasadas 24, 48 y 72 h después de la polinización y se analizaron a través de microscopia de fluorescencia con tinción de azul de anilina. Además, se hicieron diferentes cruza artificiales para evaluar el tipo de polinización que presentan las plantas y se evaluó el porcentaje de fructificación y promedio de semillas. Ambas especies presentan una fenología floral diferente de acuerdo a su sistema de polinización. Se determinó que *P. cinerascens* es autoincompatible porque rechaza granos de polen de la misma planta, presenta un sistema de apareamiento de xenogamia y solo produce frutos a través de polinizaciones cruzadas con poblaciones diferentes. *Physalis nicandroides* es autocompatible, presenta el sistema de apareamiento autógamo facultativo y es capaz de producir frutos por autopolinización y polinización cruzada, pero en esta última con una producción baja en frutos y semillas. Se concluye que dentro del género *Physalis* existen diferentes estrategias reproductivas, comprender estos mecanismos ayudaría a mejorar los cultivos de especies agrícolas con importancia económica.

Palabras clave: autoincompatibilidad, *Physalis cinerascens*, *Physalis nicandroides*.

ABSTRACT

Angiosperms have developed self-incompatibility systems to promote cross-pollination to ensure genetic variability and prevent the negative effects of inbreeding. The Solanaceae family presents the gametophytic self-incompatibility system that prevents the growth of the pollen tube towards the ovules in the style. This family includes many agricultural species of economic importance, such as the genus *Physalis* (husk tomato), which has extensive use in Mexican cuisine. Two members of this genus, *P. cinerascens* and *P. nicandroides*, have different uses as food and medicine. It is known that *P. cinerascens* requires pollinators for fruit production, whereas there are no studies regarding *P. nicandroides*. This work aimed to understand the pollen-pistil interaction in these two species to determine if they exhibit self-incompatibility. In both species, floral phenology was analyzed from floral opening to senescence, and the pollen/ovule ratio and stigma receptivity were evaluated. Flowers were subjected to geitonogamous pollinations to assess the pollen-pistil interaction, and pistils were collected at 24, 48, and 74 hours after pollination and analyzed using fluorescence microscopy with the aniline blue staining technique. Additionally, different artificial crosses were performed to evaluate the pollination type the plants have, and the percentage of fruits and average seed production were evaluated. Both species exhibit different floral phenology and pollination systems. *Physalis cinerascens* is self-incompatible, blocking pollen grains from the same plant, and exhibits an outcrossing mating system, producing fruits only through cross-pollination with different populations. *P. nicandroides* is self-compatible, with a facultative autogamous mating system, capable of producing fruits through both self-pollination and cross-pollination, with low fruits and seed production in cross-pollination. It is concluded that there are different reproductive strategies within the genus *Physalis*. Understanding these mechanisms would improve the cultivation of economically important agricultural species.

Keywords: self-incompatibility, *Physalis cinerascens*, *Physalis nicandroides*.

I. INTRODUCCIÓN

Para la producción de frutos y semillas de las plantas es necesario que exista fecundación entre los gametos sexuales, previo a esto ocurre la interacción entre el polen y el pistilo. Este proceso consta de diferentes pasos, desde la captura y adhesión de polen al estigma hasta la formación del tubo polínico (Hiscock & Allen, 2008). Existen dos tipos de incompatibilidad, esporofítica (SSI) y gametofítica (GSI), cuando el grano de polen es compatible el tubo polínico llega a los óvulos de las flores, pero cuando existe incompatibilidad la germinación del tubo polínico es interrumpida en el estilo (GSI) o no germina desde el estigma (SSI). La mayoría de las plantas con flor, han desarrollado sistemas de incompatibilidad con la finalidad de evitar los efectos negativos de la depresión por endogamia y favorecer el entrecruzamiento de polen entre diferentes individuos (Franklin-Tong & Franklin, 2003a; Heslop-Harrison, 1975). La familia Solanaceae presenta el sistema de autoincompatibilidad gametofítica (Franklin-Tong & Franklin, 2003b; Mccubbin & Kao, 2000). Este sistema es controlado por un locus S polimórfico multialélico en el genotipo del gametofito masculino haploide (Hiscock et al., 2003). Los estudios que se han hecho en el género *Physalis* demuestran que hay especies autoincompatibles (AI) y compatibles (AC), pero algunas presentan plasticidad y pasan de AI a AC (Pretz & Smith, 2022, 2023).

Al igual que muchas especies de la familia Solanaceae, el género *Physalis* tiene importancia económica (Martínez *et al.*, 2017; Santiaguillo & Blas, 2009). *Physalis cinerascens* (Dunal) Hitchc. es una planta perenne que se desarrolla en diferentes tipos de vegetación (M. Martínez, 2020) tiene uso comestible, medicinal e industrial (Santiaguillo & Blas, 2009). Para la producción de frutos, esta planta necesita de polinizadores (Sullivan, 1984). Mientras que *P. nicandroides* Schltdl. es una planta anual y crece en diferentes tipos de vegetación y zonas perturbadas (Martínez, 2020), presenta diferentes usos y se le ha dado relevancia por presentar witanólidos que tienen un efecto citotóxico en células de cáncer de mama (Lugo, 2020; Torres et al., 2019). Se desconoce su sistema de apareamiento, según Martínez (comunicación personal, 2022), fructifica en invernaderos excluido de polinizadores por lo que podría ser una especie autocompatible.

El objetivo de este trabajo fue conocer como ocurre el proceso de interacción polen-pistilo en *P. cinerascens* y *P. nicandroides* así como determinar si son plantas AI o AC través de la

técnica de microscopía de fluorescencia con el fin de observar el crecimiento del tubo polínico, cruces artificiales para evaluar la fructificación y observaciones de la fenología floral. Se espera que este trabajo de investigación contribuya al estudio de los sistemas de autoincompatibilidad en la familia Solanaceae.

II. ANTECEDENTES

2.1 Interacción polen-pistilo

En las angiospermas o plantas con flor un paso muy importante en la reproducción es la polinización. Este proceso consta de varios pasos sucesivos desde la captura y adhesión del polen al estigma, hidratación y germinación para producir el tubo polínico hasta la entrada de este tubo polínico al óvulo y la descarga de las células espermáticas (Fig. 1) (Hiscock & Allen, 2008; Wheeler et al., 2001). Los pistilos se componen de tres estructuras: el estigma, el estilo y el ovario, los cuales juegan un papel importante al momento de que el grano de polen comienza a germinar (Herrero & Hormaza, 1996; Swanson et al., 2004).

2.1.1 Adhesión del polen al estigma

Para el inicio de la polinización es necesario que el grano de polen logre adherirse efectivamente a la superficie del estigma. Dicha superficie llega a ser diferente por la presencia o ausencia de exudados y se han clasificado dos tipos de estigmas: húmedos y secos (Wang et al., 2010; Wheeler et al., 2001). Los estigmas húmedos tienen la particularidad de que el polen queda atrapado rápidamente por la tensión superficial, las secreciones son de tipo lipídicas o acuosas ricas en carbohidratos (Hiscock & Allen, 2008), hay varias familias que presentan este tipo de estigma, entre estas se encuentra la familia Solanaceae (Heslop-Harrison & Shivanna, 1977). Se considera que la hidratación del polen y su adhesión en este tipo de estigmas es pasiva y se encuentra regulada por la disponibilidad de las secreciones en la superficie del estigma (Swanson et al., 2004). En estigmas secos al no tener secreción como los húmedos, la adhesión del polen ocurre a través de la pared polínica, la familia Brassicaceae presenta estigmas secos y hay varios estudios en *Brassica*, *Raphanus* y *Arabidopsis* (Hiscock & Allen, 2008). Por ejemplo, en los estudios que se han hecho en *Brassica* demuestran que una vez que el polen está en contacto con el estigma, la capa del polen se extruye desde la exina hacia la superficie del estigma y se forma un “pie” el cual parece pegar el polen al estigma (Elleman & Dickinson, 1986).

2.1.2 Hidratación y germinación del polen

Los granos de polen cuando se encuentran en el ambiente están inactivos y desecados. En el momento en que éstos llegan al estigma es donde ocurre la hidratación. Los mecanismos de hidratación son diferentes en las angiospermas debido a la superficie del estigma y a la capa

externa del polen. Ambas características son importantes para la hidratación del polen (Wang et al., 2010). Se ha descrito que las cadenas largas de lípidos del estigma promueven señales que estimulan la hidratación y de igual manera las proteínas que se encuentran en la capa externa del polen, como la acuaporina, son esenciales (Wheeler et al., 2001).

2.1.3 Crecimiento del tubo polínico a través del estigma y el estilo

Cuando el tubo polínico logra atravesar el estigma, el crecimiento continúa a través de todo el tejido del estilo hasta llegar a los óvulos (Herrero & Hormaza, 1996). El ovario y los óvulos se encuentran distantes del estigma por lo cual el tubo polínico absorbe nutrientes del tejido del estilo, varios modelos *in vitro* demuestran que los gradientes de agua a través de una matriz lipídica ya sea los derivados del exudado del estigma o de la capa del polen determinan la polaridad en la cual el tubo polínico va a germinar (Swanson et al., 2004). Se ha identificado que existe todo un complejo de señalización de diversas proteínas y moléculas que guían e inducen el crecimiento del tubo polínico en su trayecto del estilo hasta los óvulos (Broz & Bedinger, 2021; Zheng et al., 2018).

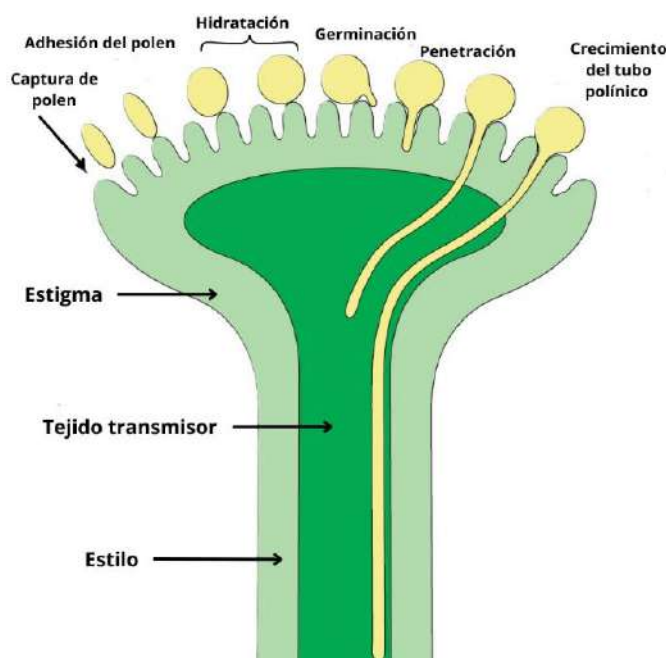


Figura 1. Etapas de la interacción del polen con el pistilo. Modificado de Hiscock & Allen (2008).

2.2 Sistemas de autoincompatibilidad

Muchas angiospermas han desarrollado sistemas de autoincompatibilidad, con el fin de evitar la endogamia y permitir el flujo de genes. Este sistema regula la aceptación o el rechazo de polen a través del reconocimiento en el estigma de la flor. Cuando el polen comparte los mismos alelos que el estigma, éste es rechazado (Franklin-Tong & Franklin, 2003b, 2003a). Se estima que cerca del 60% de las angiospermas presentan autoincompatibilidad (Hiscock & Kües, 1999).

Un sistema eficiente autoincompatible, al momento de recibir granos de polen genéticamente idénticos serán reconocidos y la misma planta reaccionará inhibiendo el crecimiento del tubo polínico en alguna etapa de la interacción entre el polen y el pistilo. Cuando un grano de polen es compatible, con alelos diferentes al pistilo, no tendrá dificultad para fecundar a los óvulos (Franklin-Tong & Franklin, 2003b, 2003a; Heslop-Harrison, 1975).

Existen dos grandes sistemas de autoincompatibilidad: esporofítica (SSI) y gametofítica (GSI). La incompatibilidad del polen en SSI se encuentra controlado por el genotipo diploide parental, el esporofito (Fig. 3) y en GSI es controlado por el propio genotipo haploide (Fig. 2). Estos sistemas de autoincompatibilidad funcionan a través de diferentes mecanismos moleculares controlado por un locus *S* polimórfico multialélico (Hiscock et al., 2003). El sistema SSI se ha estudiado mucho en la familia Brassicaceae pero también se encuentra en otras seis familias: Asteraceae, Betulaceae, Caryophyllaceae, Convolvulaceae, Caryophyllaceae, Sterculiaceae y Polemoniaceae (Hiscock et al., 2003). Mientras que el sistema GSI se ha identificado en miembros de la familia Solanaceae, Rosaceae, Scrophulariaceae, Campanulaceae y Papaveraceae (Franklin-Tong & Franklin, 2003b, 2003a; Mccubbin & Kao, 2000).

En el sistema de autoincompatibilidad esporofítica se han encontrado dos genes polimórficos que se expresan en el estigma en el locus *S*. Uno de estos genes es una glicoproteína (SLG) la cual es secretada en la superficie del estigma (Nasrallah et al., 1985), el otro gen es un receptor quinasa (SRK) que atraviesa la membrana plasmática del estigma (Stein et al., 1991). SRK funciona como receptor del determinante *S* del estigma lo cual provoca una cascada de señalización en la membrana plasmática lo que conlleva al rechazo de polen propio (Takayama et al., 2000). Los determinantes en el grano de polen son dos genes

similares uno de ellos denominado SCR (proteína rica en cisteína) por Schopfer et al. (1999) y SP11 (proteína 11 del locus *S*) por Takayama et al. (2000), estos codifican para una proteína que se encuentra en toda la cubierta del polen. SCR/SP11 interactúa con SRK en el estigma y al no ser compatibles se rechaza el grano de polen (Schopfer et al., 1999; Takayama et al., 2000).

En el sistema de autoincompatibilidad gametofítica se han identificado dos mecanismos moleculares que actúan de diferente manera. Uno de ellos es a través de S-RNasas (citotoxinas específicas de alelos) las cuales se expresan en el tejido del estilo. Cuando el grano de polen es incompatible este logra germinar a través del estigma y comienza a crecer en el estilo, pero no llega más allá de un tercio del camino porque las S-RNasas logran degradar el tubo polínico (Broz & Bedinger, 2021; Franklin-Tong & Franklin, 2003b, 2003a). El determinante del locus *S* del polen es una proteína llamada F-box (SLF), esta proteína ofrece resistencia a todas las S-RNasas excepto a aquella S-RNasa que comparte el mismo haplotipo *S* (Kubo et al., 2010; Sijacic et al., 2004). Este mecanismo se ha estudiado en la familia Solanaceae (*Nicotiana*, *Petunia*, *Solanum* y *Lycopersicon*), Campanulaceae (*Campanula*), Rosaceae (*Prunus*, *Pyrus*, *Malus*) (Franklin-Tong & Franklin, 2003b, 2003a) y recientemente en *Citrus* (Rutaceae) (Liang et al., 2020). El otro mecanismo se ha investigado en la familia Papaveraceae en la especie *Papaver rhoeas*. Los estudios demostraron que es una interacción receptor-ligando en donde ocurre toda una cascada de señalización cuando interacciona el alelo *S* del polen con su proteína *S* estigmática (las cuales aún se desconocen) esto involucró un aumento intracelular de Ca^{2+} lo que provocó la inhibición del tubo polínico en uno a dos minutos (Franklin-Tong et al., 1993, 2002).

2.2.1 Ventajas y desventajas de un sistema autoincompatible

La depresión endogámica es la pérdida de aptitud biológica o fitness y ocurre cuando existe la pérdida de variación genética debido a que hay entrecruzamiento de individuos genéticamente similares (Charlesworth & Charlesworth, 1987). Los efectos negativos son la pérdida en el rendimiento reproductivo y la viabilidad de las semillas (Charlesworth & Charlesworth, 1987; Hokanson & Hancock, 2000). Para contrarrestar esto, las plantas desarrollaron los sistemas de autoincompatibilidad, previniendo la autofecundación y la endogamia (Franklin-Tong & Franklin, 2003b, 2003a; Hiscock et al., 2003). Las ventajas de

la autoincompatibilidad es que promueve el entrecruzamiento de individuos en una población (Fujii et al., 2016), pero puede tener sus desventajas cuando en el entorno hay escasez de polen, lo cual puede ser una estrategia evolutivamente no favorable (Vallejo-Marín & Uyenoyama, 2004).

La pérdida y fragmentación de áreas naturales representa una desventaja, debido a que la interacción que ocurre entre las plantas y los insectos se ve alterada, lo que conlleva a una limitación de polen cruzado en las plantas. Se ha demostrado que aquellas plantas que presentan un sistema de incompatibilidad se ven afectadas por esta fragmentación de hábitat, debido a que requieren de polen cruzado y esto se obtiene, en muchas ocasiones, por polinizadores (Aguilar et al., 2006; Eckert et al., 2010). Debido a estos cambios constantes en los hábitats naturales, es importante conocer los sistemas de incompatibilidad que tienen las plantas para crear estrategias de conservación (Aguilar et al., 2006). Así mismo, se debe estudiar las bases genéticas y moleculares en los sistemas de autoincompatibilidad en diferentes familias, para comprender como es que las plantas pueden discriminar entre granos de polen propios y no propios durante la fertilización (Takayama & Isogai, 2005).

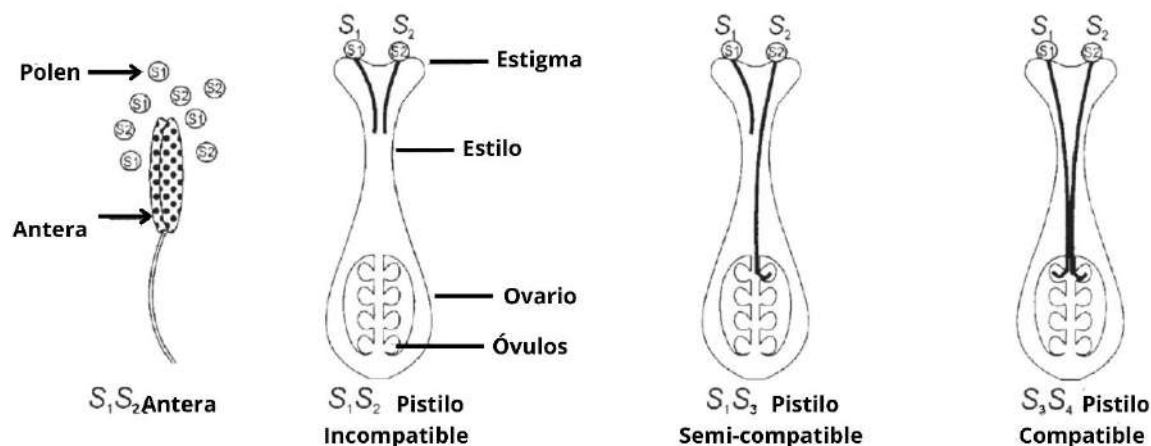


Figura 2. Sistema de autoincompatibilidad gametofítica. Cuando el alelo S del polen es similar a los alelos del pistilo, el crecimiento del tubo polínico es inhibido (pistilo incompatible). Si al menos un alelo S del polen es diferente a los alelos del pistilo la mitad de los granos de polen serán compatibles (pistilo semi-compatible). El tubo polínico crece y llega a los óvulos cuando los alelos S del polen son diferentes a los del pistilo (pistilo compatible). Modificado de Silva & Goring (2001).

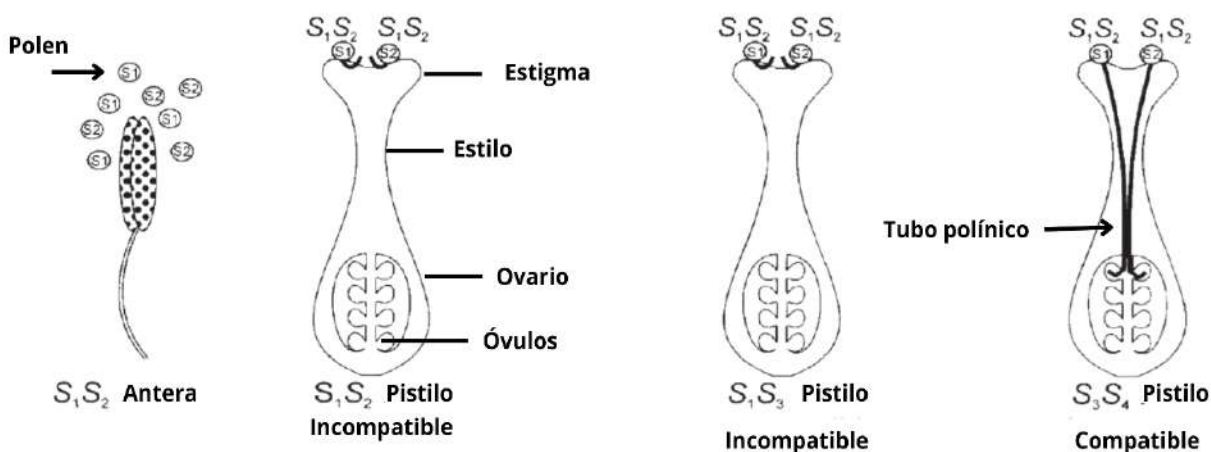


Figura 3. Sistema de autoincompatibilidad esporofítica. Los pistilos con los alelos S_1S_2 y S_1S_3 son incompatibles porque coinciden con los alelos del polen y la germinación del tubo polínico se detienen en el estigma. El pistilo S_3S_4 es compatible con los alelos alelos S del polen porque son diferentes, el tubo polínico crece y llega hasta los óvulos. Modificado de Silva & Goring (2001).

2.3 La familia Solanaceae y el género *Physalis*

El género *Physalis* se encuentra dentro de la familia Solanaceae, en esta familia se encuentran muchas plantas agrícolas con importancia económica como el jitomate (*Solanum lycopersicon*), el chile (*Capsicum* spp.), la papa (*Solanum tuberosum*), el tabaco (*Nicotiana tabacum*) y el tomate de cáscara (*Physalis* spp.) (Martínez et al., 2017; Santiaguillo & Blas, 2009). También hay plantas de uso ornamental por ejemplo las plantas conocidas como dama de noche (*Petunia hybrida* o *Brunfelsia undulata*) y huele de noche (*Cestrum nocturnum*); de uso medicinal como *Atropa belladonna* y especies tóxicas como *Datura stramonium* y *Nierembergia liniifolia* (Martínez et al., 2017).

El género *Physalis* cuenta con 90 especies, tiene una amplia distribución en el territorio mexicano con alrededor de 61 especies (Martínez et al., 2023). Se encuentra en todos los tipos de vegetación, en altitudes desde 0 a 3000 msnm (Martínez et al., 2017).

Se tienen registros de que el tomate de cáscara se ha usado durante mucho tiempo en la alimentación mexicana, para la elaboración de salsas y diversos platillos (Santiaguillo & Blas, 2009; Vargas-Ponce et al., 2015). Hay registro de al menos 18 especies silvestres las cuales se usan en la alimentación y en medicina tradicional en diferentes zonas del país (Santiaguillo & Blas, 2009). De estas, solo dos especies son cultivadas, *P. philadelphica* y *P. angulata* (Vargas-Ponce et al., 2015). Diversos estudios mencionan que muchas especies de

Physalis en sus hojas, raíces y frutos contienen una gran cantidad de metabolitos secundarios con propiedades anticancerígenas, antitumorales, anticonvulsivas, inmunosupresoras, antioxidantes y antibióticas por lo cual son plantas de gran interés en el área agrícola y farmacéutica (Vargas-Ponce et al., 2015).

2.3.1 *Physalis cinerascens* (Dunal) Hitchc.

Physalis cinerascens es una planta herbácea perenne, mide de 12 a 50 cm de alto y presenta un rizoma profundo y largo. Se desarrolla en campos de cultivo, a orillas de camino y en lugares alterados de pastizal, matorral xerófilo y bosque tropical. Su distribución abarca del sur de Estados Unidos hasta el sureste de México. El periodo de floración es de marzo a octubre (M. Martínez, 2020).

Con respecto a su sistema de apareamiento, Sullivan (1984) menciona que es una planta obligatoriamente xenogama y que requiere estrictamente de polinizadores (abejas solitarias) para la producción de frutos. Se han documentado algunos usos de la planta como en la industria para el “cuajado” de leche cuando se preparan quesos, en la medicina para infecciones cutáneas y padecimientos gastrointestinales (Santiagoillo & Blas, 2009), también el fruto se come crudo y hervido en salsas (Martínez et al., 2021).

2.3.2 *Physalis nicandroides* Schltdl.

Physalis nicandroides es una planta anual de tallo erecto y poco ramificada, mide de 0.4 a 1.2 m de alto y presenta pubescencia glandular densa. Se desarrolla en campos de cultivo, a orillas de camino y en lugares alterados de pastizal, matorral, bosque tropical caducifolio o bosque de pino-encino, se ve favorecida por el disturbio. Se distribuye desde el norte de México hasta Nicaragua. Florece de agosto a diciembre (Martínez, 2020).

Se desconoce el sistema de apareamiento de esta especie, Martínez (comunicación personal, 2022) comenta que es una planta que no requiere de polinizadores y se observa en invernaderos fructificando. Los usos que se le dan a la planta son en la alimentación para la elaboración de salsas, como planta medicinal y como trampa vegetal (Santiagoillo & Blas, 2009), algunos estudios fitoquímicos mencionan que las partes aéreas de la planta contienen ésteres de sacarosa (Maldonado et al., 2006) y witanólidos (Torres et al., 2019), los cuales tienen un efecto citotóxico (Lugo, 2020).

2.4 Autoincompatibilidad en el género *Physalis*

La familia Solanaceae presenta el sistema GSI, el cual se basa en RNasas para degradar el crecimiento del tubo polínico, los datos sugieren que la autoincompatibilidad GSI con RNasas fue el estado ancestral de la mayoría de las dicotiledóneas (Igic & Kohn, 2001). Se conoce que la transición de AI a AC es común en varios grupos taxonómicos y que en la familia Solanaceae la pérdida de AI es irreversible (Igic et al., 2003, 2006). Dentro del género *Physalis*, el alelo S de la autoincompatibilidad ha experimentado una variedad de polimorfismos. Se sabe que estos alelos S están restringidos a tres linajes, lo que sugiere que la diversidad genética en el locus S-RNasa es relativamente reciente debido a que muestran niveles bajos de divergencia molecular, contrario a otros géneros de la familia donde los alelos S contienen muchos linajes antiguos (Igic et al., 2003; Paape & Kohn, 2011).

Los trabajos que se han hecho de este grupo demuestran que hay especies que carecen de este sistema y lo han perdido siendo autocompatibles (Menzel, 1951). En un estudio para conocer si existe hibridación en cuatro especies de *Physalis* (*P. angulata*, *P. micrantha*, *P. pubescens* y *P. peruviana*) se encontró que son plantas autocompatibles y al momento de hacer una hibridación en las cuatro especies se demostró que *P. pubescens* es cercana a *P. angulata* y *P. peruviana*, pero solo se formaron frutos en las cruces entre *P. angulata* con *P. pubescens*, mientras que *P. micrantha* no formó híbridos (Azeez & Faluyi, 2018). Otro estudio de la biología reproductiva en *P. angulata* demostró que es una planta autógama facultativa, produce frutos con autopolinizaciones autónomas, manuales y polinización cruzada y en los tres tratamientos se observó el crecimiento del tubo polínico llegando hasta los óvulos (Figueiredo et al., 2020).

También hay otras investigaciones que demuestran que hay especies que son autoincompatibles pero están en la transición a la autocompatibilidad (Pretz & Smith, 2023). Solís-Montero et al. (2021) hizo un estudio en *P. philadelphica* y encontró que es parcialmente autoincompatible, los individuos cultivados y domesticados presentan la tendencia a ser autoincompatibles en comparación con aquellos individuos que son malezas o silvestres que son autocompatibles. Sin importar el grado de domesticación, *P. philadelphica* produjo frutos cuando fue excluida de polinizadores, son autónomas.

En la especie *P. acutifolia* Pretz y Smith (2022) identificaron que hay poblaciones AC y AI. En las plantas AC el tubo polínico del polen propio y cruzado llega hasta los óvulos fecundando a la planta, contrario con las plantas AI en donde el polen propio no llegó a los óvulos y el polen de otras plantas logró fecundar los óvulos.

2.5 Observación del crecimiento del tubo polínico a través de microscopía de fluorescencia

Para el estudio del desarrollo de los tubos polínicos a través del estilo de la flor, fue necesario tener una técnica correcta con la cual se pueda diferenciar el tubo polínico con respecto al tejido conductor. La técnica debe teñir calosa, la cual se encuentra en la pared de los tubos polínicos. La calosa se tiñe con azul de anilina soluble en agua y es fluorescente con luz ultravioleta a 430 nm (Currier, 1957; Martin, 1958). Cuando el tejido absorbe el azul de anilina se emite una fluorescencia amarillo-verde, esta fluorescencia es fuerte a cierto nivel de pH, pero si existe un cambio en la acidez la fluorescencia puede ser descolorida o desaparecer (Śnieżko, 2000). La exposición a diferentes rangos de emisión y excitación de luz también afectan la fluorescencia de una muestra (Smith & McCully, 1978).

Este método con azul de anilina posibilita el seguimiento de como el tubo polínico penetra el estigma y viaja por todo el estilo hasta llegar a los óvulos (Dumas & Knox, 1983). Lo que permite detectar cuando existe incompatibilidad, debido a que se desarrollan parches o tapones de calosa en la punta del tubo polínico y esto se observa en la superficie del estigma o en el tejido del estilo (Dumas & Knox, 1983). Se ha observado que cuando los granos de polen entran en contacto con el estigma y son compatibles tardan entre 24-72 h en lograr penetrar el estigma y traspasar el tejido del estilo (Heizmann et al., 2000). La desventaja sería cuando la planta presenta autoincompatibilidad tardía, debido a que se observa llegar el tubo polínico a los óvulos pero son rechazados entrando al ovario o incluso cuando ya entró a los óvulos (Gibbs, 2014; Xiong et al., 2019) Esta técnica se ha usado en diversas especies de plantas desde aquellas que presentan el sistema SSI, por ejemplo, *Brassica* (Elleman & Dickinson, 1986) y *Senecio squalidus* (Hiscock, 2000), así como en especies con un sistema GSI, como *Citrus clementina* (Aloisi et al., 2020), *Nicotiana tabacum* (Brito et al., 2015), *Petunia hybrida* (Herrero & Dickinson, 1979), *Physalis acutifolia* (Pretz & Smith, 2022) y *P. angulata* (Figueiredo et al., 2020).

III. HIPÓTESIS

Physalis cinerascens es autoincompatible, por lo que se espera rechace su propio polen, que el tubo polínico no llegue a los óvulos y no se formen frutos con autopolinización, pero sí con polinización cruzada. *Physalis nicandroides* no requiere polinizadores por lo que el tubo polínico llegará a los óvulos con polen propio y polen no propio, formando frutos con autopolinización, polinización cruzada y posiblemente por apomixis.

IV. OBJETIVOS

General

- Conocer la interacción polen-pistilo en dos especies de *Physalis* y determinar si son plantas autoincompatibles o autocompatibles.

Particulares

- Analizar la fenología de las flores de *P. cinerascens* y *P. nicandroides*.
- Analizar la interacción polen-pistilo en *P. cinerascens* y *P. nicandroides*.
- Evaluar la fructificación y producción de semillas de *P. cinerascens* y *P. nicandroides* con cinco tratamientos de cruza artificial.

V. METODOLOGÍA

5.1 Material vegetal

Las semillas de *P. cinerascens* y *P. nicandroides* se obtuvieron de diferentes colectas previas en México. De *P. cinerascens* fueron tres poblaciones y de *P. nicandroides* cuatro poblaciones (Cuadro 1).

Cuadro 1. Datos de colecta de las semillas de *P. cinerascens* y *P. nicandroides*.

	<i>P. cinerascens</i>			<i>P. nicandroides</i>			
<i>Población</i>	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P4
<i>Sitio de colecta</i>	3 km N de Tlacote el Alto	Carretera a Bernal	--	La Barreta	El terrero, desviación Rancho el Ameyal	Piedras Bola	Cerro Viejo
<i>Municipio, Estado</i>	Querétaro, Qro.	Ezequiel Montes, Qro.	Huichapan, Hgo.	Querétaro, Qro.	Amealco, Qro	Ahualulco de Mercado, Jalisco	Jocotepec, Jalisco
<i>Coordenadas</i>	20°41'45.27 "N 100°30'52.4 5"W	20°42'39. 2" N 99°33'15. 2" W	20°22'10"N 99°38'45"W	20°50'23. 1"N 100°30'32 .6"W	20° 7'10.7"N 100°8'51.14 "W	20°39'27" N 104°03'44" W	20°21'48"N 103°26'10"W
<i>Año de colecta</i>	2021	2009	2011	2021	2021	2011	2011

5.2 Crecimiento de las plantas

Para la germinación de las semillas se pusieron a remojar en agua entre 24 y 48 horas. Debido a que después de dos meses de ser sembradas las semillas de *P. nicandroides* no se observó crecimiento, las semillas se sometieron a un tratamiento con KNO₃ (nitrato de potasio: 0.2%) para romper la dormancia (ISTA, 2016). Cuando se observó crecimiento en la etapa de formación de los cotiledones se pasaron a los almácigos.

Se colocaron 2 semillas/plántulas por almácigo. Cada almácigo contenía una mezcla de sustrato de peat moss, composta, vermiculita (1:1:1) y 250 gr de humus de lombriz. Después de que las plantas tuvieron un crecimiento de ~10 cm, se trasplantaron a macetas grandes. El sustrato de las macetas fue de tierra negra con perlita (1:1). Las plantas se regaron cada dos días y una vez a la semana se les puso fertilizante 20,30,10 NPK (20 ml de fertilizante por

maceta) y se mantuvieron bajo condiciones ambientales. *Physalis cinerascens* se encontraba dentro de un invernadero, con cobertura parcial y *P. nicandroides* al exterior.

Las plántulas de *P. cinerascens* de la **P1**, se trasplantaron en los meses de enero/febrero y su floración fue a partir del mes de junio del año 2023, la **P2** y **P3** se trasplantaron en el mes de junio y su floración fue a partir de septiembre del año 2023. Las semillas de *P. nicandroides* se germinaron en dos temporadas diferentes, la primera temporada sus plántulas se trasplantaron en mayo y su floración fue en los meses de julio-agosto (verano), sin embargo, las plantas se infectaron por hongos y comenzaron a secarse. La segunda temporada, las plántulas se trasplantaron en noviembre y a finales de mes comenzó su floración y duro todo el mes de diciembre 2023 y parte de enero 2024 (invierno).

5.3 Fenología de la floración y relación polen/óvulo

Durante una semana se hicieron observaciones diarias de tres botones florales de cada una de las poblaciones desde las 7 h hasta las 18 h. Se hicieron anotaciones del horario de apertura y cierre floral y de la dehiscencia de las anteras. Se definieron etapas desde el botón hasta la senescencia de las flores. Se hicieron pruebas de receptividad del estigma para observar en qué etapa y horario el estigma se encuentra receptivo, esto por medio de la prueba de peróxido de hidrógeno (Zeisler, 1933), se tomó en cuenta el máximo burbujeo como receptividad alta. Estos datos se requirieron para conocer en qué momento el estigma se encuentra altamente receptivo para las pruebas de microscopía de fluorescencia.

La relación polen-óvulo (P/O), es la cantidad de polen producido por cada óvulo, éste se evaluó con el método propuesto por Cruden (1977). La cantidad de granos de polen por flor se estimó a partir de tres botones de cada individuo por especie y de cada botón se extrajeron dos anteras (sin dehiscencia), se colocaron en tubos de 1.5 ml con 500 µl de hidróxido de potasio (KOH) al 10%, se calentaron los tubos a baño maría durante 15 minutos para romper el tejido de la antera y liberar el polen. El conteo de granos de polen se hizo en cámara de Neubauer con 10 µl de la muestra (Márquez et al., 2016). Los ovarios se diseccionaron y se colocaron en tubos de 1.5 ml con unas gotas de Visikol para aclarar tejido (Visikol a bico company, 2018), posteriormente el ovario se colocó en un portaobjetos y se estrujo con un cubreobjetos para su observación y conteo de óvulos en el microscopio óptico.

5.4 Experimento de cruce artificial y producción de frutos

Previamente al experimento los botones florales se excluyeron con bolsas de papel glassine y/o tul dependiendo del tamaño de la flor (Fig. 4). Una vez que las flores se encontraban en anthesis se les asignó uno de los siguientes cinco tratamientos: 1) apomixis, 2) autopolinización autónoma, 3) autopolinización manual (geitonogamia), 4) polinización cruzada y 5) control. De cada tratamiento se procuró hacer dos repeticiones por cada individuo. En total fueron 31 individuos, 14 de *P. cinerascens* y 17 de *P. nicandroides*. Después de hacer cada tratamiento las flores se excluyeron nuevamente para evitar ser polinizadas por insectos o el viento y se les colocaron etiquetas con datos del tratamiento y repetición. Pasados 5 días para *P. nicandroides* y 10 días para *P. cinerascens*, o cuando la corola se desprendía, las bolsas se retiraron para no interferir con el proceso de fructificación.

En el tratamiento de apomixis, antes de la anthesis se emascularon las anteras, con el fin de saber si la planta produce frutos sin polinización. En la autopolinización autónoma al botón se le colocó una bolsa y se dejó la flor intacta hasta la senescencia, con el fin de saber si la planta puede autopolinizarse. En la autopolinización manual por geitonogamia la flor receptora fue emasculada y se polinizó con una antera dehiscente de otra flor ya abierta del mismo individuo, ambas flores se embolsaron. En la polinización cruzada se hizo el mismo procedimiento que autopolinización manual, en este caso la flor donadora fue de otra población. En el tratamiento 3 y 4 la autopolinización se hizo frotando dos anteras dehiscentes sobre el estigma con una pinza de relojero hasta que se observó el estigma cubierto de polen, después de cada polinización la pinza se limpió con alcohol al 70% para evitar contaminación. El tratamiento control se dejó descubierto y al aire libre.

Se evaluó si hubo fructificación en los cinco tratamientos (fruit set) y se tomó en cuenta si hubo frutos maduros o inmaduros. En ambas especies los frutos fueron colectados dos meses después de haber hecho las cruces artificiales, en *P. cinerascens* el fruto maduro debía estar de un color naranja y en *P. nicandroides* de color marrón/café. De los frutos obtenidos se hizo un conteo del número de semillas para evaluar el tratamiento con mayor éxito.

5.5 Interacción polen-pistilo

Para analizar la interacción pistilo-polen se hicieron autopolinizaciones manuales por geitonogamia, para tener mayor control del horario en el que se depositaba el polen en el estigma. Los botones florales fueron emasculados y embolsados, después de dos días se autopolinizaron en el horario con alta receptividad del estigma, tanto la flor receptora como donadora se les colocó una bolsa. Se hicieron cuatro repeticiones en *P. cinerascens*, dos en **P1** y dos **P2**; en *P. nicandroides* se hizo una repetición por cada población. Los pistilos se colectaron después de haber sido autopolinizados a las 24, 48 y 72 h y se colocaron en tubos de 1.5 ml con solución fijadora de ácido acético con etanol (1:3), se dejaron reposar por al menos dos horas a temperatura ambiente. Después los pistilos se cambiaron a una solución de etanol al 70% y se dejó reposar por 10 minutos a temperatura ambiente, se hizo lo mismo con una serie de 50% y 30% de etanol y se lavó con agua destilada. Las muestras se colocaron en cajas Petri y se les agregó NaOH 8 M, se dejaron reposar durante la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente los pistilos se lavaron con agua destilada cuidadosamente y luego se colocaron en la solución de azul de anilina (0.1% (w/v), en 108 mM K₃PO₄, pH ~11) durante al menos dos horas, las muestras se cubrieron con papel aluminio y no se lavaron (Mori et al., 2006). Después las muestras se colocaron en un portaobjetos con un cubreobjetos de alta precisión. Se observaron en un microscopio de fluorescencia Axio Observer Z1, ZEISS, bajo radiación UV, con el filtro DAPI que tiene un rango de excitación de 335-383 nm y de emisión de 420-470 nm. Se evaluó el crecimiento del tubo polínico a través del estilo y si llegó a los óvulos. Las imágenes obtenidas del microscopio fueron optimizadas con el software de microscopía ZEN Pro de ZEISS.

5.6 Análisis estadísticos

Para los análisis se usó el software RStudio ver. 4.3.2 (R Core Team, 2023). Se hicieron cuatro modelos lineales generalizados (GLM) para analizar los datos del experimento de cruce artificial. Para analizar si había diferencias entre la producción de frutos entre los tratamientos se realizó un GLM por especie usando error binomial. Mientras que para los conteos de semillas se realizó un GLM usando error Poisson para saber si había diferencias entre estos por especie. Los tratamientos que no produjeron frutos se excluyeron del análisis y las semillas de los frutos inmaduros no se tomaron en cuenta para el promedio y el GLM. Posteriormente, si había diferencias significativas se hicieron comparaciones múltiples

usando pruebas de Tukey con la función glht del paquete multcomp (Hothorn et al., 2008). Adicionalmente para *P. cinerascens*, se calcularon los intervalos de confianza incluyendo los tratamientos que no produjeron frutos (autopolinización autónoma y manual, apomixis) para comparar las diferencias entre estos tratamientos con el resto de los tratamientos, se usó el paquete Hmisc (Harrell & Dupont, 2019).



Figura 4. Aislamiento de flores para los tratamientos de cruce artificial con bolsas de tul y papel glassine en ambas especies.

VI. RESULTADOS

6.1 Fenología de la floración y relación polen/óvulo

Etapas de *Physalis cinerascens*

La apertura de las flores de *P. cinerascens* ocurre a cualquier hora del día y el cierre es a partir de las 18 h solo los primeros dos días. En los siguientes días la flor se mantiene abierta y no se cierra completamente por las tardes. Desde la apertura hasta la senescencia, la flor tiene una duración de 8 a 10 días. Se registró que el primer día de apertura floral hubo dehiscencia de una a dos anteras, en el segundo día la tercera antera y en el tercer día se abrieron la cuarta y quinta antera o hasta el cuarto día se observó que abrió la última antera. Se definió como etapa 1 cuando la flor se encuentra inaperturada (Fig. 5A); etapa 2 cuando la corola comenzó a abrir (Fig. 5B-C); etapa 3 cuando la corola está totalmente extendida, puede tener 1-2 anteras dehiscentes o ninguna y ocurre horas después de la etapa 2, puede ser en el mismo día o al siguiente día (Fig. 5D); etapa 4 cuando la corola está totalmente abierta, con las cinco anteras dehiscentes (Fig. 5E); etapa 5 cuando comienza la senescencia de las flores, corola “caída” y cerrada (Fig. 5F). En todas las observaciones las cinco anteras dehiscentes no sobrepasaron ni tocaron el estigma.

La receptividad del estigma fue en aumento conforme pasaba cada etapa de la fenología de la floración, siendo la etapa 3 en el horario de las 12-14 h donde se observó alta receptividad, debido a que presentó mayor burbujeo. El resultado de la relación P/O fue de 2736.301 ± 125.17 (Cuadro 2).

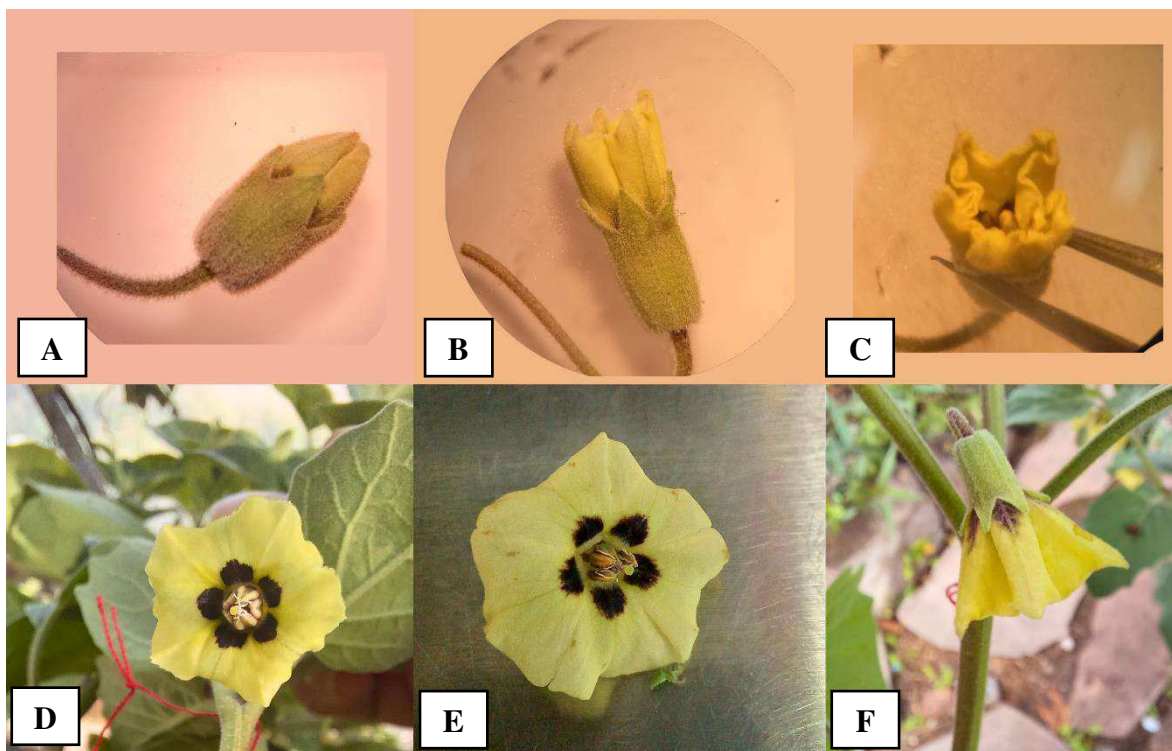


Figura 5. Etapas de la fenología de floración en *P. cinerascens*. A) flor inaperturada, B-C) corola comienza su apertura, D) corola totalmente extendida con dos anteras dehiscentes, E) corola totalmente extendida con cinco anteras dehiscentes, F) flor senescente.

Etapas de *Physalis nicandroides*

La apertura de las flores de *P. nicandroides* se registró en un horario de las 12 a 15 h, en ocasiones se observó la corola levemente aperturada, no totalmente extendida. La flor desde su apertura hasta la senescencia tiene una duración de cuatro días. Estas flores abrieron en un horario de las 10-11 h y se comenzaron a cerrar a las 18 h. El primer día de apertura se observó con tres anteras dehiscentes, en el segundo día abrió la cuarta y quinta antera. Al cuarto día la flor ya no vuelve a abrir y comienza la senescencia hasta que la corola se desprende del cáliz. Se definió la etapa 1 cuando la flor se encuentra cerrada (Fig. 6A), etapa 2 cuando la flor comienza su apertura y tiene tres anteras dehiscentes (Fig. 6B), etapa 3 cuando la flor presenta la corola totalmente extendida con cinco anteras dehiscentes (Fig. 6C) y etapa 4 cuando la flor comienza la senescencia con la corola cerrada (Fig. 6D). En todas las observaciones, cuando las cinco anteras estaban dehiscentes, estas cubrían al estigma.

La receptividad del estigma se registró que fue en aumentó conforme pasaba cada etapa de la fenología de la floración, siendo la etapa 3 en el horario de las 12-14 h donde se estableció la receptividad alta. El resultado de la relación P/O fue de 359.03 ± 24.56 (Cuadro 2).

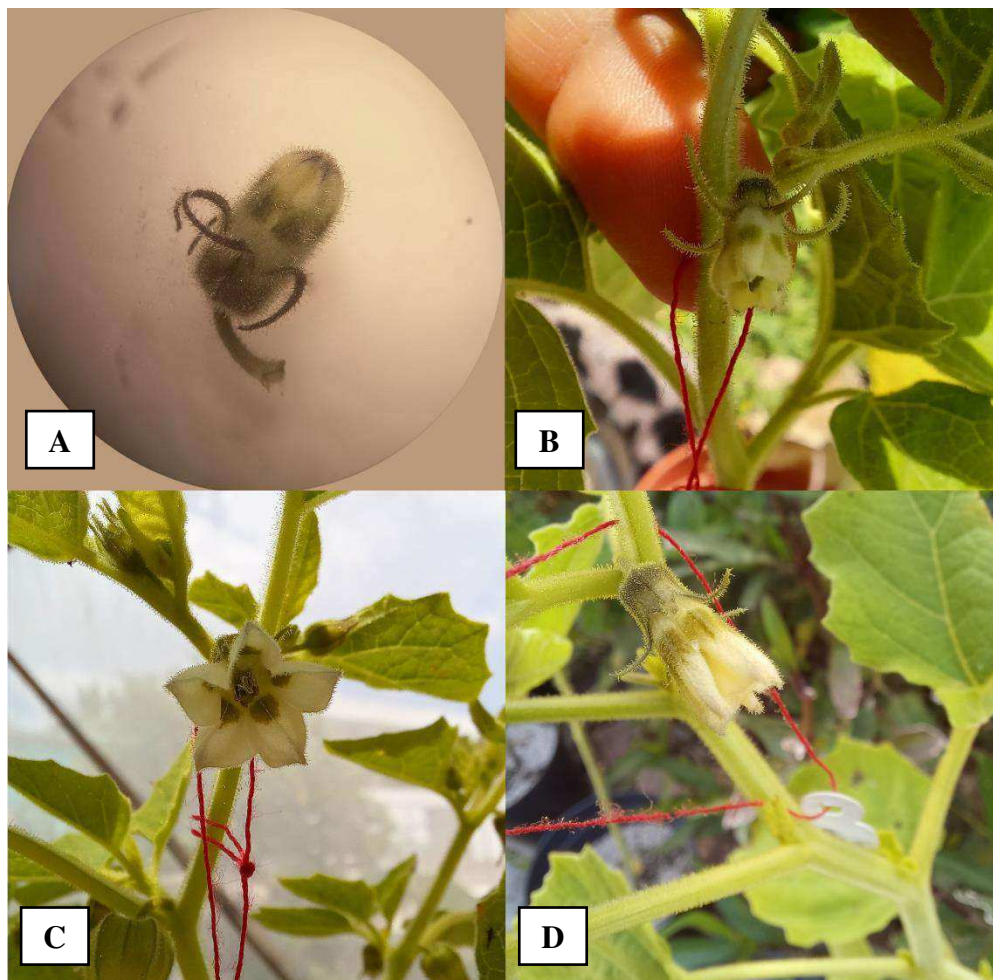


Figura 6. Etapas de la fenología de la floración en *P. nicandroides*. A) botón floral, B) flor al comienzo de su apertura con tres anteras dehiscentes, C) flor totalmente extendida con cinco anteras dehiscentes, D) flor senescente.

Cuadro 2. Número de granos de polen, óvulos y relación polen/óvulo (P/O) $\pm$ error estándar en *P. cinerascens* y *P. nicandroides*.

Especie	Granos de polen	Óvulos	P/O
<i>P. cinerascens</i>	429,160.15 $\pm$ 19,390.55	160.16 $\pm$ 7.19	2736.30 $\pm$ 125.17
<i>P. nicandroides</i>	43,420.13 $\pm$ 2,496.68	132.8 $\pm$ 4.49	347.91 $\pm$ 22.89

6.2 Interacción polen-pistilo

A través de la técnica con azul de anilina se logró observar el crecimiento del tubo polínico. De las cuatro repeticiones que se hicieron en *P. cinerascens* se observó que después de 24 h de polinizar las flores, ningún grano de polen había germinado. A las 48 h el tubo polínico penetró el estigma y a las 72 h el tubo polínico se encontraba a un tercio del estilo. Para ver si el tubo polínico llegaba a los óvulos se dejaron pasar 96 y 120 h después de polinizar las flores, en ambos casos el crecimiento del tubo polínico se observó limitado hasta un tercio del estilo (Fig. 7). En todas las repeticiones se observaron los tubos polínicos engrosados de la punta (tapones de calosa) y ningún tubo polínico llegó a los óvulos.

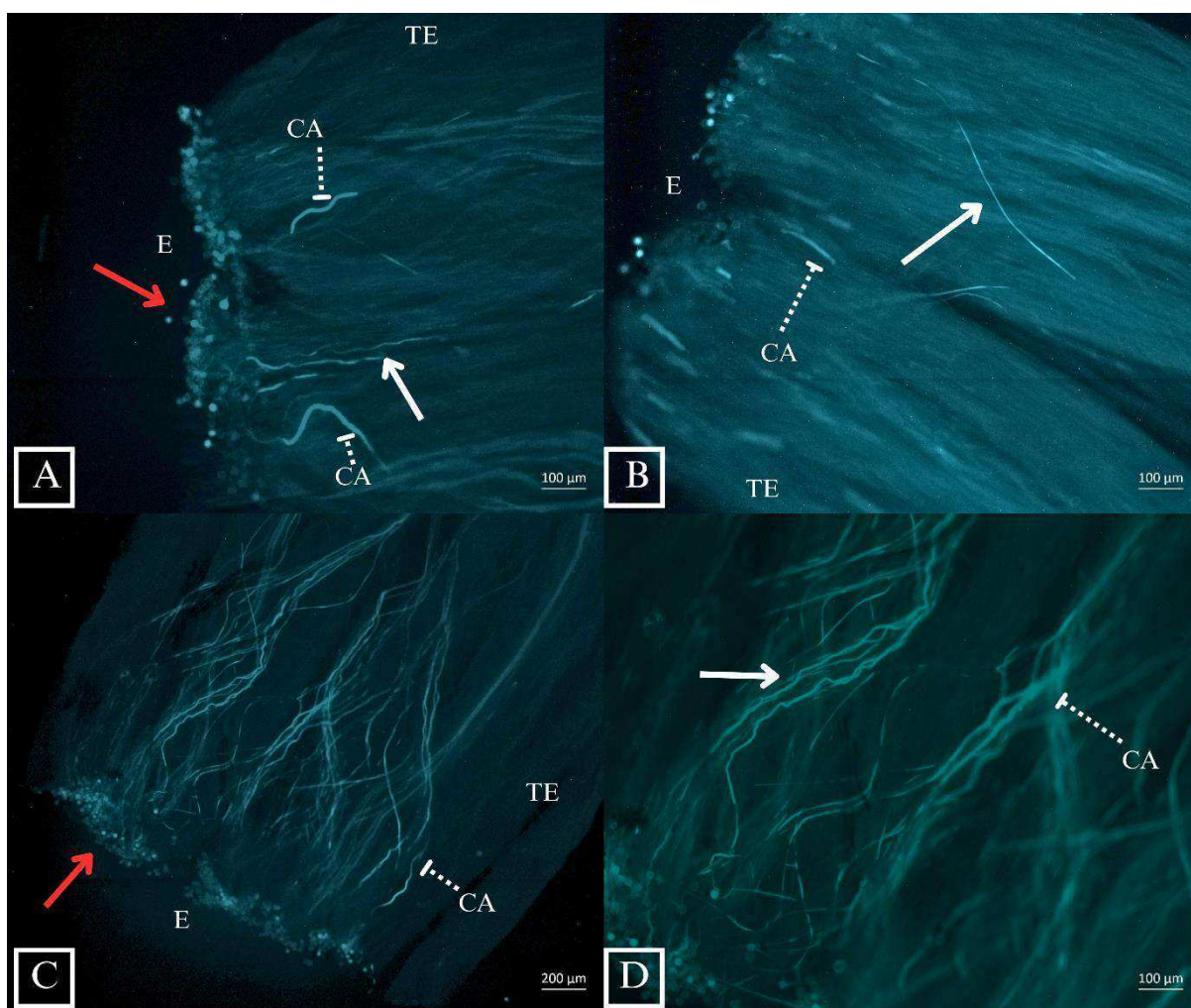


Figura 7. Imagen al microscopio de fluorescencia con filtro DAPI, de la interacción polen-pistilo en *P. cinerascens*. A) autopolinización manual por geitonogamia después de 96 h. B) y C) autopolinización manual por geitonogamia después de 120 h. D) Acercamiento a los tubos polínicos en C. CA= calosa; E= estigma; TE= tejido del estigma. Flechas rojas: señalan los granos de polen; flechas blancas: señalan los tubos polínicos.

En *P. nicandroides* se observó que a las 24 h después de la polinización manual por geitonogamia el tubo polínico ya había germinado y atravesado el estigma como se observa en la Fig. 7A, a las 48 h el tubo polínico ya había recorrido todo el tejido del estilo y algunos tubos polínicos se observaron en la base del estilo (Fig. 8B-C) y a las 72 h los tubos polínicos ya habían llegado a los óvulos (Fig. 8D).

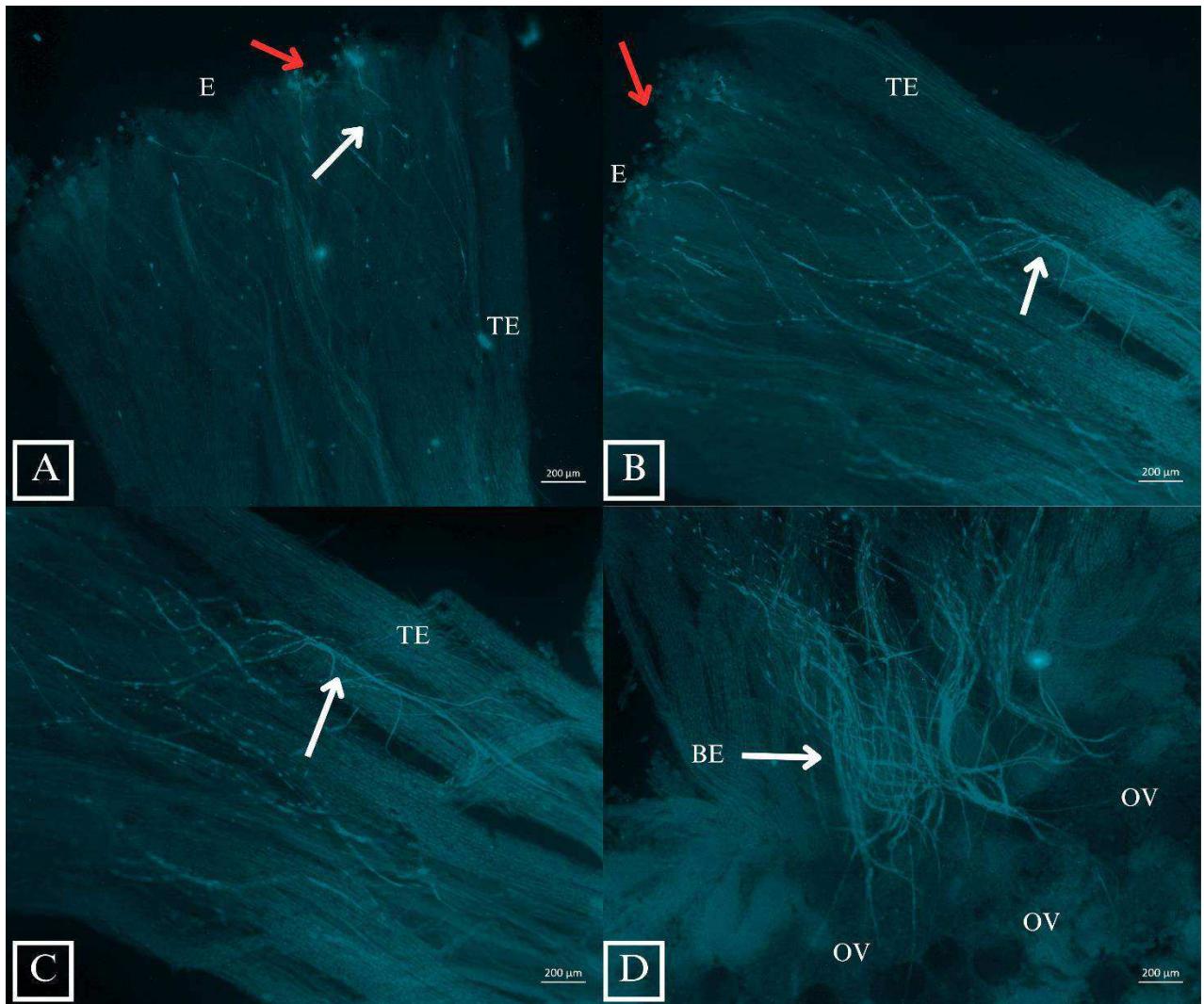


Figura 8. Imagen al microscopio de fluorescencia con filtro DAPI, de la interacción polen-pistilo en *P. nicandroides*. A) polinización por geitonogamia después de 24 h. B-C) polinización por geitonogamia después de 48 h. D) polinización por geitonogamia después de 72 h. BE= base del estilo; E= estigma; TE= tejido del estigma; OV= óvulos. Flechas rojas: señalan los granos de polen; flechas blancas: señalan los tubos polínicos.

6.3 Experimento de cruce artificial y producción de frutos

Physalis cinerascens no formó frutos por apomixis y autopolinización autónoma, es una planta que produce frutos por entrecruzamiento con otras poblaciones, pero también por autopolinización manual por medio de geitonogamia. El tratamiento que tuvo un mayor porcentaje de frutos fue el entrecruzamiento y difirió estadísticamente de la autopolinización manual, pero no de la polinización natural (control; Cuadro 3). A través de los intervalos de confianza se confirma que la autopolinización manual si difiere de la autopolinización autónoma y apomixis. La producción de frutos fue deficiente, debido a que en el periodo de estudio algunos individuos no dieron suficientes flores para llevar a cabo todas las repeticiones.

Se registraron dos tipos de frutos, maduros e inmaduros (Fig. 9), después de dos meses de la aplicación de los tratamientos de cruce artificial, los frutos maduros fueron grandes y de un color amarillo/naranja, contrario a aquellos frutos que fueron pequeños de color verde. De los frutos maduros, el tratamiento que produjo más semillas fue el control seguido del entrecruzamiento y autopolinización manual difiriendo estadísticamente entre estos. Los frutos inmaduros sólo se registraron en los tratamientos de entrecruzamiento y control, registrando un menor número de semillas en comparación a los maduros (Cuadro 3).

Cuadro 3. Producción de frutos maduros y promedio de semillas $\pm$ error estándar de los cinco tratamientos aplicados a dos especies de *Physalis*. Entre paréntesis, el número de las flores a las que se le aplicó el tratamiento (•) y frutos a las que se les contó las semillas (••).

Tratamientos	<i>P.cinerascens</i>			<i>P.nicandroides</i>	
	Producción de frutos (•)	Promedio semillas Fm (••)	Promedio semillas Fi (••)	Producción de frutos (•)	Promedio semillas Fm (••)
Apomixis	0 (23)	0		0 (33)	0
Autopolinización autónoma	0(24)	0		76.5(34) ab	20.1 $\pm$ 5.4 (26)c
Autopolinización manual	14.3(14)b	42.5 $\pm$ 8.5(2) c		72.7(33) ab	39.6 $\pm$ 6.9 (24)b
Entrecruzamiento	66.7 (9)a	57.7 $\pm$ 22.16(4) b	10(1)	50 (32)b	9.9 $\pm$ 3.9 (16)d
Control	47.8 (23) ab	90.4 $\pm$ 15.9(8) a	6.3 (3)	90.6 (32)a	46.3 $\pm$ 6.7 (29)a
	Deviance=7.6	Deviance=74.2		Deviance=14	Deviance=669.54
	GL=2*	GL=2***		GL=3**	GL=3***

Fm= fruto maduro, Fi= fruto inmaduro.

Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos.

*P < 0.05, **P < 0.01, and ***P < 0.001.

Physalis nicandroides no produce frutos por apomixis, pero si forma frutos por autopolinización autónoma, autopolinización manual y entrecruzamiento con otras poblaciones. De acuerdo con el análisis estadístico el tratamiento control y el de entrecruzamiento son significativamente diferentes entre sí, pero estos tratamientos no difieren de los tratamientos de autopolinización autónoma y manual (Cuadro 3).

Esta especie presentó solo frutos maduros de diferentes tamaños (Fig. 10 A) pero hubo muchos frutos abortados que no formaron semillas (Fig. 10 B), estos tenían la característica de que el cáliz crecía como el de un fruto maduro. El promedio de semillas fue más alto en el control seguido de la autopolinización autónoma y manual. El tratamiento que tuvo el menor número de semillas fue el entrecruzamiento (Cuadro 3).

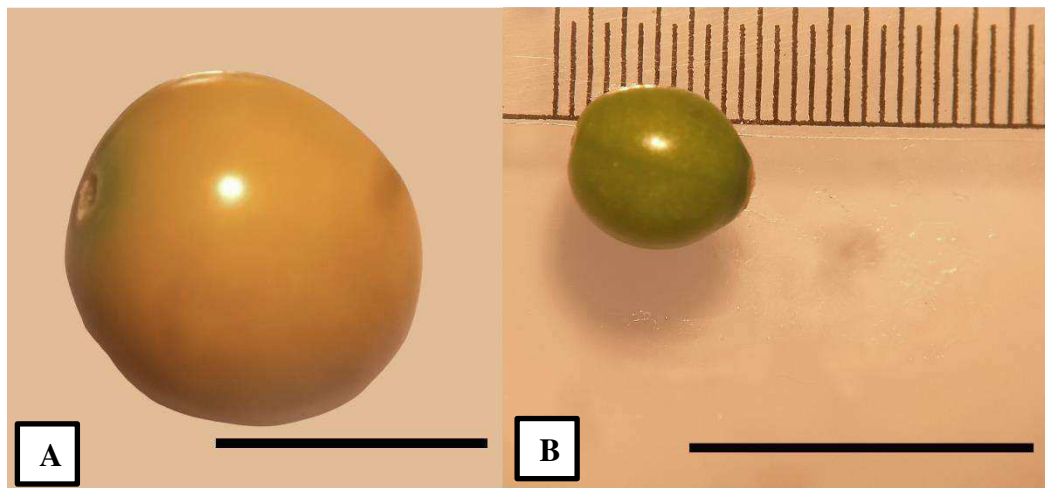


Figura 9. Frutos de *P. cinerascens*, A) fruto maduro, B) fruto inmaduro. La escala equivale a 1 cm.

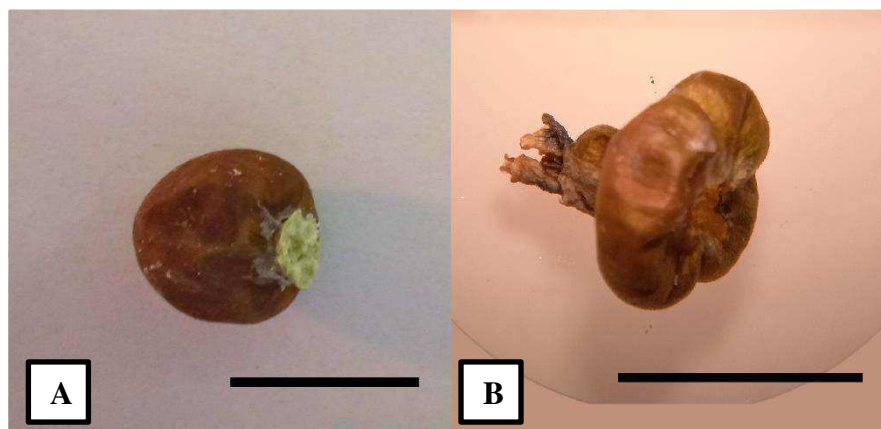


Figura 10. Frutos de *P. nicandroides*. A) Fruto maduro, B) fruto abortado. La escala equivale a 1 cm.

VII. DISCUSIÓN

7.1 Fenología de la floración y relación polen/óvulo

Existe una estrecha relación entre el periodo de floración y los sistemas de polinización, debido a que determinan el tiempo que la flor está disponible para su polinización (Cortés-Flores et al., 2017). Por ejemplo, en el caso de las plantas que presentan una floración más prolongada son polinizadas por agentes bióticos, como polinizadores, mientras que las plantas que tienen un periodo corto de floración son polinizadas por agentes abióticos como el viento (Bolmgren et al., 2003; Cortés-Flores et al., 2017; Elzinga et al., 2007). Se ha observado que en plantas con autocompatibilidad el tiempo de antesis es corto, comparado con aquellas plantas que presentan autoincompatibilidad en donde la antesis es prolongada, esto se ha comprobado en especies de plantas como *Anagallis* (Gibbs & Talavera, 2001), *Asclepias tuberosa* (Wyatt, 1981), *Gesneria* (Martén-Rodríguez & Fenster, 2008), *Hypochaeris* (Ortiz et al., 2006), *Leptosiphon* (Weber & Goodwillie, 2013). En ambas especies de *Physalis* se observó que el tiempo en que la flor se mantiene abierta es distinto, *P. cinerascens* dura entre 8-10 días mientras que *P. nicandroides* solo cuatro días. Sullivan (1984) en su trabajo menciona que *P. cinerascens* es una planta que necesita de abejas solitarias para su polinización, por lo anterior es posible que el tiempo que dura abierta la flor se deba a que necesita que lleguen polinizadores, además en este estudio se encontró que *P. cinerascens* presenta autoincompatibilidad. Sobre *P. nicandroides*, Martínez (comunicación personal, 2022) menciona que esta planta fructifica en invernaderos sin necesidad de polinizadores. En este estudio se confirma que es una especie autocompatible que se autopoliniza de forma autónoma, además en todas las observaciones las anteras dehiscentes cubrían al estigma, lo que podría estar favoreciendo la autopolinización. Por lo que es probable que no necesite de los polinizadores, en este estudio no se observó ningún insecto visitando las flores.

En ambas especies de *Physalis* se observó un cambio gradual en la receptividad del estigma en las diferentes etapas y horarios de la apertura de la flor. Diferentes investigaciones han señalado que el estigma es receptivo previo a la antesis, pero la receptividad aumenta conforme avanza la antesis (Crispim et al., 2017; Ferreira et al., 2021; Galen & Plowright, 1987; He et al., 2017; Yi et al., 2006). La receptividad más alta en ambas especies de *Physalis*

se observó cuando la flor ya estaba abierta, generalmente con varias anteras dehiscentes. Estudios previos en el género *Physalis* respaldan que la receptividad comienza durante la anthesis (Figueiredo et al., 2020; Pretz & Smith, 2022; Sullivan, 1984). Se ha establecido una correlación entre la actividad de la peroxidasa y la adherencia del polen, encontrando que en ausencia de peroxidasa la adherencia del polen es baja (Brito et al., 2015; Galen & Plowright, 1987). Por lo tanto, resultó crucial llevar a cabo las autopolinizaciones manuales para el microscopio de fluorescencia en la etapa de receptividad alta para garantizar una correcta adhesión del polen al estigma.

Sobre la relación polen/óvulo, Cruden (1977) menciona que la mayoría de las plantas que presentan autoincompatibilidad van a producir una mayor cantidad de granos de polen comparada con aquellas plantas que son autógamas o autocompatibles. En este estudio encontramos que *P. cinerascens* fue la especie con más granos de polen por flor en comparación con *P. nicandroides*. De acuerdo con la clasificación propuesta por Cruden (1977), *P. cinerascens* estaría dentro del sistema de apareamiento de xenogamia (2736.301 ± 125.17), esto quiere decir que requiere de polinización cruzada entre plantas o individuos genéticamente diferentes; mientras que *P. nicandroides* presenta un sistema de apareamiento de autogamia facultativa (359.03 ± 24.56), se puede autopolinizar pero también puede ser fecundada por otras plantas.

7.2 Interacción polen-pistilo

De acuerdo con los resultados de microscopia de fluorescencia, el crecimiento del tubo polínico en *P. cinerascens* llevó más tiempo comparado con *P. nicandroides*. En la primera especie tardó más de 24 h para germinar y penetrar el estigma. Se ha reportado que la familia Solanaceae presenta un sistema de autoincompatibilidad gametofítica por lo que el crecimiento del tubo polínico se detendrá a un tercio del estilo si el grano de polen es incompatible (Franklin-Tong & Franklin, 2003a). En este estudio encontramos resultados similares donde los tubos polínicos de polen de autocruza en *P. cinerascens* no crecen más allá de un tercio de todo el estilo. Por lo que *P. cinerascens* rechaza sus propios granos de polen evitando que lleguen a los óvulos. Además, se formaron cúmulos de calosa, el tubo polínico se compone de calosa y cuando un grano de polen es incompatible en la punta del tubo polínico se forman “tapones” de calosa (Dumas & Knox, 1983; Hodnett & Rooney,

2005). Caso contrario con *P. nicandroides*, los tubos polínicos de polen de autocruza crecieron y llegaron a los óvulos en un periodo de 72 h, Heizmann et al. (2000) mencionan que cuando un grano de polen es compatible, el tubo polínico tarda en penetrar y llegar a los óvulos en un periodo de 24 a 72 h. Por lo cual *P. nicandroides* es una planta con autocompatibilidad que acepta sus propios granos de polen.

Sullivan (1984) en su trabajo con *P. cinerascens* menciona que es una planta con xenogamia obligada, solo produce frutos con polinización cruzada y complementando con las observaciones a través de microscopía de fluorescencia se confirma que es una planta con autoincompatibilidad. Aunque en el experimento de cruza artificiales encontramos que se formaron frutos por autopolinización manual. Igic et al. (2003, 2006), en sus investigaciones indican que las plantas con un sistema GSI basado en RNasas tienden a perder la autoincompatibilidad, por lo que algunos individuos de una población en *P. cinerascens* podrían estar perdiendo el sistema de incompatibilidad o ser parcialmente autoincompatibles.

Existen varias especies dentro de *Physalis* que son autocompatibles (Azeez & Faluyi, 2018; Figueiredo et al., 2020; Menzel, 1951), para *P. nicandroides* este sería el primer estudio que demuestra que es una planta con autocompatibilidad y que puede polinizarse de forma autónoma. Algunas ventajas de la autocompatibilidad es que no existe una dependencia de los polinizadores y está asegurado el éxito reproductivo, sin embargo, hay una reducción en la variación genética al no haber recombinación (Lloyd, 1992; Takebayashi & Morrell, 2001) y en el extremo algunos efectos negativos por la depresión por endogamia, lo que causaría un bajo rendimiento reproductivo y viabilidad en las semillas (Charlesworth & Charlesworth, 1987; Hokanson & Hancock, 2000).

7.3 Experimento de cruce artificial y producción de frutos

Physalis cinerascens no es apomíctica y tampoco tiene la capacidad de autopolinizarse de forma autónoma. Sin embargo, en este estudio encontramos que algunos individuos pueden producir frutos por autopolinización manual. Los dos frutos por autopolinización manual se presentaron en la población Tlacote (P1), la cual fue la primera en crecer y florecer. Esto podría indicarnos que quizás algunos individuos de esta población podrían estar perdiendo la autoincompatibilidad o ser parcialmente autoincompatibles. Pretz & Smith (2022) mencionan que *Physalis acutifolia* bajo condiciones de invernadero puede perder la

autoincompatibilidad y pasar a ser autocompatible. Las plantas de *P. cinerascens* en este estudio se mantuvieron dentro de un invernadero que no está completamente cerrado. Además, es común que las plantas con el sistema GSI pierdan la autoincompatibilidad (Igic et al., 2003, 2006).

La producción de semillas puede estar limitada por los recursos que recibe la planta y la deficiencia de polen (Campbell & Halama, 1993; Lawrence, 1993). En *P. cinerascens* se obtuvieron frutos inmaduros, los cuales presentaron la menor cantidad de semillas, estos frutos se presentaron en los tratamientos de control y entrecruzamiento, quizás por una deficiencia de polen debido a que se desconoce la carga polínica que se colocaba en el estigma. A pesar de que *P. cinerascens* requiere de polinización cruzada para la producción de frutos, esto no representa una limitante para la planta debido a que presenta un rizoma, lo que la hace exitosa para su proliferación (Sullivan, 1984). El rizoma es un tallo modificado subterráneo, debido a esta condición se encuentra protegido durante condiciones ambientales adversas, permitiendo que la planta sobreviva año tras año.

Con respecto a *P. nicandroides*, no es una planta apomíctica, tiene el potencial de autopolinizarse y por ende recibir granos de polen de la misma planta (autopolinización manual), además produce frutos por entrecruzamiento de otras poblaciones, este sistema de apareamiento sería lo que Cruden (1976, 1977) denomina autógama facultativa. *P. nicandroides* es una planta anual (M. Martínez, 2020), muchas plantas que son anuales tienden a autofecundarse debido a que, si la polinización cruzada tiene un fallo en esa temporada, las pérdidas no serán compensadas por la polinización cruzada en años posteriores (Lloyd, 1992). En estudios de plantas autocompatibles, se ha observado que el entrecruzamiento se ve favorecido sobre la autopolinización (Eckert & Barrett, 1994; Geiger et al., 2010; Karoly, 1992; Soares et al., 2015). Sin embargo, al cruzar diferentes poblaciones de *P. nicandroides*, se obtuvieron pocos frutos y semillas. Este resultado podría explicarse por varias razones. Por ejemplo, podría haber deficiencia de polen (Campbell & Halama, 1993; Lawrence, 1993) debido a que en los cruces artificiales se desconoce la carga polínica que se colocó en el estigma. También podría haber competencia de polen, quizás el polen autógamo tenga ventaja sobre el polen exógamo, Eckert & Barrett (1994) en su trabajo encontraron que existe competencia de polen en *Decodon verticiullatus*, en donde se ve

beneficiado el polen exógamo sobre el polen autógeno. Además, podría darse un descuento de semillas, Lloyd (1992) menciona que cuando la autopolinización tiene preferencia sobre la polinización cruzada ocurre el descuento de semillas, que es la pérdida en la producción de semillas cruzadas. Otra posibilidad es que existan barreras reproductivas interpoblaciones en donde algunos tubos polínicos son rechazados (Broz et al., 2017, 2021). Algo interesante es que *P. angulata* que también presenta un sistema de autogamia facultativa, mostró una disminución en la producción de frutos y semillas en el entrecruzamiento (Figueiredo et al., 2020).

Se observó que *P. nicandroides* presentó frutos abortados, esto puede deberse a diferentes factores como la limitante de recursos que tiene la planta, depredación o daño de frutos juveniles por parte de insectos, reducción en el área foliar, recepción de poca cantidad de granos de polen, entre otros (Stephenson, 1981). Los abortos presentados en los tratamientos de entrecruzamiento y autopolinización manual podrían deberse a una deficiencia polínica debido a que se desconoce la carga de granos de polen que se colocaron en el estigma. Sin embargo, hay estudios en diferentes plantas con autocompatibilidad que cuando son autofecundadas abortan la mayoría de los frutos o presentan semillas abortadas y es atribuido a un efecto de la depresión endogámica (Hokanson & Hancock, 2000; Martínez-García et al., 2012; Stone et al., 2014; Xie et al., 2019; Xiong et al., 2019). Algo que se debe resaltar es que *P. nicandroides* se germinó en dos periodos diferentes del año, en verano e invierno y la planta presentó un crecimiento diferente, en la temporada de verano las plantas fueron vigorosas y con hojas grandes, no obstante, en la temporada de invierno la planta no sobrepasó los 50 cm de alto y las hojas eran pequeñas. Los pocos tratamientos que se hicieron en los individuos de la temporada de verano no mostraron abortos. Estas dos temporadas se diferencian por las horas luz que hay en un día, durante el verano los días son más largos que las noches y en invierno los días son más cortos y las noches largas. Existen trabajos que mencionan que la germinación de semillas, crecimiento y floración de las plantas se ve beneficiado por un fotoperiodo alto y prolongado (Jackson, 2009; Osnato et al., 2022). Algunas especies de *Physalis* al ser sembradas en diferentes estaciones del año muestran diferencias en su crecimiento y productividad (Torres Tanan et al., 2021), por lo tanto *P. nicandroides* de invierno probablemente se vio limitado por las condiciones climáticas lo que la llevó a presentar frutos abortados.

VIII. CONCLUSIONES

Las plantas de *Physalis* que se estudiaron presentan sistemas de apareamiento distintos, en el caso de *P. cinerascens* es autoincompatible y requiere de otras poblaciones para la producción de frutos, presenta un sistema de xenogamia, aunque algunos individuos podrían estar perdiendo el sistema de autoincompatibilidad. A pesar de no tener una alta producción de frutos, no tiene ninguna desventaja porque presenta un rizoma que le permite sobrevivir año tras año, lo cual favorece su proliferación. Caso contrario con *P. nicandroides* que es autocompatible y el sistema de apareamiento que presenta es autógama facultativa, pero con una productividad baja de frutos y semillas en la polinización cruzada, ambas plantas no presentan apomixis.

Conocer la interacción polen-pistilo en las plantas implica muchos mecanismos moleculares y genéticos. La técnica de azul de anilina utilizada para microscopía de fluorescencia ayuda a tener un acercamiento observacional de cómo germina el tubo polínico y cuánto tiempo tarda en llegar a los óvulos, sin embargo, no se asegura la fecundación cuando el tubo polínico llega a los óvulos porque existe la autoincompatibilidad poscigótica. Los tratamientos de cruce artificial es un acercamiento para conocer el tipo de polinización que pueden tener las plantas ya que controla qué poblaciones o individuos se están polinizando.

A pesar de que *P. cinerascens* y *P. nicandroides* no presentan gran importancia económica como otras especies dentro de la familia Solanaceae, es importante conocer los sistemas de incompatibilidad y apareamiento. Esto puede ser una herramienta cuando se trata de cultivos para mejorar las prácticas de polinización y mejoramiento genético. También para estudios ecológicos, debido a la alta fragmentación y perturbación del hábitat se están perdiendo muchas interacciones de plantas con polinizadores y aquellas que son autoincompatibles tendrán una limitación de polen cruzado y es posible que las plantas cambien a un sistema autocompatible.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar, R., Ashworth, L., Galetto, L., & Aizen, M. A. (2006). Plant reproductive susceptibility to habitat fragmentation: Review and synthesis through a meta-analysis. In *Ecology Letters* (Vol. 9, Issue 8, pp. 968–980). <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2006.00927.x>
- Aloisi, I., Distefano, G., Antognoni, F., Potente, G., Parrotta, L., Faleri, C., Gentile, A., Bennici, S., Mareri, L., Cai, G., & Del Duca, S. (2020). Temperature-Dependent Compatible and Incompatible Pollen-Style Interactions in *Citrus clementina* Hort. ex Tan. Show Different Transglutaminase Features and Polyamine Pattern. *Frontiers in Plant Science*, 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01018>
- Azeez, S. O., & Faluyi, J. O. (2018). Hybridization in four Nigerian *Physalis* (Linn.) species. *Not. Sci. Biol.*, 10(2), 205–210.
- Bolmgren, K., Eriksson, O., & Linder, H. P. (2003). Contrasting flowering phenology and species richness in abiotically pollinated angiosperms. In *Evolution* (Vol. 57, Issue 9).
- Brito, M. S., Bertolino, L. T., Cossalter, V., Quiapim, A. C., DePaoli, H. C., Goldman, G. H., Teixeira, S. P., & Goldman, M. H. S. (2015). Pollination triggers female gametophyte development in immature *Nicotiana tabacum* flowers. *Frontiers in Plant Science*, 6, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00561>
- Broz, A. K., & Bedinger, P. A. (2021). Pollen-pistil interactions as reproductive barriers. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 72, 615–639. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-080620>
- Broz, A. K., Randle, A. M., Sianta, S. A., Tovar-Méndez, A., McClure, B., & Bedinger, P. A. (2017). Mating system transitions in *Solanum habrochaites* impact interactions between populations and species. *New Phytologist*, 213(1), 440–454. <https://doi.org/10.1111/nph.14130>
- Broz, A. K., Simpson-Van Dam, A., Tovar-Méndez, A., Hahn, M. W., McClure, B., & Bedinger, P. A. (2021). Spread of self-compatibility constrained by an intrapopulation crossing barrier. *New Phytologist*, 231(2), 878–891. <https://doi.org/10.1111/nph.17400>
- Campbell, D. R., & Halama, K. J. (1993). Resource and Pollen Limitations to Lifetime Seed Production in a Natural Plant Population. *Ecology*, 74(4), 1043–1051.
- Charlesworth, D., & Charlesworth, B. (1987). Inbreeding depression and its evolutionary consequences. In *Ann. Rev. Ecol. Syst* (Vol. 18). www.annualreviews.org
- Cortés-Flores, J., Hernández-Esquivel, K., González-Rodríguez, A., & Ibarra-Manríquez, G. (2017). Flowering phenology, growth forms, and pollination syndromes in tropical dry forest species: Influence of phylogeny and abiotic factors. *American Journal of Botany*, 104(1), 39–49. <https://doi.org/10.3732/ajb.1600305>

- Crispim, J. G., Rêgo, E. R., Rêgo, M. M., Nascimento, N. F. F., & Barroso, P. A. (2017). Receptividade estigmática e deiscência das anteras em pimenteiras ornamentais. *Horticultura Brasileira*, 35(4), 609–612. <https://doi.org/10.1590/s0102-053620170421>
- Cruden, R. W. (1976). Intraspecific Variation in Pollen-Ovule Ratios and Nectar Secretion- Preliminary Evidence of Ecotypic Adaptation. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 63(2), 277. <https://doi.org/10.2307/2395306>
- Cruden, R. W. (1977). Pollen-Ovule Ratios: A conservation indicator of Breeding Systems in flowering plants. *Evolution*, 31(1), 32–46. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1977.tb00979.x>
- Currier, H. B. (1957). Callose substance in plant cells. *American Journal of Botany*, 44, 478–488.
- Dumas, C., & Knox, R. B. (1983). Callose and determination of pistil viability and incompatibility. In *Theor Appl Genet* (Vol. 67). Springer-Verlag.
- Eckert, C. G., & Barrett, S. C. H. (1994). Post-pollination mechanisms and the maintenance of outcrossing in self-compatible, tristylous, *Decodon verticillatus* (Lythraceae). *Heredity*, 72, 396–411.
- Eckert, C. G., Kalisz, S., Geber, M. A., Sargent, R., Elle, E., Cheptou, P. O., Goodwillie, C., Johnston, M. O., Kelly, J. K., Moeller, D. A., Porcher, E., Ree, R. H., Vallejo-Marín, M., & Winn, A. A. (2010). Plant mating systems in a changing world. In *Trends in Ecology and Evolution* (Vol. 25, Issue 1, pp. 35–43). <https://doi.org/10.1016/j.tree.2009.06.013>
- Elleman, C. J., & Dickinson, H. G. (1986). Pollen-stigma interactions in *Brassica*. IV. Structural reorganization in the pollen grains during hydration. *Journal of Cell Science*, 80, 141–157. <https://doi.org/10.1242/jcs.80.1.141>
- Elzinga, J. A., Atlan, A., Biere, A., Gigord, L., Weis, A. E., & Bernasconi, G. (2007). Time after time: flowering phenology and biotic interactions. In *Trends in Ecology and Evolution* (Vol. 22, Issue 8, pp. 432–439). <https://doi.org/10.1016/j.tree.2007.05.006>
- Ferreira, J. A. B., Ledo, C. A. S., Souza, F. V.D., Conceição, J. Q., Rossi, M. L., & Souza, E. H. (2021). Stigma structure and receptivity in papaya (*Carica papaya* L.). *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*, 93(1). <https://doi.org/10.1590/0001-3765202120190605>
- Figueiredo, M. C. C., Passos, A. R., Hughes, F. M., Santos, K. S. dos, Silva, A. L. da, & Soares, T. L. (2020). Reproductive biology of *Physalis angulata* L. (Solanaceae). *Scientia Horticulturae*, 267. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109307>
- Franklin-Tong, V. E., & Franklin, F. C. H. (2003a). Gametophytic self-incompatibility inhibits pollen tube growth using different mechanisms. In *Trends in Plant Science*

- (Vol. 8, Issue 12, pp. 598–605). Elsevier Ltd.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2003.10.008>
- Franklin-Tong, V. E., & Franklin, F. C. H. (2003b). The different mechanisms of gametophytic self-incompatibility. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 358(1434), 1025–1032. <https://doi.org/10.1098/rstb.2003.1287>
- Franklin-Tong, V. E., Holdaway-Clarke, T. L., Straatman, K. R., Kunkel, J. G., & Hepler, P. K. (2002). Involvement of extracellular calcium influx in the self-incompatibility response of *Papaver rhoeas*. *Plant Journal*, 29(3), 333–345.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2002.01219.x>
- Franklin-Tong, V. E., Ride, J. P., Read, N. D., Trewavas, A. J., & Christopher, F. (1993). The self-incompatibility response in *Papaver rhoeas* is mediated by cytosolic free calcium. *Plant Journal*, 4(1), 163–177. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1993.04010163.x>
- Fujii, S., Kubo, K. I., & Takayama, S. (2016). Non-self- and self-recognition models in plant self-incompatibility. In *Nature Plants* (Vol. 2, Issue 9). Palgrave Macmillan Ltd.
<https://doi.org/10.1038/nplants.2016.130>
- Galen, C., & Plowright, D. R. C. (1987). Testing the accuracy of using peroxidase activity to indicate stigma receptivity. *Can. J. Bot.*, 65, 107–111. www.nrcresearchpress.com
- Geiger, J. H., Pratt, P. D., & Koptur, S. (2010). Breeding system of *Ruellia succulenta* small (Acanthaceae). *Castanea*, 75(4), 454–460. <https://doi.org/10.2179/09-030.1>
- Gibbs, P. E. (2014). Late-acting self-incompatibility - the pariah breeding system in flowering plants. *New Phytologist*, 203(3), 717–734.
<https://doi.org/10.1111/nph.12874>
- Gibbs, P. E., & Talavera, S. (2001). Breeding system studies with three species of *Anagallis* (Primulaceae): Self-incompatibility and reduced female fertility in *A. monelli* L. *Annals of Botany*, 88(1), 139–144. <https://doi.org/10.1006/anbo.2001.1439>
- Harrell, F. E., & Dupont, C. (2019). *Hmisc: Harrell Miscellaneous* (4.2-0).
- He, G., Hu, F., Ming, J., Liu, C., & Yuan, S. (2017). Pollen viability and stigma receptivity in *Lilium* during anthesis. *Euphytica*, 213(10). <https://doi.org/10.1007/s10681-017-2019-9>
- Heizmann, P., Luu, D. T., & Dumas, C. (2000). Pollen-stigma adhesion in the Brassicaceae. *Annals of Botany*, 85(SUPPL. A), 23–27.
<https://doi.org/10.1006/anbo.1999.1057>
- Herrero, M., & Dickinson, H. G. (1979). Pollen- pistil Incompatibility in *Petunia hybrida*: Changes in the pistil following compatible compatible and incompatible intraspecific crosses. In *J. Cell Sci* (Vol. 36).

- Herrero, M., & Hormaza, J. I. (1996). Pistil strategies controlling tube growth. *Sex Plant Reprod.*, 9, 343–347.
- Heslop-Harrison, J. (1975). Incompatibility and the pollen-stigma interaction. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 26, 403–428. www.annualreviews.org
- Heslop-Harrison, Y., & Shivanna, K. R. (1977). The Receptive Surface of the Angiosperm Stigma. In *Ann. Bot* (Vol. 41).
- Hiscock, S. J. (2000). Self-incompatibility in *Senecio squalidus* L. (Asteraceae). *Annals of Botany*, 85(SUPPL. A), 181–190. <https://doi.org/10.1006/anbo.1999.1058>
- Hiscock, S. J., & Allen, A. M. (2008). Diverse cell signalling pathways regulate pollen-stigma interactions: The search for consensus. In *New Phytologist* (Vol. 179, Issue 2, pp. 286–317). <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02457.x>
- Hiscock, S. J., & Kües, U. (1999). Cellular and molecular mechanisms of sexual incompatibility in plants and fungi. In *International Review of Cytology* (Vol. 193, pp. 165–295). Academic Press Inc. [https://doi.org/10.1016/s0074-7696\(08\)61781-7](https://doi.org/10.1016/s0074-7696(08)61781-7)
- Hiscock, S. J., Tabah, D. A., Charlesworth, D., & Stephenson, A. G. (2003). The different mechanisms of sporophytic self-incompatibility. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 358(1434), 1037–1045. <https://doi.org/10.1098/rstb.2003.1297>
- Hodnett, G. L., & Rooney, W. (2005). Pollen-pistil interactions result in reproductive isolation between *Sorghum bicolor* and divergent *Sorghum* species. *Crop Sci.*, 45, 1403–1409. <https://doi.org/10.2135/cropsci.2004.0429>
- Hokanson, K., & Hancock, J. (2000). Early-acting inbreeding depression in three species of *Vaccinium* (Ericaceae). *Sex. Plant. Reprod.*, 13, 145–150.
- Hothorn, T., Bretz, F., & Westfall, P. (2008). Simultaneous Inference in General Parametric Models. *Biometrical Journal*, 50(3), 346–363.
- Igic, B., Bohs, L., & Kohn, J. R. (2003). Historical inferences from the self-incompatibility locus. *New Phytologist*, 161(1), 97–105. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00952.x>
- Igic, B., Bohs, L., & Kohn, J. R. (2006). Ancient polymorphism reveals unidirectional breeding system shifts. *PNAS*, 103(5), 1359–1363. www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.0506283103
- Igic, B., & Kohn, J. R. (2001). Evolutionary relationships among self-incompatibility RNases. *PNAS*, 98(23), 13167–13171. www.pnas.org.
- ISTA, International Seed Testing Association. (2016). Reglas internacionales para el análisis de las semillas 2016. In *International Rules for Seed Testing* (Vol. 2016, Issue 1). International Seed Testing Association. <https://doi.org/10.15258/istarules.2016.f>

- Jackson, S. D. (2009). Plant responses to photoperiod. In *New Phytologist* (Vol. 181, Issue 3, pp. 517–531). <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02681.x>
- Károlyi, K. (1992). Pollinator limitation in the facultatively autogamous annual, *Lupinus nanus* (LEGUMINOSAE). *American Journal of Botany*, 79(1), 49–56. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1992.tb12622.x>
- Kubo, K., Entani, T., Takara, A., Wang, N., Fields, A. M., Hua, Z., Toyoda, M., Kawashima, S., Ando, T., Isogai, A., Kao, T., & Takayama, S. (2010). Collaborative Non-Self recognition system in S-RNase-Based Self-incompatibility. *Science*, 330, 790–796. <https://doi.org/10.1126/science.1184334>
- Lawrence, W. S. (1993). Resource and pollen limitation: plant size-dependent reproductive patterns in *Physalis longifolia*. *Am. Nat.*, 141(2), 296–313. <http://www.journals.uchicago.edu/t-and-c>
- Liang, M., Cao, Z., Zhu, A., Liu, Y., Tao, M., Yang, H., Xu, Q., Wang, S., Liu, J., Li, Y., Chen, C., Xie, Z., Deng, C., Ye, J., Guo, W., Xu, Q., Xia, R., Larkin, R. M., Deng, X., ... Chai, L. (2020). Evolution of self-compatibility by a mutant Sm -RNase in *Citrus*. *Nature Plants*, 6(2), 131–142. <https://doi.org/10.1038/s41477-020-0597-3>
- Lloyd, D. G. (1992). Self- and Cross-Fertilization in Plants. II. The Selection of Self-Fertilization. In *Journal of Plant Sciences* (Vol. 153, Issue 3). <https://about.jstor.org/terms>
- Lugo, G. (2020). Describen moléculas con efecto toxico sobre células de cáncer de mama. *Gaceta UNAM*, 4–5.
- Maldonado, E., Torres, F. R., Martínez, M., & Pérez-Castorena, A. L. (2006). Sucrose esters from the fruits of *Physalis nicandroides* var. *attenuata*. *Journal of Natural Products*, 69(10), 1511–1513. <https://doi.org/10.1021/np060274l>
- Márquez, J., Wong, R., Pérez, M., López, L., & Munguía, G. (Eds.). (2016). *Técnicas de laboratorio para el estudio del desarrollo en angiospermas* (1st ed.).
- Martén-Rodríguez, S., & Fenster, C. B. (2008). Pollination ecology and breeding systems of five *Gesneria* species from Puerto Rico. *Annals of Botany*, 102(1), 23–30. <https://doi.org/10.1093/aob/mcn056>
- Martin, F. W. (1958). Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. *Stain Technology*, 125–128.
- Martínez, M. (2020). *Physalis* L. In Martínez Mahinda, Montero Juan Carlos, A. Dean Ellen, Bye Robert, Luna-Cavazos Mario, Medina José Miguel, & Rzedowski Jerzy (Eds.), *Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes Solanaceae I* (Vol. 218, pp. 158–211). <http://inecolbajio.inecol.mx/floradelbajio/>

- Martínez, M., Vargas-Ponce, O., Rodríguez, A., Chiang, F., & Ocegueda, S. (2017). Solanceae family in Mexico. *Botanical Sciences*, 95(1), 131–145. <https://doi.org/10.17129/botsci.658>
- Martínez, M., Vargas-Ponce, O., & Zamora-Tavares, P. (2023). Taxonomic revision of *Physalis* in Mexico. In *Frontiers in Genetics* (Vol. 14). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fgene.2023.1080176>
- Martínez, S., Salas, P., Aguilar-Galván, F., & Hernández-Sandoval, L. (2021). Plantas silvestres comestibles de la Barreta, Querétaro, México y su papel en la cultura alimentario local. *Revista Etnobiología*, 19, 41–62.
- Martínez-García, P. J., Dicenta, F., & Ortega, E. (2012). Anomalous embryo sac development and fruit abortion caused by inbreeding depression in almond (*Prunus dulcis*). *Scientia Horticulturae*, 133(1), 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.10.001>
- Mccubbin, A. G., & Kao, T.-H. (2000). Molecular recognition and response in pollen and pistil interactions. In *Annu. Rev. Cell Dev. Biol* (Vol. 16). www.annualreviews.org
- Menzel, M. Y. (1951). The Cytotaxonomy and genetics of *Physalis*. *American Philosophical Society*, 95(2), 132–183.
- Mori, T., Kuroiwa, H., Higashiyama, T., & Kuroiwa, T. (2006). Generative Cell Specific 1 is essential for angiosperm fertilization. *Nature Cell Biology*, 8(1), 64–71.
- Nasrallah, J. B., Kao, T. H., Goldberg, M. L., & Nasrallah, M. E. (1985). A cDNA clone encoding an S-locus-specific glycoprotein from Brassica oleracea. *Nature*, 318, 263–267.
- Ortiz, M. Á., Talavera, S., Garcia-Castaño, J. L., Tremetsberger, K., Stuessy, T., Balao, F., & Casimiro-Soriguer, R. (2006). Self-incompatibility and floral parameters in *Hypochaeris* sect. *Hypochaeris* (Asteraceae). *American Journal of Botany*, 93(2), 234–244. <https://doi.org/10.3732/ajb.93.2.234>
- Osnato, M., Cota, I., Nebhnani, P., Cereijo, U., & Pelaz, S. (2022). Photoperiod Control of Plant Growth: Flowering Time Genes Beyond Flowering. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.805635>
- Paape, T., & Kohn, J. R. (2011). Differential strengths of selection on S-RNases from *Physalis* and *Solanum* (Solanaceae). *BMC Evolutionary Biology*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-243>
- Pretz, C., & Smith, S. D. (2022). Intraspecific breakdown of self-incompatibility in *Physalis acutifolia* (Solanaceae). *AoB PLANTS*, 14(1). <https://doi.org/10.1093/aobpla/plab080>

- Pretz, C., & Smith, S. D. (2023). How does a self-incompatible individual transition to self-compatibility during its lifetime? In *American Journal of Botany* (Vol. 110, Issue 4). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/ajb2.16150>
- R Core Team. (2023). *A Language and Environment for Statistical Computing* (4.3.2). The R Foundation for Statistical Computing. <https://www.r-project.org/>
- Santiaguillo, H. J. F., & Blas, Y. S. (2009). Aprovechamiento tradicional de las especies de *Physalis* en México. *Revista de Geografía Agrícola*, 43, 81–86. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=75715608006>
- Schopfer, C. R., Nasrallah, M. E., & Nasrallah, J. B. (1999). The Male Determinant of Self-Incompatibility in *Brassica*. *Science*, 286, 1697–1700. www.sciencemag.org
- Sijacic, P., Wang, X., Skirpan, A. L., Wang, Y., Dowd, P. E., McCubbin, A. G., Huang, S., & Kao, T. (2004). Identification of the pollen determinant of S-RNase-mediated self-incompatibility. *Nature*, 429, 298–302. <https://doi.org/10.1038/nature02545>
- Silva, N. F., & Goring, D. R. (2001). Review Mechanisms of self-incompatibility in flowering plants. *Cell. Mol. Life Sci.*, 58, 1988–2007.
- Smith, M. M., & McCully, M. E. (1978). A Critical Evaluation of the Specificity of Aniline Blue Induced Fluorescence. In *Protoplasma* (Vol. 95).
- Śnieżko, R. (2000). Fluorescence Microscopy of Aniline Blue Stained Pistils. In W. V. Dashek (Ed.), *Methods in Plant Electron Microscopy and Cytochemistry* (Humana Press, pp. 81–86).
- Soares, T. L., de Jesús, O. N., de Souza, E. H., & de Oliveira, E. J. (2015). Reproductive biology and pollen-pistil interactions in *Passiflora* species with ornamental potential. *Scientia Horticulturae*, 197, 339–349. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.045>
- Solís-Montero, L., Aceves-Chong, L., Vega-Polanco, M., & Vargas-Ponce, O. (2021). Changes in Reproductive Traits in *Physalis philadelphica*; An Unexpected Shift Toward Self-Incompatibility in a Domesticated Annual Fruit Crop. *Frontiers in Plant Science*, 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.658406>
- Stein, J. C., Howlett, B., Boyes, D. C., Nasrallah, M. E., & Nasrallah, J. B. (1991). Molecular cloning of a putative receptor protein kinase gene encoded at the self-incompatibility locus of *Brassica oleracea* (cell recognition/S locus). In *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (Vol. 88).
- Stephenson, A. G. (1981). Flower and fruit abortion: proximate causes and ultimate. In *Ann. Rev. Ecol Syst* (Vol. 12). www.annualreviews.org
- Stone, J. L., Vanwyk, E. J., & Hale, J. R. (2014). Transmission advantage favors selfing allele in experimental populations of self-incompatible *Witheringia solanacea* (Solanaceae). *Evolution*, 68(7), 1845–1855. <https://doi.org/10.5061/dryad.f8539>

- Sullivan, J. R. (1984). Pollination biology of *Physalis viscosa* var. *cinerascens* (Solanaceae). *American Journal of Botany*, 71(6), 815–820. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1984.tb14146.x>
- Swanson, R., Edlund, A. F., & Preuss, D. (2004). Species specificity in pollen-pistil interactions. In *Annual Review of Genetics* (Vol. 38, pp. 793–818). <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.38.072902.092356>
- Takayama, S., & Isogai, A. (2005). Self-incompatibility in plants. In *Annual Review of Plant Biology* (Vol. 56, pp. 467–489). <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144249>
- Takayama, S., Shiba, H., Iwano, M., Shimosato, H., Che, F.-S., Kai, N., Watanabe, M., Suzuki, G., Hinata, K., & Isogai, A. (2000). The pollen determinant of self-incompatibility in *Brassica campestris*. *PNAS*, 97(4), 1920–1925. www.pnas.org
- Takebayashi, N., & Morrell, P. L. (2001). Is self-fertilization an evolutionary dead end? Revisiting an old hypothesis with genetic theories and a macroevolutionary approach. *American Journal of Botany*, 88(7), 1143–1150. <https://doi.org/10.2307/3558325>
- Torres, F. R., Pérez-Castorena, A. L., Arredondo, L., Toscano, R. A., Nieto-Camacho, A., Martínez, M., & Maldonado, E. (2019). Labdanes, Withanolides, and Other Constituents from *Physalis nicandroides*. *Journal of Natural Products*, 82(9), 2489–2500. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b00233>
- Torres Tanan, T., Leite da Silva, A., da Silva Leite, R., Soares Arriero, S., & Neves do Nascimento, M. (2021). *Physalis* growth, development and yield at different sowing seasons in the brazilian northeastern semiarid. *Colloquium Agrarie*, 17(1), 36–43. <https://doi.org/10.5747/ca.2021.v17.n1.a418>
- Vallejo-Marín, M., & Uyenoyama, M. K. (2004). On the evolutionary costs of self-incompatibility: Incomplete reproductive compensation due to pollen limitation. *Evolution*, 58(9), 1924–1935. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2004.tb00480.x>
- Vargas-Ponce, Valdivia-Mares, & Sánchez-Martínez. (2015). Potencial alimenticio de los tomates de cáscara (*Physalis* spp.) de México. *Agroproductividad*, 8(1), 17–23.
- Visikol a bico company. (2018). *Visikol Histo*. Visikol a Bico Company. <https://visikol.com/products/visikol-histo/>
- Wang, H. J., Huang, J. C., & Jauh, G. Y. (2010). Pollen germination and tube growth. In *Advances in Botanical Research* (Vol. 54, Issue C). [https://doi.org/10.1016/S0065-2296\(10\)54001-1](https://doi.org/10.1016/S0065-2296(10)54001-1)
- Weber, J. J., & Goodwillie, C. (2013). Variation in floral longevity in the genus *Leptosiphon*: Mating system consequences. *Plant Biology*, 15(1), 220–225. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2012.00595.x>

- Wheeler, M. J., Franklin-Tong, V. E., & Franklin, F. C. H. (2001). The molecular and genetic basis of pollen-pistil interactions. In *New Phytologist* (Vol. 151, Issue 3, pp. 565–584). <https://doi.org/10.1046/j.0028-646x.2001.00229.x>
- Wyatt, R. (1981). The reproductive biology of *Asclepias tuberosa*. Factors determining fruit-set. *New Phytologist*, 88(2), 375–385. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1981.tb01732.x>
- Xie, D. R., Ma, X. S., Rahman, M. Z., Yang, M. C., Huang, X. M., Li, J. G., & Wang, H. C. (2019). Thermo-sensitive sterility and self-sterility underlie the partial seed abortion phenotype of *Litchi chinensis*. *Scientia Horticulturae*, 247, 156–164. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.11.083>
- Xiong, H., Zou, F., Guo, S., Yuan, D., & Niu, G. (2019). Self-sterility may be due to prezygotic late-acting self-incompatibility and early-acting inbreeding depression in Chinese chestnut. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 144(3), 172–181. <https://doi.org/10.21273/JASHS04634-18>
- Yi, W., Law, S. E., McCoy, D., & Wetzstein, H. Y. (2006). Stigma development and receptivity in almond (*Prunus dulcis*). *Annals of Botany*, 97(1), 57–63. <https://doi.org/10.1093/aob/mcj013>
- Zeisler, M. (1933). Über die Abgrenzung des eigentlichen Narbenfläche mit Hilfe von Reaktionen. *Beitr. Bot. Zentl. A*, 58, 308–318.
- Zheng, Y. Y., Lin, X. J., Liang, H. M., Wang, F. F., & Chen, L. Y. (2018). The long journey of pollen tube in the pistil. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 19, Issue 11). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms19113529>