

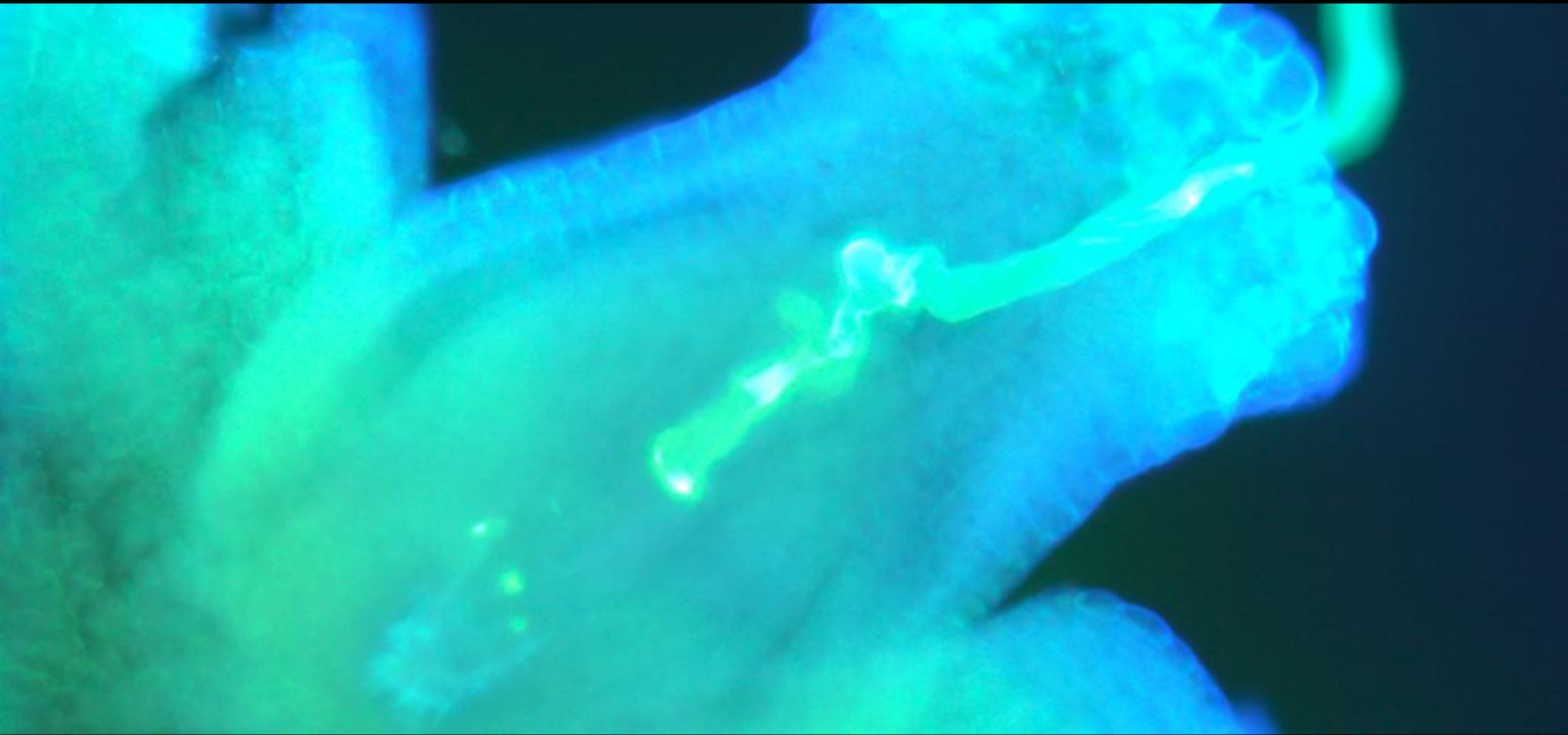
Tesis doctoral

Biología reproductiva del pawpaw [*Asimina triloba* (L.) Dunal]

Cristina Ferrer Blanco

Directores de tesis:

Dr. José Ignacio Hormaza Urroz y Dr. Jorge Lora Cabrera



Málaga, 2023

Programa de doctorado: Diversidad Biológica y Medio Ambiente



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTORA: Cristina Ferrer Blanco

 <https://orcid.org/0000-0002-3456-917X>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es



**“Science is not about building a body of known ‘facts’.
It is a method for asking awkward questions and subjecting
them to a reality-check, thus avoiding the human tendency
to believe whatever makes us feel good.”**

Terry Pratchett, The Science Of Discworld



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Tesis Doctoral

Biología reproductiva del pawpaw

[*Asimina triloba* (L.) Dunal]

Memoria de tesis doctoral presentada por Cristina Ferrer Blanco para optar al grado de Doctora por la Universidad de Málaga, programa de Doctorado “Diversidad Biológica y Medio Ambiente”.

Directores:

Dr. José Ignacio Hormaza Urroz, Profesor de Investigación

Dr. Jorge Lora Cabrera

Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora”

(IHSM-UMA-CSIC)

Málaga, octubre de 2023



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR

D./Dña CRISTINA FERRER BLANCO

Estudiante del programa de doctorado DIVERSIDAD BIOLÓGICA Y MEDIO AMBIENTE de la Universidad de Málaga, autor/a de la tesis, presentada para la obtención del título de doctor por la Universidad de Málaga, titulada: BIOLOGÍA REPRODUCTIVA DEL PAWPAW [ASIMINA TRILOBA (L.) DUNAL].

Realizada bajo la tutorización de ANTONIO FLORES MOYA y dirección de JOSÉ IGNACIO HORMAZA URROZ Y JORGE LORA CABRERA (si tuviera varios directores deberá hacer constar el nombre de todos)

DECLARO QUE:

La tesis presentada es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, conforme al ordenamiento jurídico vigente (Real Decreto Legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo.

Igualmente asumo, ante a la Universidad de Málaga y ante cualquier otra instancia, la responsabilidad que pudiera derivarse en caso de plagio de contenidos en la tesis presentada, conforme al ordenamiento jurídico vigente.

En Málaga, a 28 de SEPTIEMBRE de 2023

Fdo.: CRISTINA FERRER BLANCO Doctorando/a	Fdo.: ANOTNIO FLORES MOYA Tutor/a
Fdo.: JOSÉ IGNACIO HORMAZA URROZ, JORGE LORA CABRERA	





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



Escuela de Doctorado

Director/es de tesis

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



EFQM AENOR



Edificio Pabellón de Gobierno. Campus El Ejido.
29071
Tel.: 952 13 10 28 / 952 13 14 61 / 952 13 71 10
E-mail: doctorado@uma.es

D. José Ignacio Hormaza Urroz, Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas en el Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora”, y Jorge Lora Cabrera, Científico Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas en el Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora”.

CERTIFICAN

Que Cristina Ferrer Blanco, “Graduada en Biología”, ha realizado en el Departamento de Fruticultura del Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora” (IHSM-UMA-CSIC), bajo su dirección, el trabajo de investigación con el título “Biología reproductiva del pawpaw [*Asimina triloba* (L.) Dunal]” y la publicación ` Ferrer-Blanco C, Hormaza JI, Lora J. 2022. Phenological growth stages of “pawpaw” [*Asimina triloba* (L.) Dunal, Annonaceae] according to the BBCH scale. *Scientia Horticulturae* 295: 110853´ que avala la tesis y que no ha sido utilizada en tesis anteriores y que presenta para optar al grado de Doctora, y en cumplimiento de la legislación vigente

AUTORIZA

Su lectura en la Universidad de Málaga

En Algarrobo-Costa a 28 de septiembre de 2023.

Fdo. Dr. José Ignacio Hormaza

Fdo. Dr. Jorge Lora



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



D. Antonio Flores Moya, Catedrático en el Departamento de Botánica y Fisiología Vegetal adscrito al Programa de Doctorado de Diversidad Biológica y Medio Ambiente en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga

CERTIFICA

Que Cristina Ferrer Blanco, “Graduada en Biología”, ha realizado en el Departamento de Fruticultura del Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora” (IHSM-UMA-CSIC), bajo su tutorización, el trabajo de investigación con el título “Biología reproductiva del pawpaw [*Asimina triloba* (L.) Dunal]” y la publicación ` Ferrer-Blanco C, Hormaza JI, Lora J. 2022. Phenological growth stages of “pawpaw” [*Asimina triloba* (L.) Dunal, Annonaceae] according to the BBCH scale. *Scientia Horticulturae* 295: 110853’ que avala la tesis y que no ha sido utilizada en tesis anteriores y que presenta para optar al grado de Doctora, y en cumplimiento de la legislación vigente

AUTORIZA

Su lectura en la Universidad de Málaga

En Málaga a 28 de septiembre de 2023.

Fdo. Dr. Antonio Flores Moya





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



Este trabajo se ha realizado en el Departamento de Fruticultura del Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea La Mayora (IHSM La Mayora – UMA - CSIC), gracias a la financiación de una ayuda predoctoral para la formación de personal investigador (FPI) (BES-2017-082558) del Ministerio de Economía y Competitividad de España asociada al proyecto (AGL2016-77267-R).



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Agradecimientos

Quisiera agradecer su contribución a todas las personas que me han acompañado durante esta aventura.

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores de tesis haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo de investigación. A Iñaki Hormaza le agradezco su tiempo e inestimables aportaciones. A Jorge Lora su paciencia, guía, ánimos y su buena disposición. Gracias a Antonio Flores, tutor académico de esta tesis, siempre dispuesto a ayudarme con los trámites administrativos.

Quiero dar las gracias a Ned Friedman, al equipo del Friedman lab y del Arnold Arboretum y a mis compañeros de la Weld Hill House por acogirme durante mi estancia.

Gracias a todos los compañeros del departamento de Fruticultura y del *cuartito*, me hicisteis sentir como en casa desde el primer día. Gracias a Yoli, Librada, Alicia, Juan Losada, Sonia, Petri, Noé, Ruth, Jorge G. También agradecer los momentos que he pasado con el resto de compañeros de La Mayora, en especial con Cañi, Ana Cris, Irene, Reme, Efrén, Isa, Adri, Lidia, Juan D., Fali.

También quisiera agradecer a todos los que han participado en mi formación científica previa, en particular a Miguel Ángel Quesada y Antonio Matas, gracias a vuestro ejemplo mantengo la ilusión por lo que hago.

Quiero dar las gracias a mi familia, por haberme ayudado a llegar a este punto del camino. A mis padres: Mario y Sensi por inculcarme el valor de la constancia y la pasión por el saber, a mi hermana María por su apoyo incondicional.

Gracias a Giacomo por hacer posible que gran parte de esta tesis haya sido escrita desde una buhardilla en la Toscana, por su cariño en la cercanía y en la distancia pero, sobre todo, gracias por creer en mí. A Meche que vino de estancia predoctoral pero realmente llegó a revolucionar mis esquemas mentales, gracias por tu maravillosa conversación y por ser mi compañera de viajes. Por supuesto, toda esta batalla habría sido mucho más difícil sin mi *twin* (María), ha sido genial poder contar con tu positividad, resiliencia y tus valiosos consejos en lo profesional y en lo personal.

Gracias a mis amigos más cercanos que siempre han estado ahí acompañándome. Niko y Laura con vuestros ánimos no me ayudáis a mantener los pies en la tierra, gracias por los buenos momentos y por rebosar de orgullo cada vez que hablo sobre mi trabajo. Estela, gracias por los ataques de risa y por ser mi refugio en los peores momentos. A Nacho y Paloma por sacar siempre tiempo para verme. A Isa y David por ofrecerme las mejores meriendas y cenas. Hare todo lo posible por corresponderos.

Finalmente, quiero dar las gracias a las instituciones responsables de esta tesis: al CSIC, a la Universidad de Málaga y a la beca del Ministerio de Economía y Competitividad que me fue otorgada.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

ÍNDICE

RESUMEN	1
SUMMARY	3
Introducción general	7
Taxonomía, origen y distribución	7
Condiciones ambientales del cultivo.....	9
Biología reproductiva en angiospermas	9
Biología floral de <i>A. triloba</i>	10
El viaje del tubo polínico	11
La evolución del camino del tubo polínico en angiospermas	11
Sistemas de autoincompatibilidad floral	12
Sistema de incompatibilidad tardía poscigótica y depresión endogámica	14
Objetivos	19
Capítulo 1: Caracterización de la fenología de <i>Asimina triloba</i> (pawpaw) mediante la escala BBCH.....	23
Resumen	23
Introducción	24
Material y métodos.....	24
Resultados y discusión	25
Capítulo 2: Desarrollo del embrión y el endospermo ruminado en una angiosperma con caracteres plesiotípicos, <i>Asimina triloba</i> (Annonaceae).....	37
Resumen	37
Introducción	38
Material y Métodos	40
Resultados	42
Discusión.....	51
Capítulo 3: Sistema de Incompatibilidad Tardía (SIT) en <i>Asimina triloba</i> (pawpaw). Mecanismo e identificación y análisis de los genes implicados en el proceso.....	59
Resumen	59
Introducción	60
Material y métodos.....	62
Resultados	67
Discusión.....	76
Discusión general	83
Fenología de <i>Asimina triloba</i> y su adaptación a climas templados.....	83
Biología reproductiva de <i>Asimina triloba</i>	84
Sistema de incompatibilidad de acción tardía (SIT) poscigótico en <i>Asimina triloba</i> , un abordaje macroscópico, histológico y transcriptómico	85

La evolución del sistema de incompatibilidad en angiospermas	87
Conclusiones	91
Bibliografía	95
ANEXO 1	108
ANEXO 2	109

RESUMEN

El pawpaw (*Asimina triloba* [L.] Dunal) es un árbol frutal de hoja caduca nativo del este de Norteamérica donde se cultiva y comercializa a nivel local. Un rasgo que lo hace particularmente interesante es que, aun estando adaptado a clima templado, presenta un sabor y aroma tropical en sus frutos. Debido a estas características únicas tiene un claro nicho de expansión como cultivo en la mayoría de países europeos con clima templado. El pawpaw presenta la particularidad de tener un inexplorado sistema de incompatibilidad, que se añade a la dicogamia protogínica que es común dentro de las anonáceas para evitar el autocruzamiento. Además, este árbol frutal tiene una posición clave entre las angiospermas ya que pertenece a la familia Annonaceae, linaje de divergencia temprana en las plantas de flor. Con el objetivo de proporcionar herramientas que ayuden a su manejo agronómico y contribuir a la ampliación en el conocimiento sobre la evolución de las angiospermas, este trabajo se ha desarrollado con tres objetivos: (1) caracterizar los estados fenológicos de *A. triloba* en base a la escala BBCH, (2) realizar un estudio histológico detallado sobre la embriología de *A. triloba* y (3) caracterizar de manera macroscópica, histológica y transcriptómica su sistema de autoincompatibilidad floral.

Los estudios fenológicos realizados indican que el pawpaw muestra una buena adaptación al clima mediterráneo del sur de España. La descripción de las etapas fenológicas de esta especie según la escala BBCH extendida, no solo es necesaria para su manejo agronómico en nuevas zonas climáticas y geográficas sino también para futuros estudios en un contexto de cambio climático.

El estudio histológico detallado de la fecundación del óvulo, desarrollo del embrión y el endospermo ruminado, ha puesto en evidencia la presencia de numerosos caracteres plesiotípicos. El embrión muestra un desarrollo lento que inicialmente tiene lugar rodeado de un particular dominio micropilar del endospermo. Durante este desarrollo, hay una transición del almacenamiento de nutrientes desde la nucela a un endospermo ruminado.

Finalmente, se describe por primera vez el sistema de autoincompatibilidad tardía poscigótico presente en pawpaw. Se observa que los frutos de flores autopolinizadas dejan de crecer 14 días después de la polinización (DDP), produciéndose su abscisión 6 días después. El desarrollo inicial de las semillas procedentes de autofecundación es aparentemente normal hasta los 14 DDP, cuando se detiene, con un cigoto y un endospermo uniseriado que se mantiene sin cambios 20 DDP cuando muestra signos de degeneración tisular. El análisis transcriptómico sugiere que la reacción de incompatibilidad se produce entre los 4 y 8 DDP y, posiblemente, tenga lugar mediante un bloqueo en la primera división del cigoto.

Los resultados obtenidos en este trabajo aportan nuevos conocimientos sobre *A. triloba* esenciales para la optimización de su cultivo, pero también para contribuir a entender la historia evolutiva, especialmente de los sistemas de incompatibilidad y la embriología de las angiospermas.



SUMMARY

Pawpaw (*Asimina triloba* [L.] Dunal) is a deciduous fruit tree native to eastern North America, where it is cultivated on a limited commercial scale. An interesting feature of this crop is that, although adapted to temperate climates, its fruit has a tropical flavour and aroma. Due to these unique characteristics, it has the potential for expansion as a new crop in most European countries with temperate climates. Pawpaw has the particularity of having an unexplored self-incompatibility system, which adds to the protogynous dichogamy that is common within the Annonaceae family to prevent self-fertilization. Furthermore, pawpaw holds a key position among angiosperms as it belongs to the Annonaceae family, which represents an early divergent lineage among flowering plants.

With the aim of providing tools to improve pawpaw agronomic management and contribute to expanding the knowledge about angiosperm evolution, this study has been conducted with three objectives: (1) characterize the phenological growth stages of pawpaw according to the BBCH scale, (2) perform a comprehensive histological examination of pawpaw embryology, and (3) characterize the pawpaw floral self-incompatibility system through macroscopic, histological and transcriptomic approaches.

The phenological studies performed reveal that the pawpaw shows a good adaptation to the Mediterranean climate present in southern Spain. The description of pawpaw's phenological stages according to the extended BBCH scale is not only necessary for its agronomic management in new climatic and geographic areas but also for future studies in the current context of global climate change.

The detailed histological study of the fertilization process, embryo and ruminant endosperm development in pawpaw, has revealed the presence of numerous plesiomorphic features. The embryo shows a slow development, initially surrounded by a particular micropylar domain of the endosperm. During this development, there is a transition of nutrient storage from the nucellus to a ruminant endosperm.

Finally, the post-zygotic late-acting self-incompatibility system in pawpaw is described for the first time. Self-pollinated fruits cease growth 14 days after pollination (DAP), and abscission occurs 6 days later. Seeds resulting from self-fertilization show normal development until 14 DAP when development stops with a zygote and a uniseriate endosperm that remains unchanged until 20 DAP when signs of tissue degeneration appear. Transcriptomic analyses suggest that the incompatibility reaction takes place between 4 and 8 DAP, possibly through a blockage during the first division of the zygote.

The results obtained in this study provide new insights into *A. triloba*, essential for optimizing its cultivation, but they also contribute to understanding the evolutionary history of flowering plants, especially regarding incompatibility systems and embryology.



INTRODUCCIÓN GENERAL



Introducción general

Taxonomía, origen y distribución

El pawpaw [*Asimina triloba* (L.) Dunal] pertenece a la familia Annonaceae, la familia con mayor número de especies dentro del orden de las Magnoliales, situado en el clado Magnoliid, clado hermano de las mono y dicotiledóneas, considerado como uno de los grupos evolutivamente más ancestrales en angiospermas (Chase et al., 2016). Las anonáceas comprenden 110 géneros y en torno a 2.450 especies de árboles, arbustos y lianas (Couvreur et al., 2019), incluyendo frutales tropicales/subtropicales con frutos comestibles, fundamentalmente situados en los géneros *Annona* y *Asimina*. Casi todas las especies en las anonáceas son originarias de regiones con climas tropicales y subtropicales y la excepción se sitúa en el género *Asimina* originario de Norteamérica. En el género *Annona* destacan *Annona cherimola* Mill. (chirimoya), *Annona squamosa* Linn. (anón), atemoya (híbrido entre *A. cherimola* y *A. squamosa*), *Annona muricata* Linn. (guanábana), *Annona reticulata* Linn. (anona roja), *Annona macrophyllata* Donn. Smith. (ilama), *Annona purpurea* L. (soncoya) o *Annona mucosa* Jacq. (biribá). Por su parte, el género *Asimina* incluye al menos ocho especies y varios híbridos interespecíficos: *Asimina incana* (Bartr.) Exell. (flag pawpaw), *Asimina longifolia* Kral., *Asimina obovata* (Willd.) Nash, *Asimina parviflora* (Michx.) Dunal (pawpaw dwarf), *Asimina pygnaea* (Bartr.) Dunal, *Asimina reticulata* Shuttlw. ex Chapman, *Asimina tetramera* Small (oposum pawpaw) y *Asimina x nashi* Kral, hybr. nov. (*Asimina speciosa* x *Asimina longifolia*) (Kral, 1960).

El primer registro fósil de *Asimina* fue datado en el Eoceno (hace entre 56 y 34 millones de años), mientras que el primer registro fósil con características muy parecidas a *A. triloba* data del Mioceno (hace entre 23-5 millones de años) en la formación de Denver, en la Cuenca de Denver de Colorado (Berry, 1916). En aquel periodo, los frutos de gran tamaño como los producidos por el pawpaw eran dispersados por grandes mamíferos de la, ahora extinta, megafauna americana (Janzen & Martin, 1982; Van Zonneveld et al., 2018). Con la extinción de la megafauna, el pawpaw probablemente sobrevivió debido a su habilidad para reproducirse vegetativamente a través de vástagos adventicios que forman “parches” clónicos de pawpaw en la naturaleza (Fig. 1). Adicionalmente, las semillas de pawpaw pudieron ser dispersadas por nativos americanos, los cuales podrían haber hecho una primera selección tras la última edad de hielo, expandiéndose de este modo el rango geográfico de crecimiento del pawpaw (Hormaza, 2014).



Figura 1. Un individuo de pawpaw con numerosos vástagos adventicios, formando un parche. La flecha roja indica la posición del individuo inicial proveniente de semilla.

El primer registro escrito sobre el pawpaw data de 1541 por un oficial portugués, miembro de la expedición española de Hernando de Soto por el sureste de Norteamérica (Hackluyt, 1609). Al parecer los miembros de la expedición llamaron pawpaw al árbol por su semejanza con la papaya (*Carica papaya*) que ya conocían de la América tropical. De hecho, en algunos países angloparlantes, como Australia y Nueva Zelanda, la papaya tropical es también conocida como pawpaw, dando lugar a confusión entre ambas especies (Hormaza, 2014). Después de este primer escrito, el pawpaw fue descrito en exploraciones adicionales de Norteamérica (Fig. 2).



Figura 2. Grabado de Johann Haid, Londres, 1750. El color blanco de las flores es probablemente debido a la conservación en etanol tras su recolección.

Condiciones ambientales del cultivo

El rango natural del género *Asimina* se encuentra limitado a Florida y Georgia, a excepción de *A. triloba* y *A. parviflora* con una distribución más amplia en otros estados de EEUU. *A. triloba*, conocido también como pawpaw norteamericano, es la especie más extendida del género, autóctono de 26 estados del este de EEUU, que van desde el sur de Ontario (Canadá), Nueva York, el sur de Michigan en el norte, hacia el sur con el norte de Florida, y de oeste a este de Texas, Nebraska, y Kansas (Brett & Callaway, 1992; Fox, 2012). El pawpaw es un frutal de hoja caduca, que según el sistema de clasificación geográfica establecido por el USDA (United States Department of Agriculture) dentro de los Estados Unidos, puede crecer con éxito dentro del rango entre la zona 5 que presenta temperaturas mínimas de -29°C y la zona 8 con mínimas de -7°C y temperaturas máximas por encima de los 35°C (Pomper & Layne, 2005).

El pawpaw es el fruto más grande comestible nativo de EEUU. Posiblemente por este motivo, se puso en marcha en dicho país el primer programa de mejora que seleccionó 56 cultivares de pawpaw entre 1900 y 1960. Sin embargo, algunos de estos cultivares se perdieron, habiendo actualmente unos 40 cultivares comerciales disponibles (Peterson, 1991; Pomper et al., 2003). La piel del pawpaw es suave y fina, lo cual hace difícil su transporte y limita su vida postcosecha. Por este motivo los agricultores locales procesan la pulpa para hacer helados, mermeladas, compotas y vino (Duffrin & Pomper, 2006). Actualmente, el pawpaw es casi exclusivamente cultivado en el este de EEUU con una limitada distribución comercial y mayormente consumido a nivel local. Sin embargo, es un frutal único ya que su fruto mantiene un sabor tropical, que recuerda a los demás frutales de la familia Annonaceae pero con la particularidad de que se encuentra adaptado a zonas templadas. En Europa, es prácticamente desconocido, estando presente en algunos viveros, principalmente como árbol ornamental. A pesar de este desconocimiento, las condiciones climáticas en la mayoría de países europeos son favorables para su cultivo. Es por tanto un frutal que muestra un gran potencial con un claro nicho de expansión. Sin embargo, su biología reproductiva, que es uno de los aspectos esenciales para la expansión de cualquier cultivo, es todavía bastante desconocida.

Biología reproductiva en angiospermas

En angiospermas, la unidad de reproducción sexual es la flor. Aunque las flores presentan una enorme diversidad en tamaño, forma, color y estructura, están constituidas por un patrón básico de cuatro verticilos; cáliz (formado por los sépalos), corola (conjunto de pétalos), androceo (conjunto de estambres) y gineceo (formado por los carpelos). Todos ellos desarrollados a partir del tálamo, extremo del eje floral (pedicelo). Los dos verticilos interiores, el androceo y gineceo, están directamente involucrados en la reproducción. El conjunto de estambres que componen el androceo pueden tener gran variedad de formas y tamaños, pero en esencia se componen de un filamento más o menos largo coronado por una antera, cada antera a su vez contiene cuatro microsporangios (sacos polínicos) en los que se desarrollan los granos de polen (gametofitos masculinos). Cuando los granos

de polen están maduros se produce la dehiscencia de las anteras, liberando así el polen. Por otro lado, el gineceo está formado por los carpelos; en algunas especies estos carpelos pueden ser libres (propio de angiospermas basales) o pueden estar fusionados. El carpelo o también llamado pistilo, tiene en su extremo apical una superficie denominada estigma, el estilo en su base suele ensancharse formando el ovario que contiene los óvulos, los cuales en su interior albergan el saco embrionario (gametofito femenino) (Shivanna & Tandon, 2017).

Un gran número de especies de angiospermas son bisexuales, es decir, presentan estambres y carpelos en la misma flor. Para evitar la autofecundación, las plantas han desarrollado diferentes sistemas como la incompatibilidad floral, la hercogamia (separación espacial entre anteras y estigmas) o la dicogamia (maduración de ambos verticilos separada temporalmente en un corto periodo de tiempo tras la antesis). Si el primer verticilo en madurar es el gineceo produciéndose primero la receptividad del estigma y después la dehiscencia de las anteras y la consecuente liberación del polen, se denomina dicogamia protogínica (Shivanna & Tandon, 2017). Mientras que los mecanismos de prevención de la autofecundación basados en separación temporal y espacial evitan la autofecundación en una misma flor (autogamia) no se evita la geitonogamia que consiste en la polinización entre flores de la misma planta, mientras que el sistema de incompatibilidad (SI) si la evita (Shivanna & Tandon, 2017).

Debido al papel clave de la biología reproductiva en la producción de frutos, es especialmente interesante conocerlo en especies con interés agronómico, como ocurre con *A. triloba*. Es, por tanto, también muy común estandarizar todas las etapas de la biología reproductiva y también del periodo vegetativo a través de un código que permita realizar comparaciones de la fenología entre diferentes regiones, como es el caso de la escala BBCH extendida (Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt und Chemische Industrie), un sistema de codificación decimal de dos dígitos. Esta escala BBCH, en la familia Annonaceae, ha sido establecida en *A. cherimola* (Cautín & Agustí, 2005) y en *A. squamosa* (Liu et al., 2014) pero no en *A. triloba*.

Biología floral de Asimina triloba

Las flores de *A. triloba* presentan características propias de las anonáceas, como la disposición cónica de los verticilos, corola carnosa formando una cámara en torno al centro de la flor y un olor intenso que atrae a polinizadores como moscas y pequeños escarabajos (Gottsberger, 1999). Otra característica común en esta familia de angiospermas basales es la dicogamia protogínica como mecanismo para evitar la autofecundación (Lora et al., 2010). En *A. triloba* la protoginia se inicia con la apertura de la yema floral aun con pétalos verdes dejando al descubierto los estigmas inmaduros. Cuando los pétalos se tornan de un color granate, el conjunto de estigmas produce una secreción espesa y viscosa que forma un compitum exterior al gineceo que marca el punto de máxima receptividad femenina, después la secreción es reabsorbida, los estigmas se tornan de un color pardo y se produce la dehiscencia de las anteras iniciándose de este modo la fase masculina de la flor (Ferrer-Blanco et al., 2022; Losada et al., 2017b). La

receptividad estigmática se prolonga unos 11 días lo que puede reducir la eficiencia de la dicogamia protogínica para reducir la autofecundación (Losada et al., 2017b).

El viaje del tubo polínico

Tras la polinización, la interacción polen-pistilo es uno de los procesos más críticos para el éxito reproductivo. Durante la dehiscencia de la antera, el grano de polen contiene el núcleo vegetativo y el núcleo generativo. El núcleo generativo puede dividirse antes o después de la dehiscencia, liberándose como un grano de polen tricelular o bicelular respectivamente. La división del núcleo generativo da lugar a dos gametos masculinos (espermátidas), que en el caso del grano bicelular se produce en el tubo polínico. El grano de polen depositado sobre un estigma receptivo germina, emitiendo el tubo polínico que recorrerá los tejidos del estigma y el estilo, llevando al núcleo generativo y a las dos espermátidas o al núcleo generativo, en el caso de que aún no haya tenido lugar la división de la célula generativa. El tubo polínico llegará al ovario donde alcanzará los óvulos, una vez allí descargará las dos células espermátidas para fecundarlo. Durante este recorrido, se produce un intenso diálogo entre los tejidos del gametofito masculino y el esporofito femenino, que será determinante para que tenga lugar la fecundación (Kawashima & Berger, 2011). Durante esta fase, tiene lugar una selección de los gametofitos masculinos, fomentándose y permitiendo el crecimiento del polen compatible e inhibiendo el crecimiento de los gametofitos autoincompatibles (Cheung et al., 2010).

Cuando el tubo polínico alcanza el óvulo, entra al saco embrionario a través de una de las células sinérgidas y descarga los dos gametos masculinos para llevar a cabo la doble fecundación característica de las angiospermas (Russel, 1992). Uno de los gametos se fusionará con la célula huevo para formar el cigoto y el otro gameto se aproximará a la célula central para fusionarse con los núcleos polares dando lugar al núcleo primario del endospermo. El cigoto formará el embrión y el núcleo primario del endospermo dará lugar al endospermo. Finalmente, el óvulo fecundado forma la semilla y el ovario que los contiene formará el fruto.

La evolución del camino del tubo polínico en angiospermas

En *A. triloba*, el camino del tubo polínico presenta características comunes a otras especies dentro de la familia Annonaceae y también común entre las angiospermas basales. En este tipo de angiospermas, la competencia de los tubos polínicos suele darse en el compitum exterior al gineceo producido por los estigmas, como ocurre en *A. cherimola* (Lora et al, 2011) y que también tiene lugar en *A. triloba* (Losada et al., 2017b). Tras esta competencia inicial, sólo unos pocos tubos polínicos crecen hacia el estilo. Un estilo que en angiospermas primitivas suele ser corto y en el que el tejido transmisor se encuentra cerrado total o parcialmente por secreción, como también es común en las anonáceas. Sin embargo, en angiospermas filogenéticamente más avanzadas el estilo suele ser más largo y el carpelo se encuentra completamente sellado (angiospermia), considerándose como una innovación clave en la evolución de las angiospermas (Endress

& Igersheim, 2000). De hecho, este mayor aislamiento favorece una mayor competencia y selección, como se observa en el gran número de tubos polínicos presentes en el estilo y cuyo número decrece gradualmente, siendo pocos los que logran llegar al ovario en angiospermas más avanzadas (Lora et al 2016). De esta forma, mientras la mayor competencia de los granos de polen tiene lugar en el estigma y con una mayor exposición al ambiente en angiospermas ancestrales, en angiospermas evolutivamente más avanzadas esta competencia suele ser más interna dándose una tendencia hacia un mayor control por parte del esporofito femenino (principalmente en el estilo) sobre el gametofito masculino (Lora et al 2016).

Este mayor control también se refleja en una mayor discriminación de la compatibilidad de los tubos polínicos, ya que la presencia de mecanismos que reconocen los tubos polínicos procedentes de autopolinización es más frecuente en especies de familias filogenéticamente más avanzadas que en las familias de las angiospermas basales (Gibbs, 2014). En el caso de *A. triloba*, a pesar de presentar un mecanismo que físicamente impide la autofecundación como la dicogamia protogínica, se ha descrito como especie autoincompatible lo cual supone otro mecanismo para promover la alogamia, pero se desconoce por completo el mecanismo de incompatibilidad subyacente.

Sistemas de autoincompatibilidad floral

Se estima que casi la mitad de las angiospermas presenta algún mecanismo de autoincompatibilidad floral (Gibbs, 2014). Esta autoincompatibilidad fue definida por Brewbaker (1958) y Arasu (1968) como “la incapacidad de una planta productora de gametos fértiles de producir semilla cuando es autopolinizada”. Tras el estudio de este fenómeno y su control genético en algunas especies se establecieron inicialmente tres tipos de mecanismos. Entre ellos, el mecanismo esporofítico heteromórfico se basa en la presencia de distintitas morfologías florales en la población, normalmente en forma de heterostilia (Darwin, 1877). La forma más común de heterostilia es la ditistilia en la que las flores presentan estilos largos o cortos con las anteras en posición recíproca. Este es el mecanismo que presenta, por ejemplo, *Primula sinensis* (Bateson & Gregory, 1905). Posteriormente, se observó que este mecanismo combina el polimorfismo floral con un control bioquímico esporofítico (McCubbin, 2008). En especies con incompatibilidad heteromórfica (ditistilia y tristilia) un único gen *S* con dos alelos, *S* y *s*, que determinan la posición de las anteras y la altura del estilo, además del fenotipo de incompatibilidad. El segundo y tercer mecanismo no se encuentran basados en diferencias morfológicas y son, por tanto, denominados como homomórficos, como son el sistema de incompatibilidad gametofítico (**SIG**) y sistema de incompatibilidad esporofítico (**SIS**).

En el **SIS**, la incompatibilidad está determinada por el esporofito. Los alelos de incompatibilidad en el polen están determinados por la parte masculina del esporofito, la antera, y se depositan sobre la exina durante el desarrollo del polen. Tras la liberación del polen de la antera, es en el estigma donde tiene lugar el reconocimiento y la interacción entre los alelos de incompatibilidad, los provenientes de la antera depositados sobre la exina y los de la parte femenina del esporofito en el estigma. De esta interacción,

dependerá si son compatibles o no, produciéndose la hidratación del grano de polen y germinación si son compatibles. Este mecanismo ha sido observado en al menos seis familias, incluyendo la familia Brassicaceae (Bateman, 1954) y parece restringido a las Eudicotiledóneas (Gibbs, 2014; Allen and Hiscok, 2008).

En el SIG, el fenotipo de autoincompatibilidad viene dado por la superficie del tubo polínico en crecimiento (gametofito masculino haploide) (East & Mangelsdorf, 1925). Este es el sistema con una mayor distribución taxonómica en las angiospermas, descrito en especies de al menos 18 familias incluyendo las Solanaceae, Rosaceae y Papaveraceae (Gibbs, 2014). En rosáceas y solanáceas, los genes clave que controlan este mecanismo están codificados en el locus-*S* multialélico, el cual contiene el gen haplotipo específico *S haplotype-specific F-box (SFB)* y el gen *S-RNasa* (Matsumoto & Tao, 2016). El tejido transmisor del canal estilar secreta el determinante estilar *S*, es decir la *S-RNasa* y la proteína *F-box* es codificada por *SFB* en el tubo polínico. La *S-RNasa* presente en la secreción del estilo entra en el citoplasma del tubo polínico y degrada el RNAr de los tubos polínicos incompatibles, que no pueden continuar sintetizando proteínas y colapsan. Si el tubo polínico es compatible, su *SFB* detecta a la *S-RNasa* como no propia y la ubiquitina, marcándola entonces para su degradación, manteniendo el tubo polínico compatible la integridad de su RNAr y continuando su camino hacia el ovario (Matsumoto & Tao, 2016). En papaveráceas, se secreta una pequeña proteína *S* estigmática que interactúa con un receptor *S* en la membrana del tubo polínico; si ambos presentan el mismo haplotipo la proteína estigmática *S* se unirá al receptor *S* del tubo polínico desencadenando una entrada masiva de Ca^{2+} en el tubo polínico aumentando rápidamente la concentración citosólica del mismo, lo que provoca la fosforilación de proteínas que desencadena la reorganización y despolimerización de la actina afectando al citoesqueleto provocando la detención del crecimiento del extremo del tubo polínico. Tras esta rápida detención del crecimiento, adicionalmente se activan MAP quinasas y la apoptosis para evitar que el tubo incompatible pueda volver a crecer (Franklin-Tong & Franklin, 2003).

No obstante, se ha visto en un alto número de especies con SIG que el tubo polínico incompatible no solo alcanza el ovario, sino que, en muchas ocasiones, llega a alcanzar el óvulo y es a este fenómeno al que se le llama autoincompatibilidad tardía (Gibbs, 2014). Estos sistemas de incompatibilidad tardía (**SIT**) se consideraban extremadamente raros, pero tras el estudio en detalle de numerosas especies, se ha visto que es más común de lo esperado. Es además el sistema de incompatibilidad que se ha observado en algunas especies dentro del clado Magnoliid y el grado ANITA (Amborellales, Austrobaileyales y Nymphaeales) (Gibbs, 2014). Ejemplos de SIT precigótico incluyen *Acacia retinoides*, donde el crecimiento del tubo polínico es detenido en la nucela (Kenrick et al., 1986), o *Theobroma cacao* en el que el tubo polínico incompatible descarga los núcleos espermáticos en el saco embrionario, pero nunca llega a producirse la singamia con la célula huevo (Knight & Rogers, 1955). Por otro lado, en el SIT poscigótico tiene lugar la fecundación, pero el cigoto resultante no se desarrolla, como se ha visto en algunas especies de *Rhododendron* (Williams et al., 1986) o que la autopolinización no estimula

adecuadamente el desarrollo del óvulo como en algunas especies de *Gasteria* (Sears, 1937).

En angiospermas basales como la familia de las anonáceas no se ha descrito ningún tipo de incompatibilidad homomórfica. De hecho, en el libro “Incompatibility and Incongruity in Wild and Cultivated Plants” de Nettancourt (1977) hace referencia a una “Anona” cuando habla sobre autoincompatibilidad ovárica debido a la presencia de un estilo hueco, pero esto se debe a una confusión ya que cita a Arasu (1968) que, a su vez, cita el artículo original de Brewbaker y Gorrez (1967) donde en realidad describen este proceso en piña (*Ananas comosus*) “Ananas”. Además, se ha hipotetizado que el mecanismo primitivo de autoincompatibilidad debió haber sido algún tipo de SIT (Sage & Sampson, 2003). Esta hipótesis plantea que el mecanismo de autoincompatibilidad evolucionó actuando en la superficie adaxial del carpelo abierto donde aún no se habían desarrollado estructuras como el estigma y el estilo (carácter primitivo en angiospermas). Sin embargo la presencia de autoincompatibilidad estigmática en *Austrobaileya scandens* y *Trimenia moorei* ambas especies leñosas en el orden Austrobaileyales del clado basal ANITA indica que muy posiblemente las angiospermas pudieron haber adquirido rápidamente otras formas de autoincompatibilidad, lo cual es consistente con los estudios que indican los múltiples orígenes de los mecanismos de autoincompatibilidad en angiospermas (Sage & Sampson, 2003).

Mientras se conocen algunos de los mecanismos moleculares y genéticos implicados en el SIG y SIS, estos mecanismos son totalmente desconocidos en el SIT, que ha sido muy poco estudiado en angiospermas basales. En este trabajo se pretende avanzar en el conocimiento sobre el SIT en pawpaw y es el primero descrito en anonáceas.

Sistema de incompatibilidad tardía poscigótica y depresión endogámica

El SIT abarca distintas situaciones. En la primera, los tubos polínicos incompatibles alcanzan el ovario, pero no llegan a penetrar el óvulo; en la segunda situación, el tubo polínico incompatible llega al óvulo, pero es detenido en el micropilo o no tiene lugar la singamia tras la liberación de los gametos masculinos en el saco embrionario; por último, en el tercer caso, tiene lugar la fecundación. En los dos primeros casos se trataría de un SIT precigótico mientras que en el tercero se trataría de un SIT poscigótico. Es este último mecanismo el que entraría en conflicto con una posible depresión endogámica (**DE**) (Gibbs, 2014).

Por tanto, es necesario distinguir entre el SIT poscigótico y la DE mediante una serie de criterios. La depresión endogámica es el resultado de la expresión de la carga genética deletérea embriónica y se manifiesta como el aborto de los óvulos resultantes de autofecundación (Charlesworth & Charlesworth, 1987). En cambio, la mayoría de los tipos de autoincompatibilidad incluyendo los mecanismos gametofíticos (SIG) y esporofíticos (SIS), son barreras precigóticas que implican el reconocimiento activo y rechazo del polen propio (de Nettancourt, 2001). Lipow y Wyatt (1999) proponen tres criterios para diferenciar entre SIT y DE. El primer criterio se basa en la hipótesis de que

en el SIT el rechazo de los óvulos resultantes de autofecundación ocurre de manera uniforme en la misma etapa de desarrollo en el conjunto de individuos de la población, mediante la acción específica de uno o unos pocos genes que controlan la identificación y el rechazo del polen propio. Mientras que si las etapas de desarrollo en la que abortan los óvulos autofecundados es diferente entre el conjunto de individuos se trata de DE, basándose en que los genes responsables del aborto serán diferentes entre distintos individuos, y la etapa del desarrollo en la que se expresan estos genes varía (Sage et al., 1994). Además, no se conocen casos en los cuales todos los individuos de una población sean autoestériles debido a DE; si individuos cercanos en una población son autoestériles lo más probable es que esté implicado un mecanismo de autoincompatibilidad (Lipow & Wyatt, 1999). Por último, si muchas especies emparentadas no presentan barreras precigóticas para prevenir la autofecundación, entonces la autoesterilidad de la especie de estudio debe tratarse de SIT y no DE, ya que la carga genética requerida para una autoesterilidad completa basada en DE es muy poco común. El hecho mencionado anteriormente, es muy improbable ya que implicaría que cada especie emparentada acumule dicha carga genética deletérea de manera independiente (Waser & Price, 1991).

El estudio sobre la biología reproductiva de *A. triloba*, es aún muy incipiente. Se conoce su ciclo floral (Losada et al., 2017b) pero los estados fenológicos no han sido estandarizados. Este ciclo floral muestra dicogamia con protoginia para evitar la autofecundación, pero *A. triloba* también presenta incompatibilidad (Willson & Schemske, 1980). A pesar de presentar este doble sistema para impedir la autofecundación, se sabe muy poco del sistema de incompatibilidad. Es por eso, que en este trabajo se plantea profundizar en el estudio de la biología reproductiva, prestando especial interés al sistema de incompatibilidad.



OBJETIVOS



Objetivos

El objetivo general de este trabajo es el estudio de la biología reproductiva del pawpaw [*Asimina triloba* (L.) Dunal], prestando especial atención a su sistema de autoincompatibilidad floral. Estos conocimientos son esenciales para el manejo agronómico de esta especie con un potencial nicho de expansión en países con climas templados, además de aportar información valiosa para entender la historia evolutiva de las angiospermas, ya que pertenece a uno de los grupos con caracteres más ancestrales dentro de las plantas con flor, la familia *Annonaceae*. Este objetivo general se desglosa en tres objetivos específicos:

1. Caracterizar la fenología de la especie utilizando la escala BBCH extendida, mediante una descripción detallada de las distintas etapas en las condiciones climáticas del sur de España.
2. Estudiar en detalle la fase progámica, desarrollo del embrión y endospermo, describiendo la formación de las ruminaciones y el inicio de la germinación de la semilla.
3. Estudiar el proceso de autoincompatibilidad floral desde una perspectiva macroscópica, histológica y transcriptómica, para identificar las posibles limitaciones en la producción de fruto y ampliar información sobre la evolución de los sistemas de autoincompatibilidad en angiospermas.





CAPÍTULO 1



Capítulo 1: Caracterización de la fenología de *Asimina triloba* (pawpaw) mediante la escala BBCH.¹

Resumen

El pawpaw [*Asimina triloba* (L.) Dunal] es un árbol frutal de hoja caduca nativo del este de Norteamérica donde se comercializa a nivel local. Es particularmente interesante debido al sabor y aroma tropical de su fruto, rasgos únicos en un frutal adaptado a climas templados. Sin embargo, el pawpaw sigue siendo un cultivo infrautilizado, aunque tiene un claro nicho de expansión en regiones de clima templado. La ausencia de estudios de la fenología mediante un sistema estandarizado dificulta la comparación entre regiones. Con el fin de solucionar esta carencia, en este trabajo se describen en detalle las etapas de desarrollo fenológico del pawpaw mediante el uso de la escala BBCH extendida (Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt und Chemische Industrie), un sistema de codificación decimal de dos dígitos. El código de la escala BBCH permite de manera sencilla identificar y estandarizar las etapas fenológicas en condiciones de campo, una herramienta muy útil para el manejo de frutales y esencial para la expansión del pawpaw a otras áreas geográficas y climáticas.

¹ Ferrer-Blanco, C., Hormaza, J. I., & Lora, J. (2022). Phenological growth stages of “pawpaw” [*Asimina triloba* (L.) Dunal, Annonaceae] according to the BBCH scale. *Scientia Horticulturae*, 295, 110853.

Introducción

La descripción de las distintas etapas fenológicas es esencial para la expansión y desarrollo de un cultivo incipiente. Las etapas fenológicas de crecimiento han sido tradicionalmente descritas basándose en la escala Fleckinger en cultivos como frutales de hueso (Fleckinger, 1948). La escala Fleckinger asigna letras mayúsculas para las principales etapas de la formación de la yema en manzano, en la cual cada fase esta específicamente designada con números. Unos pocos años después, en 1974, Zadoks presentó una escala numérica decimal para cereales, basándose en dicha escala previa. Bleiholder et al. (1989) refinó la escala decimal descrita por Zadoks et al. (1974) con el sistema codificado BBCH, incluyendo una escala unificada para plantas mono y dicotiledóneas. En 1992, se publicó la escala BBCH extendida, y desde entonces, se ha aplicado para describir las etapas fenológicas de muchos cultivos (Codierung et al., 1992; Meier et al., 2009). Los principios básicos de la escala proveen el mismo código a etapas fenológicas similares de cada especie que son claras y fácilmente reconocibles mediante características morfológicas externas. La escala BBCH también abarca características de la poscosecha, almacenamiento y tratamientos de las semillas antes de plantarlas, conocimiento particularmente importante para los agricultores. Además, la escala BBCH es muy útil en agricultura para determinar el momento de aplicación de nutrientes y tratamientos químicos, o en mejora vegetal ya que permite definir el momento óptimo de maduración para recolectar y organizar polinizaciones dirigidas (Meier et al., 2009). El código de la escala BBCH facilita el procesamiento de datos informáticos resolviendo problemas de comunicación interdisciplinar. Por ejemplo, se pueden usar observaciones fenológicas de larga duración para monitorear y detectar cambios en el clima. De hecho, el sistema BBCH es totalmente compatible con el Programa de Monitorización Fenológica Global de la Sociedad Internacional de Biometeorología (Meier et al., 2009).

Aunque muchos cultivos frutales ya han sido caracterizados mediante la escala BBCH (Alcaraz et al., 2013; Fadón et al., 2015; Meier et al., 2009), solo dos especies de anonáceas han sido caracterizadas por esta escala: el anón (*Annona squamosa*) (K. Liu et al., 2014) y el chirimoyo (*Annona cherimola* Mill.) (Cautín & Agustí, 2005), y su fenología es muy diferente a la del pawpaw, ya que el anón está adaptado a climas tropicales y el chirimoyo a climas subtropicales. Se han hecho algunos intentos de describir las etapas fenológicas del pawpaw pero mayormente enfocados en la floración, flores y desarrollo del fruto (Pomper et al., 2008; Szilagyi, 2016). Por tanto, esta caracterización fenológica del pawpaw es incompleta y no estandarizada. Para completar este vacío de información, en este trabajo se caracterizan las etapas de crecimiento fenológico del pawpaw según la escala BBCH, una herramienta esencial para el manejo y expansión del cultivo a nuevas regiones.

Material y métodos

Los datos se recogieron de tres árboles de semilla de 25 años en la finca experimental del IHSM La Mayora en Málaga (España) a una latitud de 36° 45'N, longitud 4° 4'W y a una altitud de 35 m sobre el nivel del mar. Málaga tiene un clima mediterráneo típico (Csa

según la clasificación climática de Köppen). Datos recopilados para esta región muestran una temperatura media anual de 18'4°C, una temperatura media de las máximas de 28'9°C en el mes más caluroso (agosto) y una temperatura media de las mínimas de 9'8°C en el mes más frío (enero) con unas precipitaciones medias anuales de 520 mm.

Las observaciones fenológicas se llevaron a cabo a lo largo de dos años (2019-2020). Las medidas se hicieron una vez a la semana de junio a febrero, y dos veces a la semana de marzo a mayo. El diámetro de las yemas florales y el largo de las yemas foliares y hojas se midieron con un calibre digital. Las etapas de crecimiento fenológico se fotografiaron de manera secuencial en la parcela. Para caracterizar el desarrollo de la flor, las yemas se muestrearon en otoño, invierno y primavera y se diseccionaron y fotografiaron con una lupa binocular Leica L2 equipada con una cámara Leica MC190 HD.

En la escala BBCH, las principales etapas de crecimiento se describen usando números de 0 a 9 en orden creciente y, dependiendo de la especie, algunas etapas se omiten. Determinadas etapas de desarrollo vegetal necesitan ser descritas por un número adicional (0 a 9), lo cual resulta en un código de dos dígitos. Solo en algunas especies de plantas es necesaria una subdivisión adicional para una descripción precisa de la etapa fenológica y, para estos casos, la escala ofrece la posibilidad de usar tres dígitos.

Resultados y discusión

En este trabajo, se describen las etapas fenológicas de desarrollo del pawpaw en las condiciones ambientales del sur de España. Se han dividido en siete etapas principales. El árbol de pawpaw creciendo en zona soleada tiene una forma cónica piramidal y es moderadamente pequeño, llegando a 10 metros de alto (Hormaza, 2014; Pomper & Layne, 2005). El pawpaw es un árbol de hoja caduca, sus hojas caen en otoño y entra en dormancia durante el invierno. En primavera se desarrollan las yemas florales y la floración, seguidamente empiezan a crecer las hojas, desarrollándose el follaje por completo en verano. El desarrollo del fruto necesita de unos cuatro meses, y están listos para su recolección entre finales de agosto y mediados de septiembre (Fig. 3).

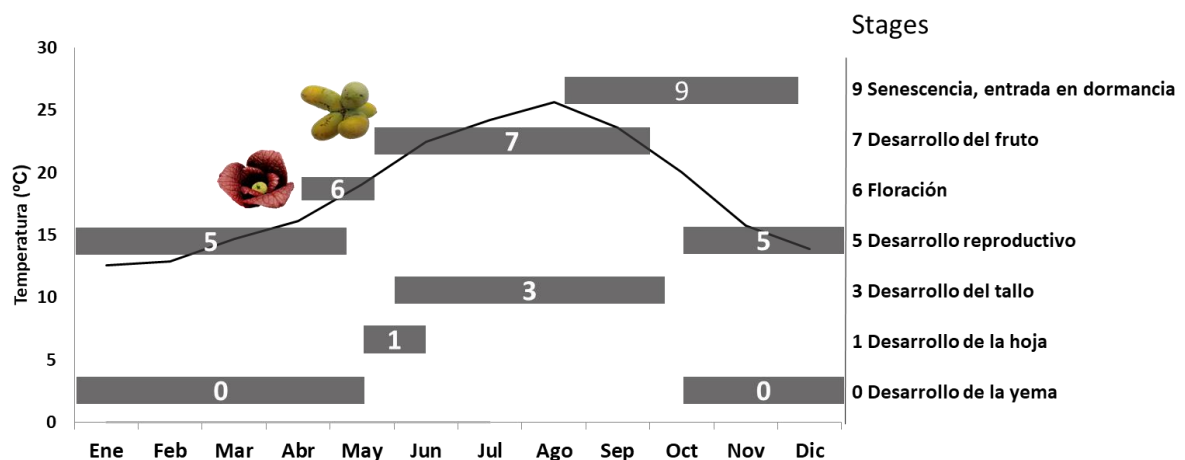


Figura 3. Flor, fruto y desarrollo de la hoja de *Asimina triloba* (L.) Dunal, pawpaw, indicando las principales etapas de desarrollo de la escala BBCH en el sur de España.

Tiempo transcurrido en cada etapa (barras horizontales) y temperatura media (2017-2019) (línea continua).

Para el pawpaw, se usaron 7 de las 10 principales etapas de desarrollo de la escala BBCH, empezando con la dormancia de la yema vegetativa (etapa 00) y terminando con la caída de las hojas (etapa 97) (Tabla 1).

Tabla 1

Etapas de desarrollo fenológico del pawpaw (*Asimina triloba* (L.) Dunal) según la escala BBCH.

Código BBCH	Descripción
Etapa principal de desarrollo 0: desarrollo de la yema	
00	Dormancia
01	Inicio de hinchamiento de la yema vegetativa
03	Fin de hinchamiento de la yema vegetativa
09	Puntas verdes visibles
Etapa principal de desarrollo 1: desarrollo de la hoja	
10	Primeras hojas separándose
11	Primeras hojas desplegándose
19	Primeras hojas totalmente expandidas
Etapa principal de desarrollo 3: desarrollo del tallo	
31	Inicio de crecimiento del tallo
32	20% de la longitud final del tallo
33	30% de la longitud final del tallo
3...	Se suceden etapas hasta...
39	90% de la longitud final del tallo
Etapa principal de desarrollo 5: desarrollo reproductivo	
50	Dormancia
51	Hinchamiento de la yema floral
56	Elongación del pedicelo de la flor
Etapa principal de desarrollo 6: floración	
60	Primera flor abierta
61	Inicio de la floración
62	20% de las flores abiertas
63	30% de las flores abiertas

64	40% de las flores abiertas
65	Floración completa
67	Caída de las flores
69	Fin de la floración
Etapa principal de desarrollo 7: desarrollo del fruto	
71	Crecimiento del ovario; ovario verde rodeado de corona de pétalos marchitándose
72	20% tamaño final del fruto
75	50% tamaño final del fruto
76	60% tamaño final del fruto
77	70% tamaño final del fruto
78	80% tamaño final del fruto
79	Fruto maduro para recolectar
Etapa principal de desarrollo 9: senescencia, entrada en dormancia	
91	Crecimiento completo del tallo; el follaje es todavía verde
92	Las hojas empiezan a perder color
93	Inicio de la caída de las hojas
95	50% de las hojas caídas
97	Todas las hojas caídas

3.1. Etapa principal de desarrollo 0: desarrollo de la yema vegetativa.

Bajo las condiciones ambientales del sur de España, la yema vegetativa se desarrolla después de la floración.

00 Dormancia, las yemas vegetativas están cerradas y cubiertas por escamas de color marrón grisáceo.

01 Inicio del hinchamiento de la yema.

03 Fin del hinchado de la yema.

09 Las puntas verdes de las hojas son visibles.

3.2. Etapa principal de desarrollo 1: desarrollo de la hoja (Fig. 4)

En el sur de España, las hojas empiezan a crecer cuando la floración está terminando (Fig. 3). Las hojas tienen forma oblonga-lanceolada de color verde oscuro en primavera y verano, pero pasan a ser amarillas con manchas marrón oscuro antes de la caída de las

hojas en otoño (Pomper & Layne, 2005). Para evitar la herbivoria, las hojas del pawpaw y ramas jóvenes acumulan acetogeninas, un tipo de compuesto con propiedades antitumorales específicos de anonáceas (Alali et al., 1999).

10 Primeras hojas separándose

11 Primeras hojas desplegándose mientras la floración está terminando.

19 Primeras hojas totalmente expandidas.



Figura 4. Etapas BBCH para el desarrollo de la hoja de *Asimina triloba* (L.) Dunal, pawpaw.

3.3. Etapa principal de desarrollo 3: desarrollo del tallo.

En el sur de España, los tallos se desarrollan en verano (de junio a agosto).

31 inicio de crecimiento del tallo

32 20% de la longitud total del tallo

33 30% de la longitud total del tallo

3. Las etapas se suceden hasta...

39 90% de la longitud total del tallo

3.4. Etapa principal de desarrollo 5: desarrollo reproductivo (Fig. 5)

En el sur de España, desde mediados de octubre a finales de abril, las yemas florales permanecen dormantes.

50 Dormancia, las yemas florales están cerradas y cubiertas por escamas grises, sin pedúnculo.

51 Hinchamiento de las yemas florales cubiertas por tricomas (Fig. 5A), marrón oscuro sin escamas, el pedicelo empieza a elongarse.

56 Elongación del pedicelo de la flor. Las flores son pendulares con pedicelos cubiertos de tricomas.

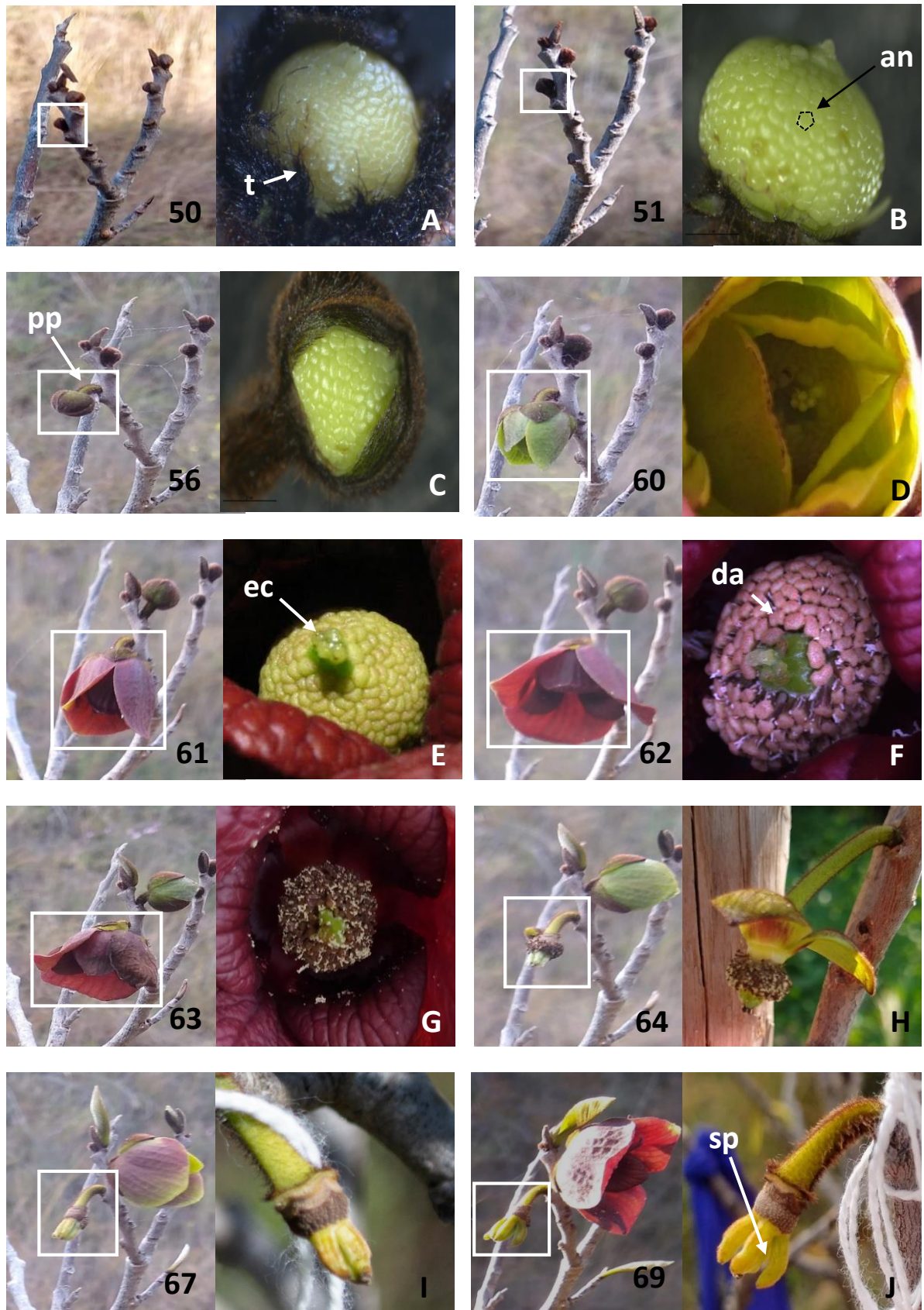


Figura 5. Etapas BBCH para el desarrollo reproductivo y floración de *Asimina triloba* (L.) Dunal, pawpaw. an (antera), ec (compitum extraginoecial), da (anteras dehiscentes), pp (pedicelo pubescente), sp (pistilos separados), t (tricomas).

3.5. Etapa principal de desarrollo 6: Floración

Unos 15 días antes de la dehiscencia de las anteras, los pétalos de las yemas florales se empiezan a abrir mostrando los estigmas. Las flores del pawpaw tienen 3 sépalos, tres pétalos externos y tres internos (Fig. 6A). En las primeras etapas de desarrollo de la flor, los pétalos son verdes (etapa 60, Fig. 5) pero cinco días antes de la dehiscencia de las anteras los pétalos pasan a ser rojo oscuro (etapa 61, Fig. 5) (Losada et al., 2017b); en este momento la flor emite un olor fétido para atraer polinizadores como moscas, pequeños escarabajos y posiblemente algunos insectos nocturnos (Pomper & Layne, 2005). El gineceo y androceo presentan una disposición cónica, lo cual es común en otras especies de anonáceas. El gineceo del pawpaw tiene entre 3 y 10 carpelos uniloculados rodeados por un androceo globular que contiene numerosas anteras con filamentos robustos y cortos (Endress, 2010; Losada et al., 2017b). La flor del pawpaw comparte numerosas estructuras que también se encuentran en otras especies de las magnólidas y clados hermanos de angiospermas mono y dicotiledóneas, como los carpelos plegados con un canal estilar corto, un compitum extraginoecial (Fig. 6A) y óvulos anátropos y crasinucelados (Endress & Igersheim, 2011; Losada et al., 2017b). Al igual que otras especies filogenéticamente cercanas, el pawpaw presenta dicogamia protogínica en la que las estructuras femeninas maduran antes que las masculinas previniendo así la autopolinización (Brett & Callaway, 1992). En el sur de España, la mayoría de las flores se abren durante las tres últimas semanas de abril, pero el periodo de floración puede llegar a extenderse durante 30 días. Este periodo es similar al observado en Kentucky (EEUU), que dura entre 3 y 4 semanas entre abril y mayo (Pomper et al., 2008) y en Transilvania (Rumania) (Szilagyi, 2016). Además se ha estudiado que en cada flor, la proporción de estructuras femeninas respecto a las masculinas es mayor cuanto mayor sea el diámetro y más soleada esté una rama (Willson & Schemske, 1980).

60 Primeras flores abiertas: corola totalmente formada con pétalos verdes mostrando los estigmas con un poco de secreción (Fig. 5D).

61 Inicio de la floración: 10% de las flores abiertas. Estado femenino: flor con corola rojo oscuro, los estigmas están cubiertos de compitum extraginoecial (Fig. 5E).

62 20% de las flores abiertas: 15 días después de que la flor se abra, el compitum extraginoecial desaparece y los estigmas empiezan a secarse. Las puntas de los pétalos empiezan a curvarse hacia fuera y maduran las estructuras masculinas con la dehiscencia de todas las anteras.

63 30% de las flores abiertas: los pétalos empiezan a marchitarse (Fig. 5).

64 40% de las flores abiertas: se caen los primeros pétalos (Fig. 5).

65 Plena floración: al menos el 50% de las flores abiertas.

67 Caída de las flores: los pistilos no polinizados se caen cuatro días después de la antesis.

69 Fin de la floración, se ven los frutos que han cuajado, los frutos en crecimiento empiezan a separarse unos de otros (Fig. 5J).



Figura 6. Morfología floral de *Asimina triloba* (L.) Dunal, pawpaw. (a) flor en estado femenino, sub-etapa 61; (b) flor en estado masculino, sub-etapa 62.

3.6. Etapa principal de desarrollo 7: desarrollo del fruto (Fig. 7)

Los 3-10 carpelos del gineceo de la flor del pawpaw se desarrollan hasta formar un racimo de frutos (Fig. 7). Este fruto tiene una forma oblonga, con una piel verde y fina, a veces se observan motas parduzcas/negras debido a daños por el viento o quemaduras solares (Fig. 8). El fruto del pawpaw es climatérico (Archbold & Pomper, 2003). El color del fruto pasa de verde a amarillento y la pulpa se vuelve más blanda conforme avanza la maduración, acelerándose este proceso cuando se recolecta el fruto (McGrath & Karahadian, 1994). En el sur de España, la maduración tiene lugar desde finales de agosto a mediados de septiembre, lo cual coincide con el periodo de recolección en Kentucky (EEUU), que suele ser desde el 20 de agosto al 21 de septiembre, dependiendo del cultivar (Pomper & Layne, 2005).

71 Crecimiento del ovario, ovario verde rodeado de corona de pétalos muertos.

72 20% del tamaño final del fruto

75 50% del tamaño final del fruto

76 60% del tamaño final del fruto

77 70% del tamaño final del fruto

78 80% del tamaño final del fruto

79 Fruto maduro para su recolección, la piel se torna amarillenta si ha estado expuesta directamente al sol. La pulpa tiene una consistencia y sabor adecuados (Fig. 7a).

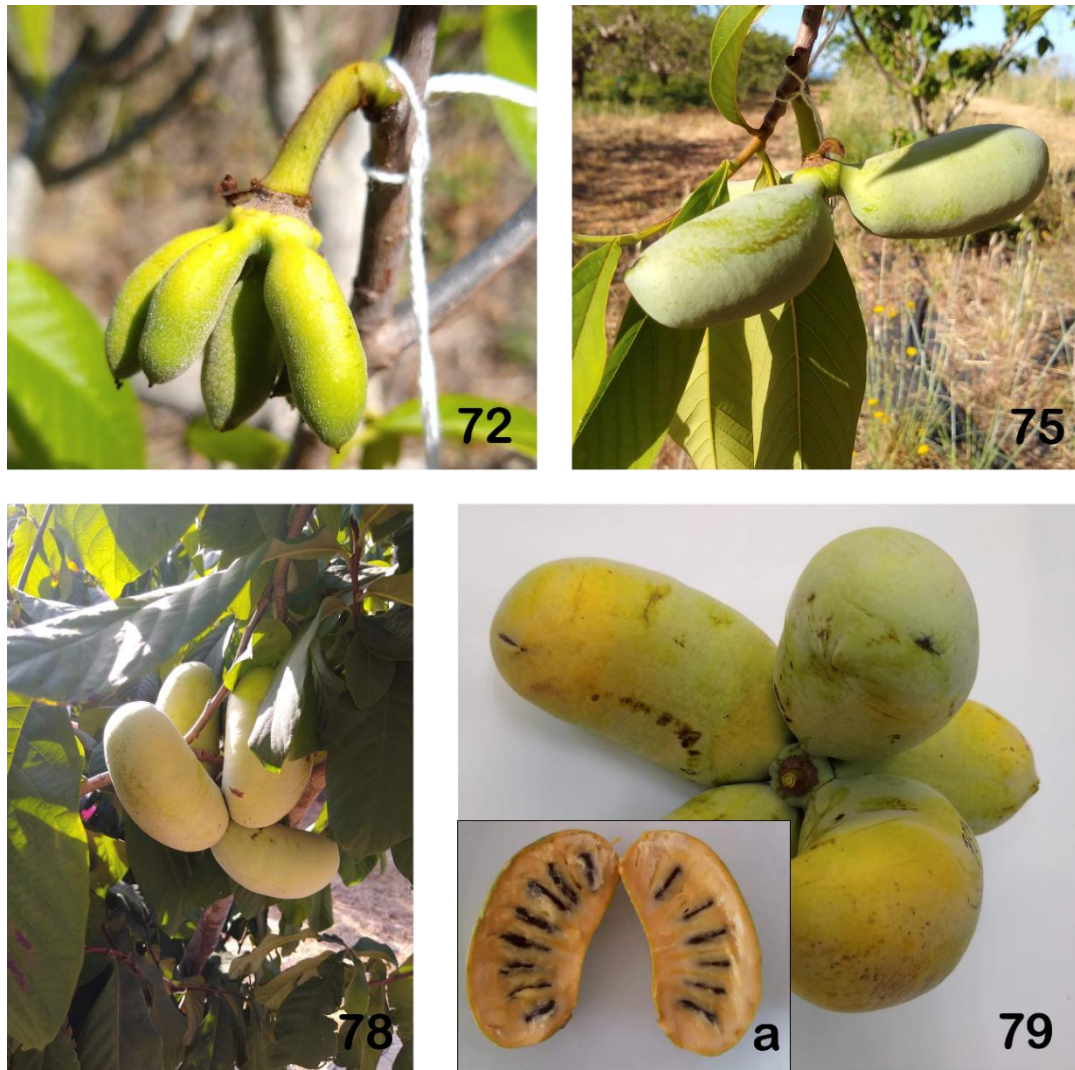


Figura 7. Etapas BBCH para el desarrollo del fruto de *Asimina triloba* (L.) Dunal, pawpaw. (a) sección longitudinal de fruto maduro.



Figura 8. Fruto maduro de pawpaw con manchas parduzcas en la piel.

3.7. Etapa principal de desarrollo 9: senescencia, entrada en dormancia (Fig. 9)

En el sur de España la senescencia dura 4 meses, desde julio a octubre.

91 El tallo ha terminado de crecer; el follaje está totalmente verde.

92 Las hojas empiezan a perder color.

93 Las hojas empiezan a caerse.

95 El 50% de las hojas se han caído.

97 Todas las hojas caídas.



Figura 9. Etapas BBCH para el desarrollo vegetativo de *Asimina triloba* (L.) Dunal, pawpaw.

En este trabajo, las etapas fenológicas de crecimiento del pawpaw se han descrito según la escala BBCH extendida. Los estudios previos sobre la fenología de esta especie estaban enfocados únicamente en la estación de la floración y sin usar una escala codificada estandarizada (Pomper et al., 2008; Szilagy, 2016). Sin embargo, la disponibilidad de una descripción detallada y estandarizada de todo el ciclo de vida (fase vegetativa y reproductiva) de una especie vegetal es esencial para estudios fenológicos comparativos entre diferentes ambientes, lo que cobra mayor importancia en un escenario como el actual de cambio climático.

El pawpaw es nativo del este de Norteamérica con un clima templado, lo que es una característica única en una familia tropical/subtropical como la de las anonáceas. El cultivo ha mostrado una buena adaptación al clima mediterráneo. De hecho, a pesar de las temperaturas más cálidas durante abril en el sur de España comparadas con las temperaturas en las mismas fechas en Kentucky, donde al amanecer la temperatura es de -2°C o inferior, no implica cambios significativos en la sucesión de etapas fenológicas del pawpaw entre ambas situaciones.

Un conocimiento preciso del ciclo de vida del pawpaw puede ayudar a la optimización de muchas prácticas hortícolas, como el injerto, la poda, técnicas de polinización, fertilización, maduración del fruto y aplicación de pesticidas. Por ejemplo, conocer el estado femenino de la flor y, por tanto, la duración de la receptividad estigmática y la duración del periodo efectivo de polinización es esencial para el éxito de la cosecha (Lora et al., 2011; Sanzol & Herrero, 2001). Esto es aún más importante en especies dicógamas. La polinización manual es una práctica común en *Annona cherimola* Mill. (chirimoya) en países de clima mediterráneo con producción comercial (Lora et al., 2011), y este puede ser el caso del pawpaw en lugares donde hay ausencia de polinizadores naturales apropiados. Otro ejemplo de la importancia de entender las etapas fenológicas es el manejo apropiado del cultivo mediante estrategias de fertilización. En Kentucky (EEUU), se recomienda incrementar la fertilización durante la etapa activa de crecimiento la cual, en esas condiciones, tiene lugar en mayo, junio y julio (Layne, 1996). Sin embargo, la fase activa de crecimiento puede ser diferente bajo otras condiciones ambientales, y este problema es más patente en el caso del hemisferio sur donde los meses son contrarios al hemisferio norte. Finalmente, este trabajo no solo ayuda a incrementar la eficiencia de las prácticas de manejo del cultivo, sino que también provee de bases e información útil para estudios científicos en este cultivo bajo el escenario actual de cambio climático.

CAPÍTULO 2





Capítulo 2: Desarrollo del embrión y el endospermo ruminado en una angiosperma con caracteres plesiotípicos, *Asimina triloba* (Annonaceae).

Resumen

El estudio del desarrollo del embrión y formación de la semilla son conocimientos básicos en una especie de interés agronómico. Además, la posición de *Asimina triloba* en un linaje de angiospermas de divergencia temprana brinda la oportunidad de ampliar información sobre la evolución de las plantas con flor. En este trabajo se estudia el desarrollo de la semilla de pawpaw desde la fecundación del óvulo a la germinación de la semilla. Mediante técnicas histológicas se ha podido observar la formación de un cigoto con dos prominentes nucléolos, así como la primera división del endospermo dando lugar a una célula micropilar ancha y una calazal más alargada, 4-5 días después de la polinización (DDP). Además de la diferenciación del endospermo en dominios micropilar y calazal 14-15 DDP. También se ha caracterizado la formación de ruminaciones y la transición del tejido de almacenamiento de nutrientes desde la nucela al endospermo en la semilla madura. Finalmente, el endospermo ruminado rodea al relativamente subdesarrollado embrión lineal con dos cotiledones planos. La semilla de pawpaw en el momento de la dispersión necesita una estratificación fría de 75-80 días para germinar. El embrión en desarrollo consume el endospermo a través de sus cotiledones que no emergen de la testa (germinación epigea criptocotilar).

Introducción

La semilla es el producto final en la evolución de las plantas con embrión, las denominadas embriofitas o plantas terrestres, que incluye también a las plantas con flor (Baroux & Grossniklaus, 2019; Rensing & Weijers, 2021). El saco embrionario más común en angiospermas es el de tipo *Polygonum*, compuesto por siete células y ocho núcleos; tres células en el extremo micropilar (la célula huevo junto con dos sinérgidas), una célula central con dos núcleos y tres células antipodales en el extremo calazal (Boavida et al., 2005; Maheshwari, 1950). Dependiendo de la especie, la célula central puede presentar dos núcleos parcial o totalmente fusionados antes de la fecundación (Liu et al., 2010).

El embrión durante su desarrollo se nutre a través de las células adyacentes de origen gametofítico en gimnospermas, pero en angiospermas este papel recae en el endospermo proveniente de la doble fecundación (Baroux & Grossniklaus, 2019) y se considera en gran medida como una sinapomorfía en angiospermas (Floyd & Friedman, 2000). En plantas con flor tras la doble fecundación, el embrión diploide resultante y el endospermo triploide se desarrollan en el interior del óvulo. Este endospermo y embrión están protegidos por las capas externas del óvulo que se convertirán en la cubierta de la semilla. La formación de la semilla, incluyendo el desarrollo de un embrión maduro, es un proceso fundamental que muestra una gran diversidad evolutiva entre las plantas terrestres (Baroux & Grossniklaus, 2019; Radoeva et al., 2019). Para entender la evolución de este proceso en angiospermas, son esenciales los estudios comparativos de la formación de semillas entre angiospermas plesiotípicas, de divergencia temprana y clados apotípicos dentro de las plantas con flor.

Numerosos estudios embriológicos realizados en angiospermas han revelado que las diferencias más evidentes se encuentran en las etapas finales de la embriogénesis, siendo la característica más distintiva la presencia de uno (monocotiledóneas) o dos (dicotiledóneas) cotiledones (Maheshwari, 1950). Sin embargo, los estudios en angiospermas basales y de divergencia temprana han revelado estructuras únicas (Friedman & Williams, 2004), como un aparato de la célula huevo compuesto por cuatro células encontrado en *Amborella trichopoda*, considerada como la especie hermana del resto de las angiospermas (Friedman, 2006). El endospermo triploide es el más común entre las angiospermas, aunque hay excepciones con endospermos de distintas ploidías. De hecho, las angiospermas basales y de divergencia temprana muestran frecuentemente un endospermo diploide (Friedman & Williams, 2004; Williams & Friedman, 2002) aunque *Amborella trichopoda* presenta un endospermo triploide (Friedman, 2006). Por lo tanto, no está clara la ploidía que representa el carácter ancestral (Baroux & Grossniklaus, 2019; Friedman & Williams, 2004). Por otro lado, hay más consenso respecto a la presencia de un endospermo celular (Floyd & Friedman, 2000) y un embrión poco desarrollado como características ancestrales en plantas con flor (Forbis et al., 2002).

El estudio de la embriología de angiospermas de divergencia temprana es también esencial para conocer la historia evolutiva de este proceso fundamental en angiospermas. En el clado de divergencia temprana Magnoliid (Chase et al., 2016) se encuentra la

familia *Annonaceae*, la mayor familia existente dentro del orden magnoliales, con unos 110 géneros y 2450 especies (Couvreur et al., 2019) con una distribución mayoritariamente tropical y subtropical. Algunas tienen frutos comestibles y son consumidos y comercializados en sus lugares de origen. La mayoría de estas especies pertenece al género *Annona* (por ejemplo, *Annona cherimola* Mill. (“chirimoya”), *Annona squamosa* Linn. (“anón”), “atemoya” (un híbrido entre *A. cherimola* y *A. squamosa*), *Annona muricata* Linn. (“guanábana”), *Annona reticulata* Linn. (“annona”), *Annona macrophyllata* Donn. Smith. (“ilama”), *Annona purpurea* L. (“soncoya”) o *Annona mucosa* Jacq. (“biriba”)). Hay una excepción en la distribución tropical y subtropical de las anonáceas y es el género *Asimina*, con especies adaptadas a clima templado. Compuesto por ocho especies con numerosos híbridos interespecíficos todos nativos de Norteamérica (Hormaza, 2014), incluyendo *Asimina triloba*, el “pawpaw” norteamericano, que es el fruto comestible más grande autóctono de EEUU (Duffrin & Pomper, 2006).

Las anonáceas han atraído mucha atención taxonómica y filogenética debido a su posición filogenética clave entre las angiospermas (Doyle & Le Thomas, 1996). Es por eso que existen un gran número de estudios sobre la biología reproductiva de las anonáceas que se han centrado en describir la flor (Carvalho & Webber, 2000; Kiill & Costa, 2003; Norman, 2003), caracterizar el desarrollo de la flor (Decraene & Smets, 1990; Galastri & Oliveira, 2016; Leins & Erbar, 1996; Lora et al., 2014) y la fase progámica (Lora et al., 2010, 2011; Losada et al., 2014b), incluyendo estudios en *Asimina* (Ferrer-Blanco et al., 2022; Lampton, 1957; Losada et al., 2017b; Norman & Clayton, 1986). Sin embargo los estudios sobre embriología son más escasos (Bhandari, 1971; Corner, 1949; Hayat, 1963; Hayat & Canright, 1965; Svoma, 1997b, 1998) y, en el caso de *Asimina*, mayoritariamente enfocados en la anatomía de la semilla (normalmente en forma de esquemas y dibujos), pero no desde un punto de vista del desarrollo (Doyle & Le Thomas, 1996; Mohana, Rao, 1982; Van Setten & KoeK-Noorman, 1986).

Estos pocos estudios sobre la embriología de las anonáceas han descrito la presencia de ruminaciones en la semilla, las cuales se suelen considerar como una estructura distintiva de muchas familias de las magnoliales (*Degeneriaceae*, *Himantandraceae*, *Myristicaceae*, *Eupomatiaceae*, *Annonaceae*), incluyendo *Asimina* (Bhandari, 1971; Doyle & Le Thomas, 1996). El término “ruminado” se aplica generalmente a un endospermo que muestra cualquier grado de irregularidad y un endospermo se considera ruminado cuando las invaginaciones o pliegues alcanzan una tercera parte del grosor de la semilla (Bayer & Appel, 1996). Hay una gran variabilidad en este tipo de endospermo como consecuencia de los diferentes orígenes de los tejidos implicados en su desarrollo. El endospermo ruminado está presente en al menos 58 familias de angiospermas y ha aparecido en muchas ocasiones de manera independiente a lo largo de la evolución (Bayer & Appel, 1996); sin embargo su desarrollo está muy poco estudiado, y no ha sido explorado en *Asimina*.

La posición filogenética clave de *Asimina* en las plantas con flor, brinda una excelente oportunidad de evaluar más a fondo la historia evolutiva de la embriología en las

angiospermas. También tiene la ventaja añadida de tener inexplorado el proceso de desarrollo del endospermo ruminado, además de ser el único género de las anonáceas adaptado a climas fríos (Kral, 1960). Por tanto, en este trabajo, realizamos por primera vez un estudio histológico detallado de la embriología en *Asimina triloba* (“pawpaw”), incluyendo la fecundación, emergencia del embrión de la semilla y prestando especial atención a la formación de las ruminaciones.

Material y Métodos

Material vegetal

Para este trabajo se usaron árboles adultos de una parcela experimental localizada en el IHSM La Mayora UMA-CSIC (España) y tres árboles adultos del Arnold Arboretum de la Universidad de Harvard en Boston (EEUU). Las flores se fijaron a lo largo del periodo de floración durante cuatro años consecutivos (2018-2022).

Polinizaciones controladas

Para evitar polinizaciones no deseadas en campo debidas a la visita de polinizadores, se embolsaron las flores seleccionadas antes de la fase de receptividad femenina con bolsas blancas de malla de nylon. Estas flores fueron revisadas diariamente mediante la retirada de la bolsa de nylon para detectar cuando alcanzaban el estado femenino (marcado por una gota de secreción que cubre el conjunto de estigmas). Una vez alcanzaban este estado de máxima receptividad estigmática se procedía a la polinización manual. Para ello se cogieron flores en estado masculino de árboles de la misma parcela pero de genotipo diferente. Las polinizaciones se llevaron a cabo con un pincel con el cual se recogía el polen de la flor en estado masculino e inmediatamente se depositaba en los estigmas de la flor en estado femenino. Estas flores polinizadas se volvieron a embolsar hasta que finalizaba su estado femenino, momento marcado por el inicio de la dehiscencia de las anteras. Para estudiar el desarrollo del saco embrionario independientemente de la polinización, un grupo de flores embolsadas se dejaron sin polinizar y se muestrearon tras la etapa femenina.

Preparaciones histológicas

Para estudiar el proceso de fertilización y desarrollo del embrión, las flores se muestrearon secuencialmente tras la polinización. Las muestras recogidas en el Arnold Arboretum, se introdujeron en viales con tampón PIPES 50 mM pH 6.8 (5 mM EGTA y 1 mM MgSO₄) a los que se añadió acroleína (2-propenal) a una concentración del 4%; las muestras se dejaron en el fijador un mínimo de 24 horas a temperatura ambiente. Las muestras fijadas se deshidrataron en una serie progresiva de disoluciones de etanol, para posteriormente incluirlas en historresina JB-4 (JB-4 Embedding Kit, Electron Microscopy Sciences, Hatfield, Pennsylvania, EEUU)(S. Floyd & Friedman, 2000). Las muestras recogidas en el IHSM La Mayora se fijaron en formaldehído 4% (paraformaldehído en tampón fosfato 1x (PBS) pH 7.3 (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄·2H₂O, 2.0 mM KH₂PO₄), durante una noche a 4°C y se conservaron en frío en formaldehído

0,1% en PBS 1x (Losada et al., 2014b); posteriormente se deshidrataron en una serie creciente de disoluciones de acetona (30%, 50%, 70%, 90%, 100%) y se incluyeron en historresina Technovit 8100 (Kulzer and Co., Wehrheim, Alemania).

El material incluido en historresina Technovit 8100 se seccionó en cortes de 2 μm con un ultramicrotomo y se colocó en gotas de agua sobre un portaobjetos previamente tratado con 3-aminopropiltriethoxi-silano al 2%. A los bloques de historresina JB-4 se les aplicó una fina capa de adhesivo en la superficie inferior y se cortaron en una habitación con una humedad del 70%. Estas condiciones facilitaron la obtención de secciones seriadas unidas, también de un grosor de 2 μm , que finalmente se colocaron en portaobjetos y se dejaron secar. Para una evaluación histológica general, los cortes semifinos se tiñeron con ácido peryódico y agente Schiff's (PAS) y azul de toluidina 0,1%, se les colocó un cubreobjetos y medio de montaje DPX. Finalmente, las muestras se observaron bajo campo claro en un microscopio Leica DM LB2 conectado a una cámara Leica DFC310 LX.

Para la visualización de tubos polínicos penetrando los óvulos, los pistilos se recolectaron 24 horas tras la polinización manual y se diseccionaron en un estereomicroscopio para extraer los óvulos. Estos óvulos se colocaron en un portaobjetos y se aplastaron con un cubreobjetos (técnica de “squash”). Estas preparaciones se tiñeron con azul de anilina al 0,1% en 0,1M PO_4K_3 (Currier, 1957; Linskens & Esser, 1956). Adicionalmente, se fijaron pistilos de 10 flores en FAA (formol, ácido acético y alcohol). Para la inclusión en parafina, las muestras se sometieron a un proceso de deshidratación en etanol 70% durante 24 horas, posteriormente y antes de la infiltración en parafina se sometieron a un pretratamiento de al menos 4 días consistente en una serie creciente de TBA (2-metil-2-propanol) y aceite parafinado en estufa a 30°C. Tras el pretratamiento, las muestras se infiltraron en parafina colocándolas en viales y en una estufa a 60°C al menos una semana. Finalmente, las muestras se incluyeron colocándolas en un molde con parafina para formar el bloque. Para obtener las secciones de tejido, estos bloques se cortaron en un micrótopo con cuchilla de metal. Los cortes seriados de unos 10-12 μm se colocaron en portaobjetos a los que previamente se les aplicó una pequeña cantidad de adhesivo y posteriormente se añade una fina capa de disolución de formol al 3%. Para que los cortes queden bien desplegados los portaobjetos se colocan en una plancha con calor. Las secciones se sometieron a un proceso de desparafinado, mediante una serie de lavados en Histoclear, etanol y finalizando con agua destilada. Una vez desparafinadas, se procedió a la tinción de las secciones con azul de anilina al 0,1% en 0,1M PO_4K_3 . Tanto las preparaciones de “squash” como las secciones, se observaron con un microscopio con lámpara de epifluorescencia con un filtro de excitación de 515-560 y un filtro LP590. Las imágenes se obtuvieron con el programa LAS V4.5.

Germinación de semillas

Para estudiar la germinación de la semilla, se recogieron frutos maduros de árboles localizados en el IHSM La Mayora. Se esterilizó la superficie de las semillas sumergiéndolas dos veces en una disolución de lejía (50% NaClO (3,5%) en agua

destilada, 0,1% de Tween-20) durante 10 minutos, para posteriormente enjuagarlas con agua destilada esterilizada. En una cabina de flujo laminar, se colocaron las semillas en placas de Petri con papel de filtro esterilizado humedecido con agua destilada estéril. Estas placas de Petri con las semillas se almacenaron a 4°C durante 75 días. Tras este periodo de tiempo, las semillas se sembraron a 4 cm de profundidad en tierra (mezcla de sustrato, fibra de coco y vermiculita (1:1:0'04)), los semilleros se coloraron en invernadero y se regaron cada 3 días. Semanalmente se extrajeron cinco semillas para evaluar su tamaño y emergencia de la plántula.

Resultados

Saco embrionario y proceso de fecundación

El gineceo de *A. triloba* tiene entre 3 y 10 carpelos uniloculados no fusionados (n= 35 flores), mientras que cada carpelo contiene entre 12 y 20 óvulos (n=83 carpelos). El androceo es globular compuesto por numerosas anteras (Ferrer-Blanco et al., 2022) localizadas bajo los carpelos. La superficie de cada estigma está cubierta por unas papilas secretoras que continúan a lo largo del corto estilo y el lóculo alargado del ovario (Fig. 10A, (Losada et al., 2017b)).

El óvulo de *A. triloba* es anátropo, bitégmico y crasinucelado. Presenta también pericalaza, la cual consiste en que el rafe (superficie de contacto entre funículo y cuerpo del óvulo) recorre el contorno del óvulo como resultado de un crecimiento basal diferencial. Esta pericalaza está conectada con el haz vascular y se extiende a lo largo del plano medio del óvulo hasta el extremo del tegumento externo (Fig. 10B). El micropilo está formado por el tegumento interno y sobresale más que la caperuza formada por el tegumento externo (Fig. 10B). En anthesis, el saco embrionario maduro es alargado con forma de reloj de arena conteniendo siete células y ocho núcleos, típico del tipo Polygonum, el tipo de saco embrionario más común en angiospermas. El aparato del huevo, consiste en la célula huevo y dos sinérgidas, localizado de manera distal y en el extremo micropilar del saco embrionario (Fig. 10D). Las células sinérgidas presentan un aparato filiforme en su polo micropilar donde también se localiza el núcleo y tienen una gran vacuola en el extremo opuesto (Fig. 10E). La célula huevo se localiza junto a las sinérgidas, mostrando un núcleo en su extremo proximal y una vacuola en su extremo distal (Fig. 10D). La célula central tiene dos núcleos y un gran número de gránulos de almidón (Fig. 10C). Por último, se observaron tres células antipodales en el extremo calazal (Fig. 10F) las cuales degeneran tras la fecundación. En estudios previos, se han realizado descripciones similares en forma de dibujo (Lampton, 1957).

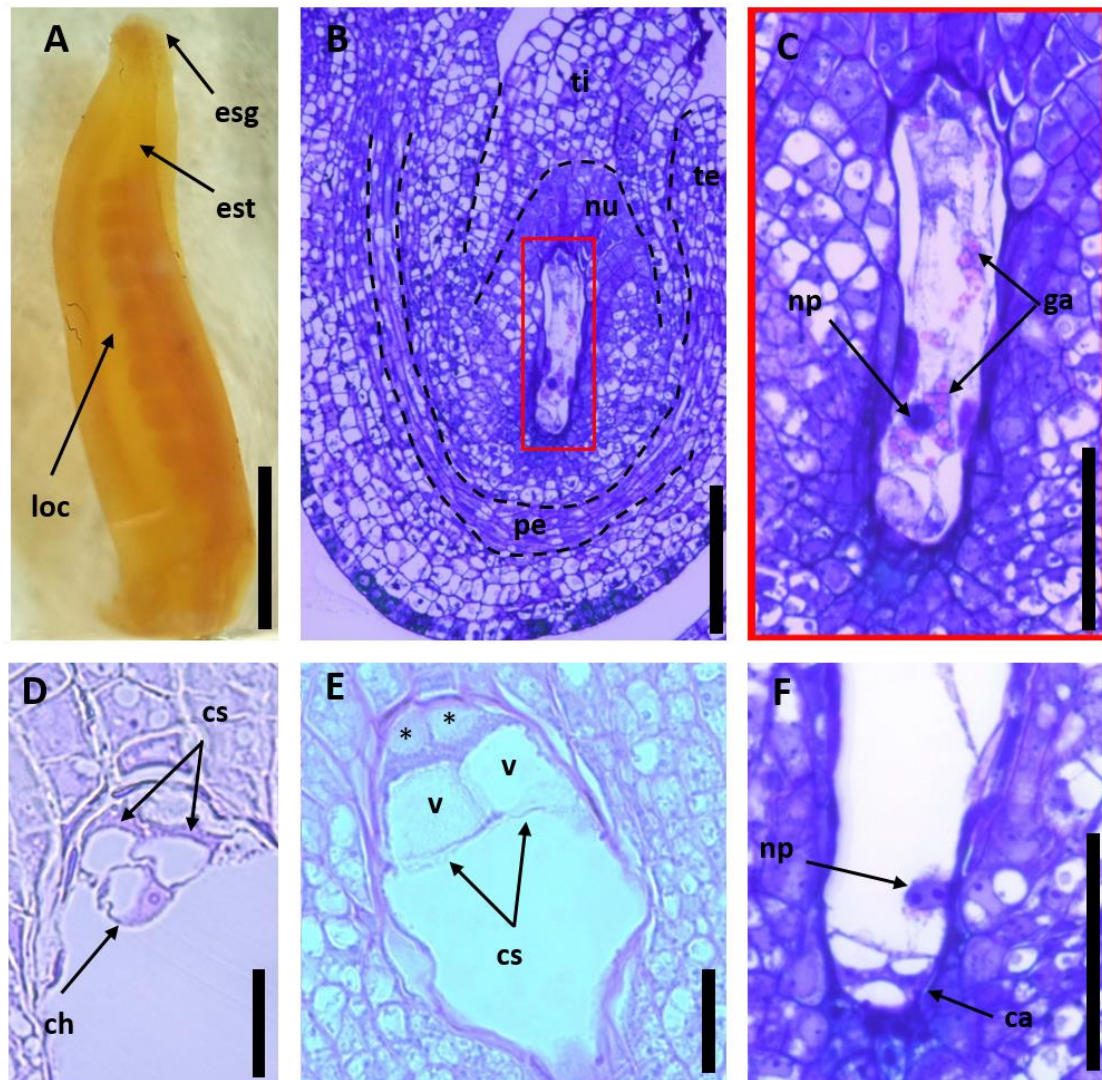


Figura 10. Pistilo de pawpaw, óvulo y saco embrionario sin fecundar. A. Carpelo incluido en bloque de historresina, B. Sección longitudinal de un óvulo maduro, C. Detalle del saco embrionario, D. Polo micropilar del saco embrionario, detalle del aparato del huevo, mostrando la célula huevo cuyo núcleo se encuentra en su polo calazal junto a una gran vacuola en su polo micropilar, E. Detalle de dos células sinérgidas y su aparato filiforme (asteriscos), F. Polo calazal del saco embrionario. ca (células antipodales), ch (célula huevo), cs (célula sinérgida), esg (estigma), est (estilo), ga (gránulos de almidón), loc (lóculo del ovario), nu (nucela), np (núcleos polares), pe (pericalaza), te (tegumento externo), ti (tegumento interno), v (vacuola). En esta figura, el polo micropilar (lado distal) del gametofito femenino está orientado hacia arriba y el polo calazal (lado proximal) hacia abajo. Escala A= 1mm, escala B= 100 μ m, escala D, E= 20 μ m, escala C, F= 50 μ m.

La fase progámica dura 24h (n=36 flores). Los granos de polen se liberan en tétradas durante la dehiscencia de las anteras (Lora et al., 2014) y germinan en el compitum exterior al gineceo, secreción formada por el conjunto de 3-6 estigmas (n= 9 flores) (Fig. 11A). El tubo polínico crece a lo largo del corto estilo y alcanza el lóculo del ovario 3 horas después de la germinación del polen (Losada et al., 2017b) (Fig. 11A, B). Una vez en el lóculo del ovario, el tubo polínico crece a través del endostoma del micropilo, penetra el extremo de la nucela y alcanza el aparato del huevo 24 horas después de la

interacción del grano de polen con el estigma (Fig. 11C, D). Se observó calosa en las capas celulares de la nucela que rodean el aparato del huevo (Fig. 11C). Después de la entrada del tubo polínico en el óvulo a través del micropilo, los dos núcleos polares permanecen sin fusionar.

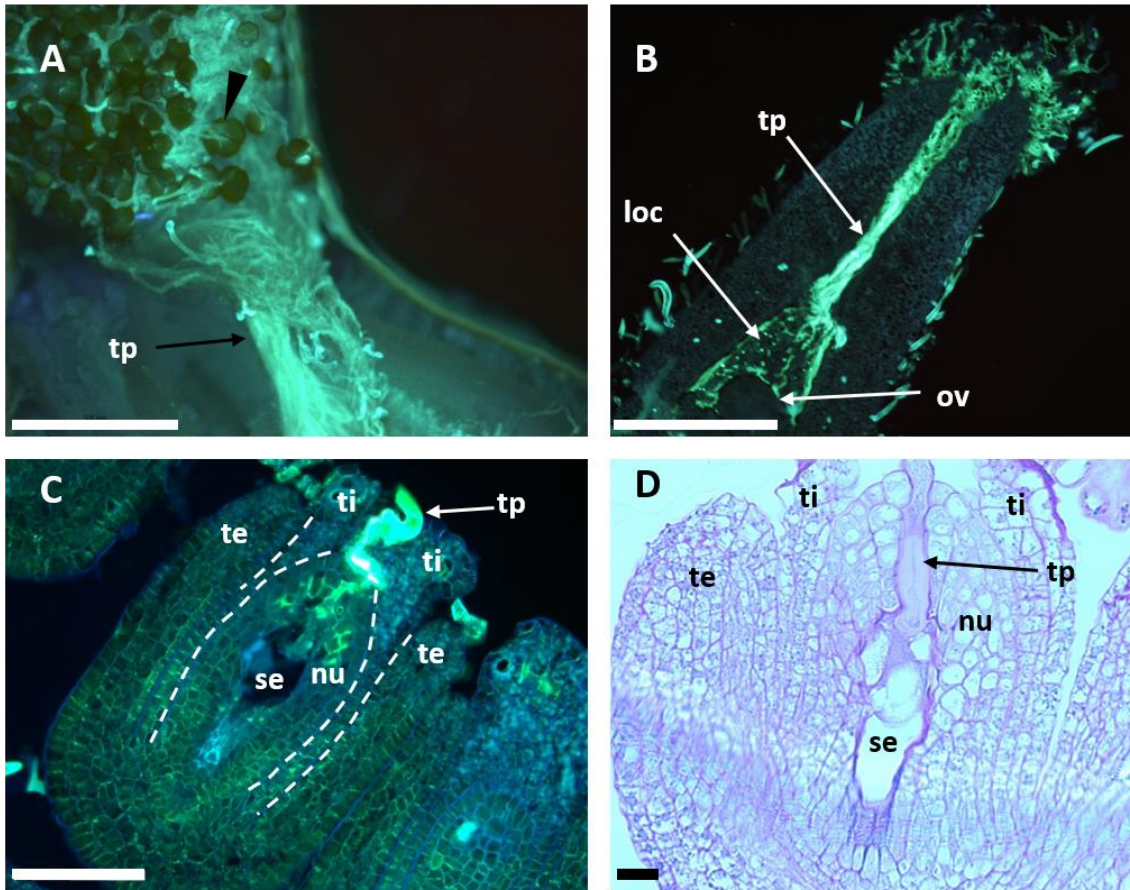


Figura 11. Crecimiento del tubo polínico en el pistilo. A. Estigma y estilo con polen en tétrada germinado (punta de flecha), B. Sección de la mitad superior de un pistilo, C. Sección de óvulo, D. Sección de un óvulo, mostrando un tubo polínico penetrando el extremo de la nucela, Las muestras de A, B y C fueron teñidas con azul de anilina. La muestra D fue teñida con PAS-Azul de toluidina. loc (lóculo del ovario), nu (nucela), ov (óvulo), se (saco embrionario), te (tegumento externo), ti (tegumento interno), tp (tubo polínico). Escala A, B= 500 μ m, escala C= 50 μ m, escala D= 20 μ m.

Cigoto, embrión y endospermogénesis

La primera evidencia de fecundación se observó cuatro o cinco días después de la polinización (DDP), pudiéndose observar un bucle citoplasmático densamente teñido con PAS situado entre el aparato del huevo y la célula central. Además, tras la cariogamia del núcleo espermático y la célula huevo, aparece un cigoto con un núcleo con bordes difusos y dos prominentes nucléolos (Fig. 12A, B, C) que no se observan en la célula huevo previo a la fecundación (Fig. 10D). La célula huevo también difiere del cigoto al ser más polarizada con una gran vacuola en el extremo distal y el núcleo con un citoplasma reducido en el extremo proximal (ver Fig. 10D y Fig. 12A-D). También se observó la fusión de los núcleos polares. En esta etapa, el endospermo está compuesto por una única

célula con numerosos gránulos de almidón (Fig. 12C). El cigoto permanece quiescente, mientras que el endospermo lleva a cabo su primera división celular, generando una partición inicial de una célula micropilar más ancha y una calazal más alargada (Fig. 12E, F). Este endospermo inicial comienza a sufrir sucesivas divisiones, formando una única hilera de células con una gran vacuola que en este punto ya no presentan gránulos de almidón, mientras que unas pocas células pequeñas y no vacuoladas de endospermo rodean al cigoto. Es en esta etapa cuando los dominios micropilar y calazal comienzan a diferenciarse (Fig. 12G). En esta única hilera de células, el polo micropilar es de menor tamaño que el calazal. Entre 7-8 DDP, un núcleo del endospermo migra al polo calazal del cigoto, mientras que los núcleos de la célula sinérgida no degenerada y las células antipodales todavía están presentes (Fig. 12D, F). El endospermo uniseriado muestra forma de barra en posición central 14-15 DDP y sigue creciendo acompañado del desarrollo de la nucela. La nucela aumenta el número de células, pero las células en contacto con el endospermo son de mayor tamaño y muestran una gran vacuola (Fig. 12G, H).

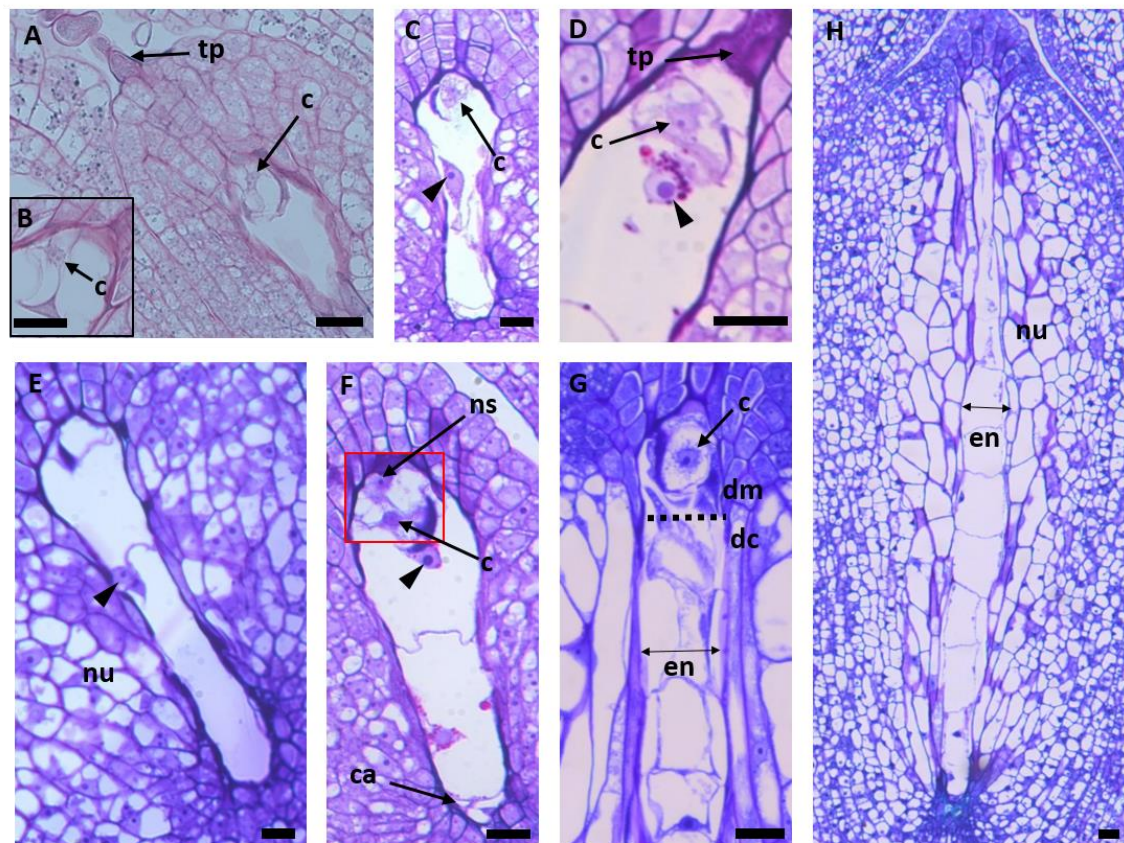


Figura 12. Desarrollo inicial de la semilla. A. Semilla inmadura 4 DDP mostrando un tubo polínico, cigoto y un bucle citoplasmático, B. Extremo micropilar del saco embrionario 4DDP mostrando un cigoto con dos nucléolos prominentes, C. Núcleos polares fusionados 4DDP, D. Extremo micropilar del saco embrionario 7-8 DDP mostrando un cigoto próximo a un núcleo del endospermo junto con gránulos de almidón, E. Primera división del endospermo. F. Endospermo de dos células con gránulos de almidón y un núcleo del endospermo cerca del cigoto 4DDP. El rectángulo rojo indica una reconstrucción digital de dos secciones adyacentes. G. Semilla 14-15 DDP con los dos dominios del endospermo (dominios micropilar y calazal), H. Semilla inicial 17-18

DDP con endospermo uniseriado. ca (células antipodales), dc (dominio calazal), en (endospermo), dm (dominio micropilar), nu (nucela), sn (núcleo de la célula sinérgida), tp (tubo polínico), c (cigoto), punta de flecha (núcleo del endospermo). Escala= 20µm.

El desarrollo del endospermo continua y 18-19 DDP comienza a ser multiseriado debido a que sufre divisiones longitudinales, al mismo tiempo que los dominios micropilar y calazal son aún más patentes (Fig. 13A). En el dominio micropilar, las células muestran forma piramidal y un citoplasma densamente teñido por PAS, mientras que en el dominio calazal presentan grandes vacuolas (Fig. 13A, C). En esta etapa del desarrollo (18-19 DDP), el embrión tiene unas 2-4 células. La nucela continúa creciendo mediante divisiones celulares e incrementando el número de células vacuoladas que son de mayor tamaño cuanto más cercanas están al endospermo (Fig. 13B). Mientras la nucela crece en tamaño, el tegumento interno mantiene sus dos capas de células rodeando la nucela y el tegumento externo continúa creciendo por divisiones celulares (Fig. 13B). Entre 20-22 DDP, el embrión presenta 6-8 células y continúa siendo rodeado por células de forma piramidal y con citoplasma densamente teñido por PAS (Fig. 13C). El dominio micropilar se sigue observando 41 pero no 68 DDP cuando el embrión tiene forma de corazón. En la semilla madura, el embrión es pequeño y alargado, con dos cotiledones planos y delgados (Fig. 14, ver anexo Fig. S1).

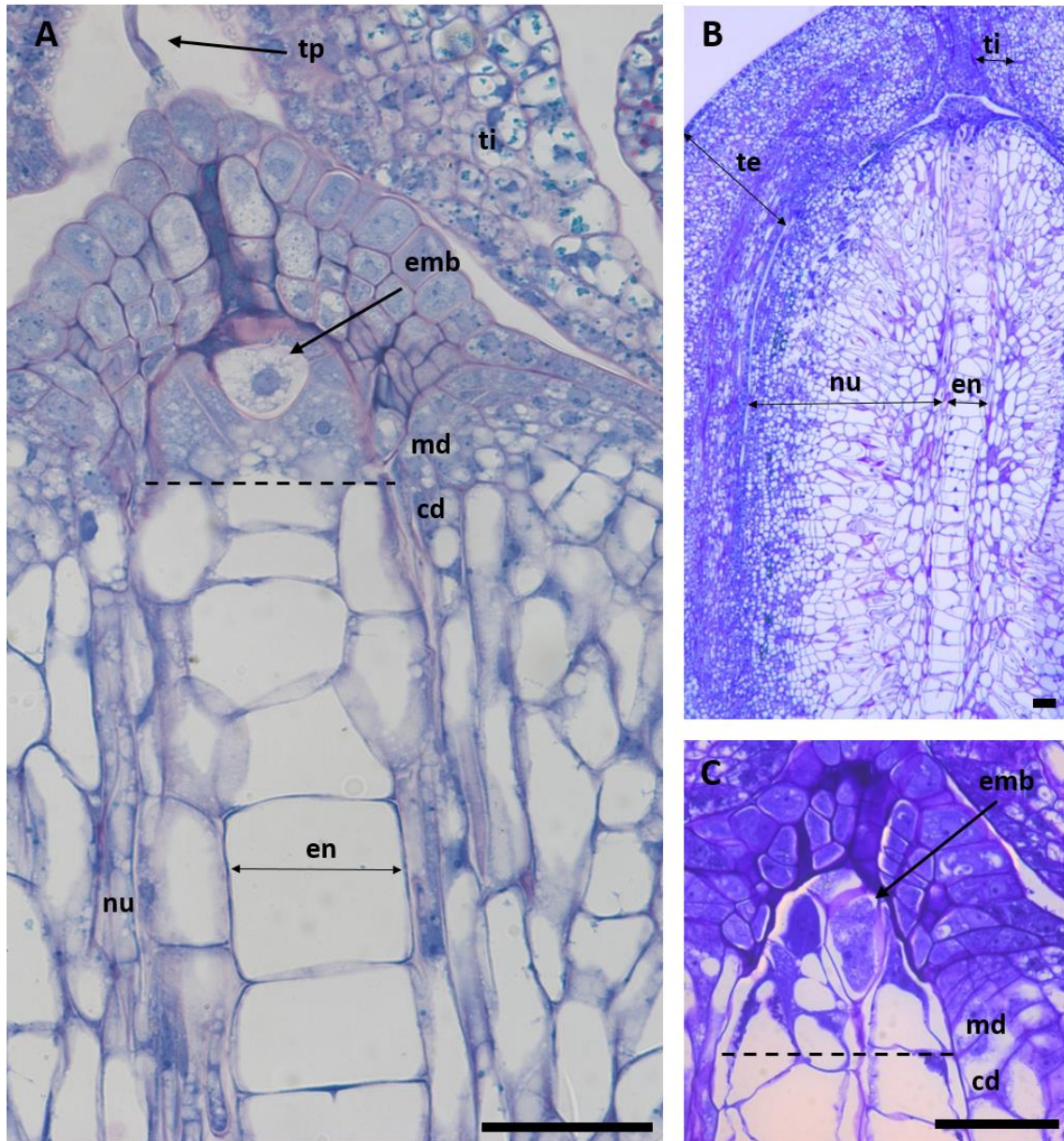


Figura 13. Inicio del desarrollo de la semilla. A. 18-19 DDP, embrión rodeado por el dominio micropilar de las células del endospermo. B. 18-19 DDP, endospermo pluriseriado. C. Detalle del extremo micropilar 20-22 DDP con un embrión de 6-8 células. emb (embrión), en (endospermo), dc (dominio calazal), dm (dominio micropilar), nu (nucela), te (tegumento externo), ti (tegumento interno), tp (tubo polínico). Escala= 50µm.



Figura 14. Desarrollo del embrión de *A. triloba*. A. Embrión 22 DDP, B. Embrión 33 DDP, C. Embrión 41 DDP, D. Embrión 68 DDP, E. Embrión en la semilla madura y

endospermo ruminado. en (endospermo), nu (nucela), cub (cubierta de la semilla), las puntas de flecha indican el embrión. Escala A-D= 50µm, escala E= 1mm.

Desarrollo de las ruminaciones y germinación de la semilla

Las ruminaciones comienzan a formarse debido a invaginaciones del tegumento interno (tegmen) y el tegumento externo (testa) mayoritariamente 20-22 DDP, cuando el embrión presenta de 6 a 8 células. El tegumento externo se desarrolla y se diferencia para formar una cubierta inicial de la semilla que comprende endotesta y exotesta, y entre estas dos capas se encuentra la mesotesta formada por fibras transversales y longitudinales (Fig. 15A). De este modo, la epidermis del tegumento externo se convierte en la exotesta con células isodiamétricas que acumulan taninos (Fig. 15A). La hipodermis externa y el parénquima en torno al haz vascular pasan a formar la mesotesta; estas células se alargan y forman fibras en la semilla madura. La capa externa de la mesotesta se orienta radialmente, mientras que la capa interna se orienta perpendicularmente al eje de la semilla (Fig. 15A). Finalmente, la capa más interna del tegumento externo pasa a formar la endotesta. El tegumento interno continúa estando compuesto por dos capas celulares. En esta etapa inicial del proceso, la ruminación está formada por la endotesta (parte del tegumento externo), tegmen (tegumento interno) y los tejidos que rodean al endospermo, como son la epidermis y la subepidermis de la nucela. La ruminación se extiende desde el flanco lateral al plano medio de la semilla inmadura, pero 20-22 DDP todavía no alcanza el endospermo central (Fig. 15A, 16A, B). No es hasta 33 DDP cuando el pliegue de la ruminación alcanza al endospermo (Fig. 15C).

A los 41 DDP, cuando el embrión suele presentar en torno a 24 células (Fig. 14C, 15C), el endospermo comienza a reemplazar la nucela (Fig. 15D). Finalmente, 68 DDP, el tegumento interno muestra solo una capa de células y la nucela ha sido, en gran medida, reemplazada por el endospermo (Fig. 15E, 17). En este punto, en la zona externa del endospermo, se observa una capa de células de origen de desarrollo desconocido (nucela o endospermo) las cuales presentan un citoplasma muy densamente teñido por PAS y sin vacuolas (Fig. 15E). Por tanto, en esta etapa avanzada de desarrollo, la ruminación está formada externamente por la endotesta, e internamente por fibras transversales de la mesotesta, una capa de células del tegumento interno, una capa de células (solo observadas en la cara externa) y el endospermo. También se observaron numerosos oleosomas en las células del endospermo e idioblastos en las capas más externas de este. En la etapa final del desarrollo de la semilla, observamos un endospermo ruminado lameliforme con un patrón bisimétrico y con ausencia de haces vasculares en los pliegues. Las numerosas ruminaciones se disponen de manera más o menos regular como planos transversales orientados perpendicularmente al eje de la semilla (Fig. 15F).

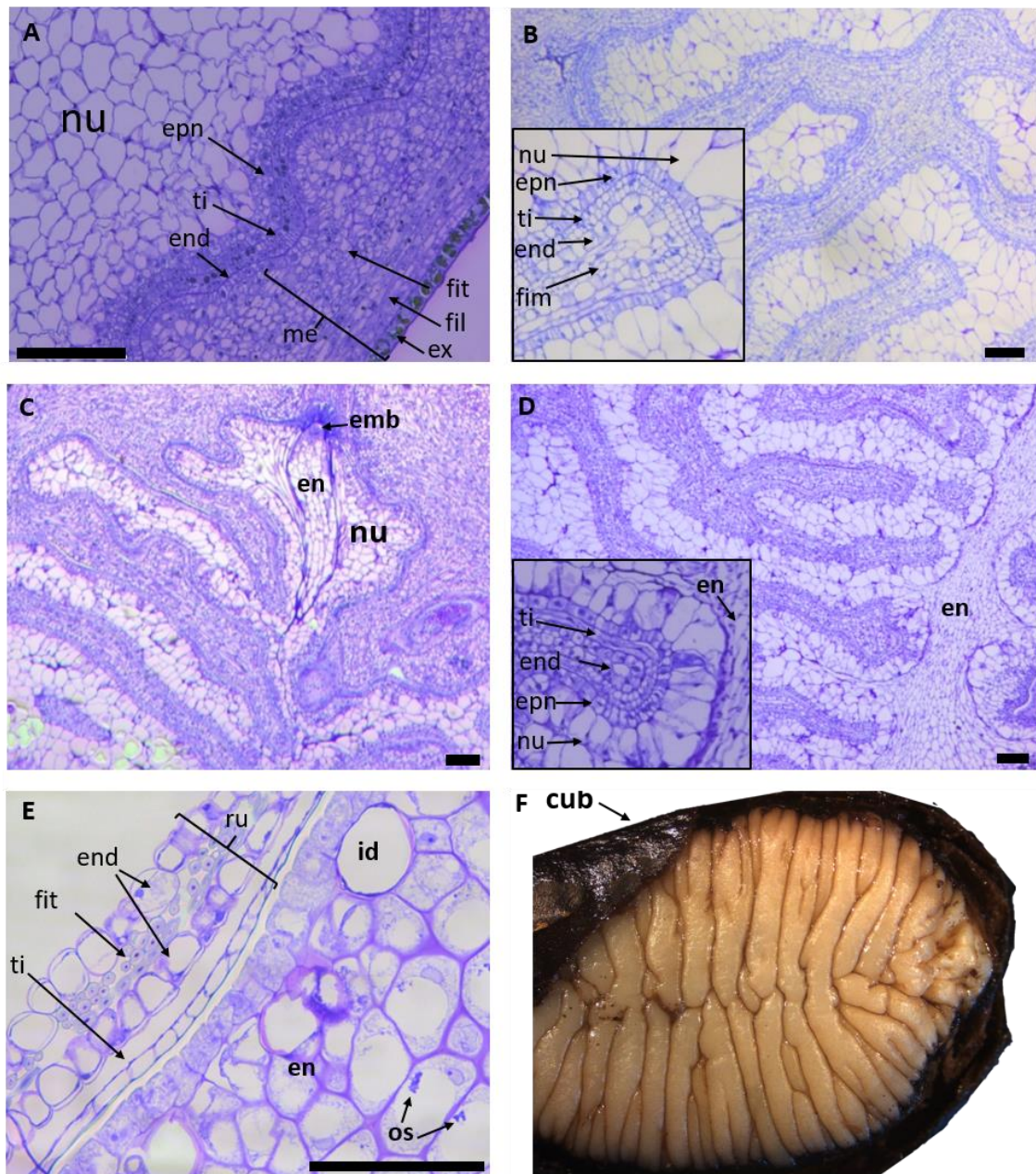


Figura 15. Desarrollo de las ruminaciones. A. 20-22 DDP, B. 33 DDP, C. 41 DDP, D. 41 DDP, E. 68 DDP (el espacio que se observa entre los tejidos es un artefacto histológico), F. Semilla madura con la cubierta parcialmente eliminada mostrando un endospermo ruminado lameliforme. cub (cubierta de la semilla), emb (embrión), en (endospermo), end (endotesta), epn (epidermis nucelar) ex (exotesta), fil (fibras longitudinales de la mesotesta), fit (fibras transversales de la mesotesta), id (idioblasto), me (mesotesta), mfi (fibras de la mesotesta), nu (nucela), os (oleosomas), ru (ruminación), ti (tegumento interno). Escala= 100 μ m.

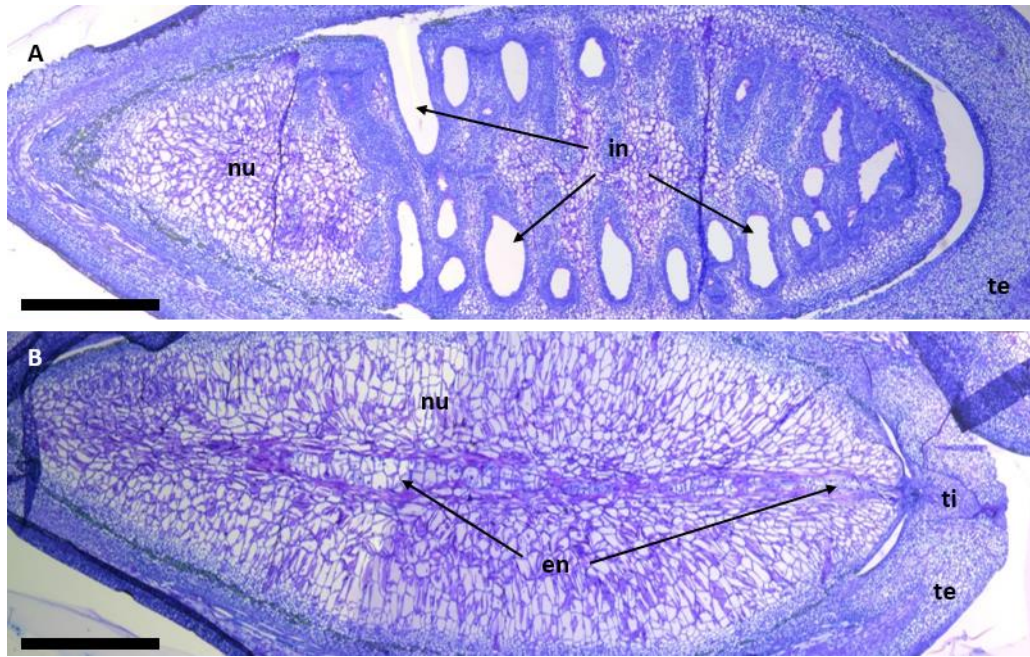


Figura 16. Secciones longitudinales de una semilla en formación 22 DDP. A. Sección cercana a la superficie de la semilla en formación, B. Sección en el plano medio. en (endospermo), in (invaginación), nu (nucela), te (tegumento externo), ti (tegumento interno). Escala= 500 μ m.

El proceso comprendido desde la polinización a la dispersión de la semilla necesita de 5 a 6 meses. La semilla madura es oblonga y ligeramente bicóncava, redondeada y plana de unos 3 cm de largo y 1,5 cm de ancho (Finneseth et al., 1998). Contiene un embrión pequeño de 4 mm de largo, con dos cotiledones planos y radícula, rodeado por el endospermo (Anexo Fig. S1A-B, Fig. 17). Tras la dispersión de la semilla, esta necesita al menos una estratificación húmeda de 75-80 días a 4°C, tardando un total de 5 meses en germinar en condiciones de invernadero. Durante la germinación de la semilla, los dos cotiledones crecen consumiendo el endospermo (Fig. 17F), y nunca se observa que salgan de la testa. Las hojas emergen solo cuando el sistema radicular está bien desarrollado. Este tipo de germinación se ha descrito previamente como germinación epigea criptocotilar (Finneseth et al., 1998) (Anexo Fig. S1C).

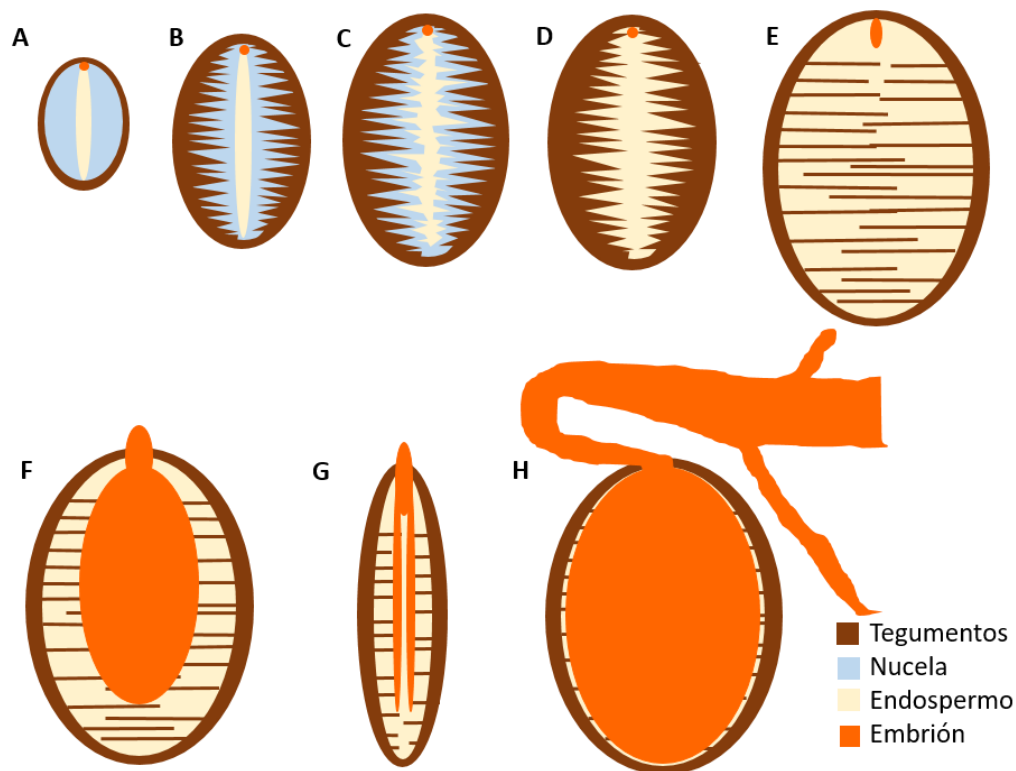


Figura 17. Representación esquemática del proceso desde la fecundación a la germinación. Los dibujos de óvulo y semillas ilustran el destino del desarrollo de los tegumentos (marrón), nucela (celeste), endospermo (amarillo) y embrión (naranja). La fila superior de izquierda a derecha, muestra el proceso desde la fecundación a la semilla madura: A. La nucela aumenta en tamaño y el endospermo forma una barra central. B. Los tegumentos se pliegan sobre el tejido nucelar. C. El endospermo comienza a crecer reemplazando a la nucela. D. El endospermo termina por sustituir a la nucela. E. Semilla madura, el embrión es pequeño y recto rodeado por el endospermo ruminado como tejido de almacenamiento de nutrientes. En la fila inferior de izquierda a derecha, se representa la germinación de la semilla: F. Los cotiledones empiezan a consumir el endospermo y emerge la radícula. G. Vista lateral de la etapa F, mostrando los dos cotiledones. H. El endospermo es consumido totalmente por los cotiledones que en ningún momento salen de la cubierta de la semilla, la raíz está bien desarrollada.

Discusión

En *Asimina triloba* las estructuras femeninas maduran antes que las masculinas, presentando dicogamia protogínica (Brett & Callaway, 1992) que dificulta la autopolinización en la misma flor. Sin embargo, la autofecundación puede ocurrir entre flores del mismo árbol debido a la larga receptividad estigmática y a que el ciclo de las flores puede no estar sincronizado en el mismo árbol (Losada et al., 2017b). En el inicio de la antesis, las flores comienzan a abrirse mostrando los estigmas inmaduros 15 días antes de la dehiscencia de las anteras. Cinco días antes de la dehiscencia de las anteras, la corola pasa de color verde a rojo oscuro, alcanzando la máxima receptividad con la aparición el compitum exterior al gineceo formado por el conjunto de estigmas. Los estigmas dejan de ser receptivos cuando la flor pasa a la etapa masculina marcada por la dehiscencia de las anteras (Losada et al., 2017b).

El pistilo de Asimina triloba muestra estructuras plesiomórficas que favorecen una rápida fecundación

El género *Asimina*, al que pertenece *A. triloba*, es el único en las anonáceas adaptado a climas fríos, pero comparte numerosas estructuras con especies de esta familia principalmente tropical/subtropical durante la fase progámica y desarrollo del embrión. Muchas de ellas se pueden considerar estructuras plesiomórficas en plantas con flor. El pawpaw tiene un óvulo con caperuza en el cual el tubo polínico accede a través del micropilo formado exclusivamente por el tegumento interno. Para alcanzar el micropilo, los granos de polen germinan y compiten en los estigmas que forman un compitum exterior al gineceo, una característica también observada en especies del grupo ANITA y Magnoliid (Endress & Igersheim, 2000; Lora et al., 2016; Williams et al., 2010). La competición entre gametofitos masculinos continúa a lo largo del corto estilo donde se pueden observar numerosos tubos polínicos. Esto difiere de *Annona cherimola*, en la cual la competición entre tubos polínicos ocurre mayoritariamente en el estigma y solo 1-2 tubos polínicos recorren el estilo (Lora et al., 2010). Es muy interesante ver que *A. triloba* presenta dicogamia protogínica junto con una larga receptividad estigmática de aproximadamente 11 días (Losada et al., 2017b). Esto contrasta con la duración de la receptividad estigmática de dos días consecutivos que generalmente se presenta en angiospermas basales y de divergencia temprana (Endress, 2010). A pesar de esta prolongada receptividad estigmática, el pawpaw muestra un rápido crecimiento de los tubos polínicos a lo largo de la ruta estigma-estilo-lóculo del ovario, y los tubos polínicos solo necesitan dos días para alcanzar el aparato del huevo del saco embrionario. Por tanto, parece que el sistema favorece la llegada de un alto número de granos de polen durante un largo periodo y que, una vez germinados, pueden fecundar el óvulo rápidamente maximizando de esta manera el éxito reproductivo evitando, al mismo tiempo, la autofecundación.

El saco embrionario se encuentra rodeado por la nucela formando un óvulo crasinucelado que generalmente se ha descrito como una estructura plesiomórfica en angiospermas basales y de divergencia temprana (Endress, 2011a, 2011b; Rudall, 2021). En las primeras etapas de desarrollo, los tegumentos surgen de una región de la nucela, en concreto de la calaza (Rudall, 2021), pero posteriormente, en *A. triloba*, esta calaza se extiende en torno a la nucela que contiene el saco embrionario, formando una caperuza con los tegumentos adheridos a ella y pasando a denominarse pericalaza. La pericalaza es una estructura particular observada en las anonáceas y fue definida por primera vez por Corner (Corner, 1949) y se considera una estructura sinapomórfica en anonáceas, ya que solo un grupo externo a esta familia presenta esta estructura, el género *Austrobaileya* (Doyle & Le Thomas, 1996).

Inicialmente, el embrión de Asimina triloba muestra un desarrollo lento rodeado por el dominio micropilar

En pawpaw, el embrión se desarrolla lentamente; la primera evidencia de fecundación tiene lugar 4-5 DDP, cuando se observa un núcleo de bordes difusos con dos prominentes

nucléolos en el cigoto. La presencia de estos dos nucléolos en el cigoto también ha sido considerado evidencia de fecundación en otras angiospermas (Faure et al., 2002; Wu et al., 2011). Las primeras células del embrión se observaron 18-19 DDP y permanece con estas pocas células más de un mes tras la polinización. Concomitantemente a la presencia de estos prominentes nucléolos en el cigoto, se produce la primera división celular del endospermo para dar lugar a una célula ancha en el polo micropilar y una más alargada en el polo calazal.

La primera división del endospermo es generalmente asimétrica en angiospermas basales y de divergencia temprana estudiadas hasta la fecha (Floyd & Friedman, 2000, 2001; Lora et al., 2010; Tobe et al., 1993), a excepción de *Sarcandra glabra*, *Sarcandra chloranthoides* y *Liriodendron tulipifera* (Floyd & Friedman, 2000). Esta primera división asimétrica del endospermo da lugar a dos células con un destino diferente en el desarrollo y se considera un proceso plesiomórfico en angiospermas. Mayoritariamente, el patrón de desarrollo del endospermo se clasifica en tres tipos dependiendo del tipo de división asimétrica (Floyd & Friedman, 2001). El patrón de desarrollo del endospermo más ancestral, ya que ha sido descrito en *Amborella*, muestra una primera división celular oblicua. En los otros dos tipos de patrón de desarrollo del endospermo, la primera división es transversal al eje longitudinal del endospermo. Sin embargo, en un caso el patrón de desarrollo es seguida por un desarrollo helobial en el cual las células micropilares muestran un desarrollo con núcleos libres y las del polo calazal presentan desarrollo celular, mientras que en el segundo tipo de patrón de desarrollo, tras la primera división transversal las dos células resultantes micropilar y calazal presentan un desarrollo celular (Floyd & Friedman, 2001).

El patrón de desarrollo del endospermo que implica un desarrollo celular con una primera división ya sea oblicua o transversal, es considerada ancestral entre las angiospermas (Donoghue & Scheiner, 1992; Friedman, 1994). La mayoría de las familias del clado Magnoliid, presentan un endospermo celular *ab initio*, incluyendo *Annonaceae* (Bhandari, 1971; Donoghue & Scheiner, 1992), en la cual la división del núcleo primario del endospermo ha sido descrita como transversal (Bhandari, 1971). En *Artabotrys hexapetalus* (Svoma, 1997a) y *Annona cherimola* (Lora et al., 2010) las divisiones sucesivas del endospermo dan lugar a células más grandes en el polo micropilar. Sin embargo, en el caso de *A. triloba* la asimetría no es tan pronunciada y la mayor diferencia se encuentra entre la forma más ancha de la célula micropilar y la más alargada de la célula calazal en la primera división del endospermo.

Una vez ha tenido lugar la primera división del endospermo, el núcleo de la célula micropilar migra hacia el lado proximal de la célula huevo, como también se ha observado en otras angiospermas de divergencia temprana (Floyd & Friedman, 2000). Es interesante tener en cuenta que las primeras células del embrión se observan 17-18 DDP coincidiendo con la aparición de numerosas divisiones longitudinales sucesivas junto con el proceso de diferenciación en el endospermo, dando lugar a un endospermo multiseriado con dos dominios claramente diferenciados, micropilar y calazal. El dominio micropilar está formado por células pequeñas, con un núcleo grande y un citoplasma densamente teñido

por PAS, típico de una actividad metabólica intensa, mientras que el dominio calazal presenta células con una gran vacuola. Este particular dominio micropilar, hasta donde sabemos, ha sido raramente observado en angiospermas. Células similares con este citoplasma densamente teñido con PAS rodeando al embrión en desarrollo solo se han observado previamente en angiospermas basales como *Ceratophyllum demersum* (Floyd & Friedman, 2000) y *Trimenia moorei* (Friedman & Bachelier, 2013).

La primera división del cigoto en pawpaw es transversal, dando lugar a una célula basal y una apical, como ocurre en la mayoría de plantas con flor (Lau et al., 2012), incluyendo unas pocas especies estudiadas en *Annonaceae* (Bhandari, 1971). La asimetría en esta primera división es variable y no parece seguir una regla en angiospermas (Sivaramakrishna, 1978). En pawpaw, las células apical y basal parecen ser similares, como en *Cananga odorata*, también perteneciente a *Annonaceae* (Bhandari, 1971). Posteriormente y tras sucesivas divisiones celulares el embrión presenta una forma alargada. Este desarrollo inicial de la embriogénesis ocurre dentro del dominio micropilar formado por células metabólicamente activas que acompañan al embrión en su desarrollo inicial. Este dominio micropilar se observó hasta los 45 DDP, pero previamente ya se empezó a desarrollar otra particular estructura en *Asimina triloba*, las ruminaciones del endospermo.

La transición del tejido de almacenamiento de nutrientes, desde la nucela al endospermo ruminado

Unos pocos días después de que el endospermo de *A. triloba* pase a ser multiseriado y el embrión comience a sufrir las primeras divisiones 20-22 DDP, comienzan a formarse unas ruminaciones incipientes desde los flancos, formadas por el tegumento interno (tegmen) y capas provenientes del tegumento externo (testa). En esta etapa, el tejido mayoritario e inicial de almacenamiento de nutrientes es la nucela que gradualmente será reemplazada por el endospermo, pero manteniendo las ruminaciones. Por tanto, el tejido de almacenamiento final en la semilla ruminada en *A. triloba* es el endospermo, como normalmente ocurre en angiospermas (Linkies et al., 2010). Se encuentran transiciones similares en el tejido de almacenamiento en angiospermas de divergencia temprana como *Apama sliquosa* (*Aristolochiaceae*) con un endospermo ruminado similar (Periasamy, 1964) y en angiospermas basales como *Austrobaileya scandens* (Losada et al., 2017a) y *Trimenia* (Friedman & Bachelier, 2013), pero no muestran ruminaciones. Comúnmente en dicotiledóneas como por ejemplo en leguminosas, el endospermo es consumido por el embrión, el cual pasa a ser el tejido de almacenamiento en la semilla madura (Lu & Magnani, 2018; Weber et al., 2005). Por otro lado, en algunas angiospermas, el tejido de almacenamiento también puede ser la nucela (tejido materno) y se denomina perispermo. Este es el caso de los pseudocereales como el amaranto y quínoa que presentan una semilla perispérmica (Lu & Magnani, 2018), pero también se encuentra en angiospermas basales como *Nymphaeales* que presentan un perispermo de origen materno rico en almidón (Friedman et al., 2012). Por último, tanto endospermo como perispermo se han

observado en semillas de angiospermas basales y aún se debate cuál de ellos es el tejido de almacenamiento ancestral en plantas con flor (Friedman et al., 2012).

El endospermo ruminado ha surgido de manera independiente numerosas veces durante la evolución de las plantas con flor, por tanto, se sugiere que es una estructura derivada entre las angiospermas. Se ha identificado en un gran número de familias de magnoliales, incluyendo *Annonaceae*, en la cual el endospermo ruminado es especialmente diverso. Las ruminaciones pueden generarse a partir de invaginaciones del tegumento externo como en *Myristicaceae*, o invaginaciones de ambos tegumentos, como en *Austrobaileya* o en algunos géneros de anonáceas como *Alphonsea*, *Annona*, *Artabotrys*, *Uvaria*, *Popowia*, *Xylopi*a, *Miliusa* (Bhandari, 1971; Doyle et al., 2008; Nurhayani et al., 2019), incluyendo *A. triloba*, en el cual una capa de células del tegumento interno se puede observar en las ruminaciones de la semilla madura. Dentro de la diversidad de endospermos ruminados que muestra la familia *Annonaceae*, hay dos condiciones extremas como la espiniforme, en la cual la testa (tegumentos interno y externo) penetra en forma de espinas en el endospermo, y la lameliforme, que da lugar a láminas transversales, siendo esta segunda condición la que se observó previamente en *A. triloba* (Doyle & Le Thomas, 1996), y que se ha podido corroborar en este trabajo.

Se han sugerido dos posibles hipótesis para el significado biológico y evolutivo del endospermo ruminado. Una primera hipótesis está relacionada con la presencia de sustancias fenólicas o aceites esenciales en los pliegues que hacen a la semilla menos atractivas a los depredadores (Bayer & Appel, 1996). Una segunda hipótesis sugiere que el endospermo ruminado puede estar relacionado con el aumento de superficie de contacto entre endospermo y tegumento para facilitar la imbibición de la semilla y el proceso de germinación (Bayer & Appel, 1996). De esta forma, las ruminaciones podrían facilitar la entrada de agua a través del opérculo y fluir en el espacio entre la testa y el tejido de almacenamiento lo cual ayudaría a hidratar e iniciar la movilización de nutrientes (Svoma, 1997a).

En la semilla de pawpaw en el momento de la dispersión, se han observado numerosos idioblastos que probablemente contengan lípidos y sin gránulos de almidón, como se ha visto también en numerosas especies de anonáceas (Corner, 1949) y confirmado en otros estudios (Martinez Maldonado et al., 2013). El endospermo ruminado de la semilla de pawpaw es copioso y es consumido por el pequeño y relativamente poco desarrollado embrión, el cual requiere de un crecimiento y desarrollo adicionales previos a la germinación. Las angiospermas basales y de divergencia temprana generalmente se caracterizan por tener un embrión pequeño respecto al tamaño de la semilla si se compara con la relación de tamaño entre embrión y semilla de angiospermas más derivadas, lo que sugiere que se trata de un carácter ancestral entre las angiospermas (Forbis et al., 2002). El embrión poco desarrollado se correlaciona además con un retraso en la germinación (Friedman et al., 2012) y este puede ser un primer mecanismo de obtención de dormancia en angiospermas de divergencia temprana (Forbis et al., 2002). De hecho, las semillas de pawpaw necesitan 75-80 días de estratificación fría para iniciar la germinación (Finneseth et al., 1998).





CAPITULO 3



Capítulo 3: Sistema de Incompatibilidad Tardía (SIT) en *Asimina triloba*.

Mecanismo e identificación y análisis de los genes implicados en el proceso.

Resumen

Los estudios sobre los Sistemas de Incompatibilidad Tardía (SIT) son muy escasos en plantas con flor y más aún en angiospermas de divergencia temprana. Con el fin de aportar información en este ámbito del conocimiento, en este trabajo se realiza un abordaje macroscópico, histológico y transcriptómico del SIT en *A. triloba*. Los resultados obtenidos indican que, en las autopolinizaciones, el desarrollo del embrión se detiene 14 días después de la polinización (DDP) tras haberse formado un cigoto y un endospermo uniseriado y, como consecuencia, se produce una abscisión masiva de los frutos 20 DDP. Los estudios de transcriptómica indican que hay diferencias en la expresión de genes en las semillas procedentes de polinización cruzada y autopolinización a los 8 DDP, pero que no se observan a los 4 DDP. A diferencia de las semillas procedentes de cruzamiento, las semillas procedentes de autofecundación no presentan expresión génica relacionada específicamente con la primera división del cigoto a los 8 DDP. Con estos resultados se propone que *A. triloba* presenta un SIT poscigótico debido a un bloqueo en la primera división del cigoto.

Introducción

En angiospermas existen distintos mecanismos que impiden o dificultan la autofecundación. Uno de ellos es la separación temporal o espacial de los órganos reproductivos como ocurre con la dicogamia protogónica presente en distintas especies de angiospermas de divergencia temprana como las anonáceas entre las que se incluye *Asimina triloba* (Losada et al., 2017b). Otro sistema es la incompatibilidad floral, que implica un reconocimiento célula-célula que impide la autofecundación, y de la que se ha descrito un mínimo de tres sistemas de incompatibilidad (**SI**). El que presenta una mayor distribución dentro de las angiospermas es el Sistema de Incompatibilidad Gametofítico (**SIG**) determinado por el gametofito masculino con un reconocimiento de la compatibilidad en el estigma y/o el estilo, cuyo mecanismo molecular y genético se encuentra estudiado en *Solanaceae*, *Rosaceae* y *Papaveraceae*. El segundo sistema de incompatibilidad, sería el Sistema de Incompatibilidad Esporofítico (**SIS**) cuya compatibilidad tiene lugar en el estigma y la determina el esporofito que ha producido el polen (Bateman, 1954). El tercer sistema de incompatibilidad, se denomina Sistema de Incompatibilidad Tardía (**SIT**) y engloba toda incompatibilidad que se produzca en el ovario, llegando o no a producirse la fecundación (Gibbs, 2014). El SIT, dependiendo de si se produce fecundación de la célula huevo o no, puede ser SIT precigótico o poscigótico respectivamente. El SIT ha sido escasamente analizado en angiospermas y es el que se ha reportado en *A. triloba* pero sin saber si el mecanismo es pre- o poscigótico y sin apenas estudios a nivel celular, molecular o genético (Pomper et al., 2008).

De hecho, Pomper (2008) propone que *A. triloba* es probablemente autoincompatible basándose en un estudio previo de Willson y Schemske (1980). En dicho estudio se pretende estudiar el motivo por el cual las poblaciones de pawpaw silvestre presentan muy poca producción de fruto, hipotetizando que se debe a una baja deposición de polen en los estigmas. Para ello comparan la producción entre polinización manual y polinización abierta (mediante la visita de polinizadores naturales). Debido a que el pawpaw forma parches de individuos clonales, los autores se desplazan a un kilómetro de distancia para recoger polen de pawpaws y asegurarse que sean genéticamente distintos (Willson & Schemske, 1980), y es por lo que se puede deducir que los autores conocen la existencia de un SI en pawpaw aunque no lo mencionan explícitamente ni se encuentra descrito en sus referencias. Por otro lado, en 1940, East afirma que las especies cultivadas de *Annona* y *A. triloba* son autofértiles, aunque sus referencias no están claras (East, 1940). En cambio un año más tarde, Zimmerman, que dedicó parte de su investigación a la producción de híbridos de *A. triloba* con otras especies de su género, recomendaba la polinización cruzada entre distintas variedades de pawpaw para incrementar la producción de fruta (Zimmerman, 1941). En años posteriores, diversos autores como Norman (1992), Layne (1996) y Pomper (2008) afirman la presencia de un SI en pawpaw normalmente referenciando los estudios de Zimmerman (1941) y Willson (1980) (Layne, 1996; Norman et al., 1992; Pomper et al., 2008). Sin embargo y como se ha expuesto previamente en este párrafo, estos artículos no se centran en demostrar la presencia de un SI en pawpaw. Finalmente se puede concluir que, hasta donde sabemos, no existen estudios científicos previos que hayan analizado el mecanismo de SI en *A. triloba* pero sí

parece ser un hecho ampliamente conocido entre quienes lo cultivan como queda reflejado en diversos manuales y guías de manejo de este frutal como “Pawpaws in the garden” (The pawpaw Foundation, 1990).

En el caso de *Asimina parviflora*, se ha propuesto que la germinación nula de semillas procedentes de autopolinización sea causada por depresión endogámica (DE) (Norman et al. 1992). En cualquier caso, la combinación en *A. triloba* de dicogamia protogínica con un SI es un caso peculiar en angiospermas puesto que supone la presencia de dos mecanismos diferentes para dificultar la autofecundación.

Hay pocos estudios con observaciones histológicas que aborden el desarrollo de la semilla procedente de un cruce incompatible (autopolinización) o de cruce compatible (polinización cruzada, cruzamiento) en especies que presentan SIT pre- y poscigótico. En *Camellia oleifera*, que presenta SIT precigótico (Liao et al., 2014), se ha descrito un ligero retraso en el crecimiento de los tubos polínicos incompatibles respecto a los compatibles que igualmente alcanzan la base del estilo pero muy pocos llegan a alcanzar los óvulos, observándose deposición de calosa en los pocos óvulos autofecundados que finalmente abortan entre 10-25 días tras la autopolinización. En otros ejemplos de SIT precigótico la detención del tubo polínico incompatible puede tener lugar en las primeras capas de la nucela sin llegar a alcanzar el aparato del huevo como sucede en *Accacia retinoides* (Kenrick et al., 1986). En *Sphatodea campanulata* y *Jacaranda racemosa*, se observó que los tubos polínicos incompatibles llegan a fecundar al óvulo, pero el endospermo o bien no inicia su desarrollo (*S. campanulata*) o sólo llega a alcanzar un desarrollo de unas 4 células (*J. racemosa*) (Bittencourt et al., 2003; Bittencourt & Semir, 2006). En el caso de *Hymenocallis stigonocarpa*, se observó la formación del cigoto y el inicio del desarrollo del endospermo con la formación de un primer núcleo, teniendo lugar la abscisión de los frutos inmaduros 7-8 DDP y observándose un retraso en el desarrollo de las semillas procedentes de autopolinización con respecto a los de cruzamiento 5 DDP, aunque en este estudio no pudieron concluir si se trataba de SIT o DE (Gibbs et al., 1999). Por otro lado, en *Capparis retusa* se observó la formación de embriones y el inicio de un endospermo nuclear 7 DDP en semillas de autopolinización teniendo lugar la abscisión de los frutos inmaduros dos días después (Bianchi & Gibbs, 2000). En *Acca sellowiana* se produce la fecundación 18 DDP en ambos tipos de polinizaciones, de hecho, se observó la formación del cigoto 26 DDP y un endospermo nuclear, pero 30 DDP se produce la abscisión de los frutos procedentes de autopolinización (Finatto et al., 2011).

Poco se conoce sobre la base genética que controla el SIT pero se hipotetiza que en la mayoría de los casos sea de tipo gametofítico (Sage et al., 1994). En algunas especies, se han diseñado experimentos a través de cruzamientos dirigidos para establecer la segregación de los genes implicados en el SIT precigótico. En *Accacia retinoides*, por ejemplo, se sugiere que existe un control gametofítico (Bernhardt et al., 1984), mientras que estudios más amplios realizados en *Theobroma cacao* parecen indicar una combinación de control gametofítico y esporofítico, mediado por 3 loci que parecen segregarse de manera independiente (Knight & Rogers, 1955; Lanaud et al., 2017). En cambio, en *Gasteria spp.* se ha propuesto un control gametofítico por dos o más loci

(Naarborgh & Willemse, 1992). En el caso de SIT poscigótico que tiene lugar en *Asclepias exaltata*, tras un estudio de cruzamientos dirigidos, se llegó a la conclusión de que existe un único locus que controla el SIT pero los autores no pudieron discernir si es de tipo gametofítico o esporofítico (Lipow & Wyatt, 1999).

Más allá de los estudios genéticos a través de cruzamientos dirigidos, son escasos los trabajos que han abordado la expresión génica implicada en el SIT. Por ejemplo, *Xanthoceras sorbifolium* presenta SIT poscigótico y 5 DDP no se observan diferencias histológicas entre las semillas de autopolinización y de cruzamiento, pero tras un estudio transcriptómico se observó que las semillas de autopolinización expresan de manera específica 274 genes (Zhou & Zheng, 2015). Estas semillas inmaduras de autopolinización sobreexpresan genes relacionados con la transducción de señal en la célula como proteínas quinasas y fosfatasa, mientras que las semillas provenientes de cruzamiento sobreexpresan de manera específica 42 genes. En este estudio se sugiere además la presencia de un factor de transcripción expresado únicamente en semillas procedentes de autopolinización, que postulan como posible gen específico del control del SIT en *X. sorbifolium* (Zhou & Zheng, 2015). Basándose en los genes propuestos por Zhou y Zheng (2015) se han postulado al menos seis clases de genes candidatos presentes en el genoma de *T. cacao* que podrían regir su SIT: quinasas dependientes de calcio/calmodulina, serina/treonina fosfatasa, serina/treonina quinasa, “Plant self-incompatibility S1”, proteína FAR1 y glicoproteína locus-S además de un gen relacionado con la ruptura del polen (da Silva et al., 2016).

Estos estudios sobre el SIT se han realizado fundamentalmente en eudicotiledóneas, pero los trabajos en angiospermas basales o de divergencia temprana son prácticamente inexistentes y, dada su posición filogenética, es clave conocer el SIT en este grupo de angiospermas no sólo para tener mayor conocimiento sobre el SIT, sino para conocer la historia evolutiva de los sistemas de incompatibilidad en las plantas con flor. Para llenar este vacío sobre el conocimiento de los SI y particularmente del SIT, en este capítulo se evalúa el SIT presente en la especie de divergencia temprana, *A. triloba* que además presenta dicogamia protogínica. Para ello se realiza un estudio comparativo en los estados iniciales del desarrollo de las semillas procedentes de autopolinización (incompatible) y de cruzamiento (compatible) a través de un análisis histológico y transcriptómico.

Material y métodos

Material vegetal

Para este trabajo se utilizaron árboles de *Asimina triloba* [L.] Dunal localizados en el IHSM La Mayora UMA-CSIC (periodos de floración 2019-2022, abril-mayo) y en el Arnold Arboretum de la Universidad de Harvard (periodo de floración 2022, mayo).

Polinizaciones manuales

Con fines comparativos se realizaron autopolinizaciones y polinizaciones cruzadas. Durante cada periodo de floración se eligió un árbol sobre el que realizar las

polinizaciones dirigidas tanto en el IHSM La Mayora como en el Arnold Arboretum. En ambas localizaciones, se realizó al menos una visita diaria al árbol receptor de polen seleccionado para elegir las flores que serían polinizadas. Cuando entraban en antesis (etapa 60 de la escala BBCH, Cap. 1) se les colocaron bolsas blancas de red de nylon para evitar la deposición de polen por parte de visitantes florales (Fig. 18A). Las flores embolsadas fueron revisadas al menos dos veces al día para detectar el punto de máxima receptividad estigmática marcado por una copiosa secreción que cubre el conjunto de estigmas (etapa 61 de la escala BBCH, Cap. 1). Para realizar las autopolinizaciones se tomó polen de flores con anteras dehiscentes (etapa 62 de la escala BBCH, Cap. 1) del mismo árbol en el que se encontraban las flores que recibirían el polen. Para realizar los cruzamientos se tomó polen de un árbol genéticamente diferente al receptor de polen. Para proceder a la polinización dirigida se retiraba la bolsa de nylon, se corroboraba el estado femenino de la flor y se revisaba con lupa que no hubiese polen en los estigmas; posteriormente se aplicaba con un pincel el polen hasta cubrir el conjunto de estigmas. Finalmente, se volvía a cubrir la flor con la bolsa durante 48 horas, y, transcurrido este tiempo, se retiraban las bolsas. Tras la polinización cada flor fue marcada con etiquetas de papel e hilo de algodón, en las cuales se anotó la fecha de polinización y el tipo de cruzamiento realizado (Fig. 18C).



Figura 18. A. Flor de pawpaw cubierta por bolsa de red de nylon. B. Flor de pawpaw con el pedicelo introducido en tapón de un tubo Falcon 50 ml con agua. C. Rama de pawpaw con flores en distintas etapas, polinización con pincel y etiquetas.

Crecimiento de los tubos polínicos compatibles e incompatibles

Con el fin de estudiar las posibles diferencias en la germinación y crecimiento de los tubos polínicos en autopolinizaciones y cruzamientos, se recolectaron flores en su momento de máxima receptividad estigmática previamente embolsadas para evitar la llegada de polen no deseado. El pedicelo de estas flores se introdujo en el tapón agujereado de un tubo Falcon lleno de agua (Fig. 18B). Para evitar el posible efecto ambiental, estos tubos Falcon se colocaron en una cámara de cultivo de altas prestaciones (temperatura media: 16°C, humedad relativa: 80%). Una vez allí se realizaron al mismo tiempo autopolinizaciones y cruzamientos. A las 9 y 24 horas tras la polinización se diseccionaron los pistilos, se extrajeron los óvulos y se realizó la técnica de “squash” consistente en el aplastamiento del pistilo situado entre el cubreobjeto y portaobjeto. La tinción se realizó con azul de anilina 0,1% en 0,1M PO₄K (Currier, 1957; Linskens & Esser, 1956) y se visualizaron las muestras teñidas en un microscopio de epifluorescencia Leica DM2500 con filtros 515-560 y LP 590. Se contaron el número total de óvulos por pistilo, y el número de óvulos penetrados, considerándose óvulo penetrado aquel que presentara un tubo polínico en el micrópilo (Gibbs & Bianchi, 1999). La igualdad de medias se evaluó mediante un test de ANOVA y posteriormente se aplicó un test de Duncan ($P < 0.01$) con el software Rstudio. Las fotografías se realizaron con una cámara Leica acoplada al microscopio conectada a un ordenador, y con el software LAS v4.5.

Desarrollo del fruto

Para establecer el momento en el que tiene lugar la abscisión del fruto procedente de autopolinización y comparar el desarrollo del fruto entre ambos tipos de polinizaciones, se realizaron polinizaciones manuales como se describe en la sección “Polinizaciones manuales”. Posteriormente se recolectaron tres frutos inmaduros, procedentes de autopolinización y cruzamiento, de manera secuencial ($n=36$) para su pesado en balanza de precisión, y toma de medidas de longitud y grosor mediante calibre digital.

Preparaciones histológicas

Para el estudio comparativo del desarrollo de las semillas inmaduras procedentes de autopolinización, se llevaron a cabo polinizaciones manuales como se ha descrito previamente. Las flores se recolectaron de manera secuencial tras la polinización, y se fijaron en paraformaldehído 4% (muestras del IHSM La Mayora) o acroleína 1% (muestras del Arnold Arboretum de la Universidad de Harvard). Posteriormente se siguió el protocolo de inclusión en historesina (Technovit 8100 o JB-4), realización de cortes a 2 μm y tinción combinada de PAS-Azul de toluidina descritos en detalle en el Capítulo 2.

Extracción de ARN de tejido obtenido mediante láser de microdissección

Se llevaron a cabo autopolinizaciones y cruzamientos, como se describe en la sección “Polinizaciones manuales”. Tras la recolección en campo 14 DDP, las flores se colocaron

en neveras con hielo para evitar la oxidación de los tejidos. Una vez en el laboratorio, se diseccionaron los pistilos para extraer los óvulos. Estos óvulos fueron fijados en una mezcla de etanol y ácido acético en una proporción de 3:1 durante 24 horas a -20°C . Una vez transcurrido este tiempo se sometió a las muestras a una deshidratación mediante series crecientes de etanol: 70, 80, 95, 100%. Las muestras deshidratadas se sometieron a tres pasos de pre-infiltración y un último paso de infiltración de diez días en agitación y a 4°C , para finalmente proceder a su inclusión en bloques de Technovit 9100 (Kulzer & Co., Wehrheim, Alemania).

Tras dejar solidificar los bloques durante al menos 24 horas a 4°C , se realizaron cortes en ultramicrotomo y se colocaron sobre una gota de agua bidestilada en portaobjetos Glass Membrane Slide (Leica). Estos portaobjetos presentan un marco de vidrio con un rectángulo central con una doble membrana de naftalato de polietileno que permite los cortes del láser ultravioleta. Los portaobjetos con los cortes depositados sobre agua bidestilada se dejaron secar al aire resguardados del polvo, se les dio un breve lavado con acetona, se dejaron al aire hasta que se evaporó la acetona, una vez en este punto se almacenaron a -20°C un máximo de 24 horas.

Las muestras fueron procesadas con un sistema de microdissección con láser en un microscopio Leica LMD7000. Las secciones de tejido de endospermo y cigoto diseccionadas (mínimo 25 secciones) caían a tubos Eppendorf de 0'5ml en la pletina de recolección del microscopio (Fig. 19), se realizaron extracciones de ARN con "PicoPure RNA Isolation Kit" (Acturus) y se amplificaron con "MessageAmp II aRNA Amplification Kit" (Applied Biosystems).

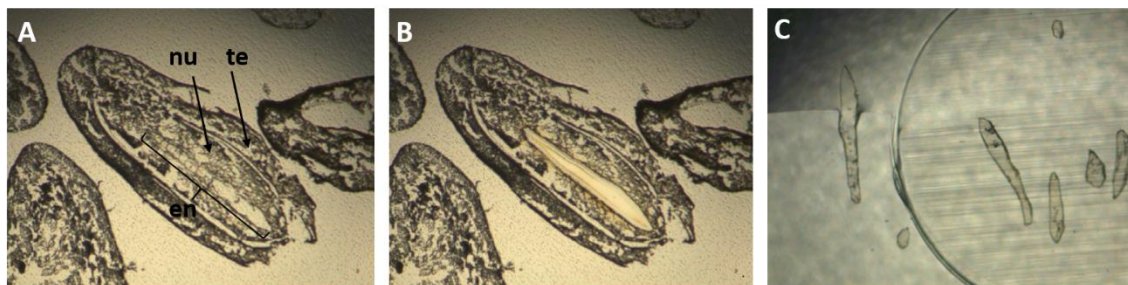


Figura 19. Proceso de microdissección de endospermo y cigoto en semilla inmadura de papaw 14 DDP. A. Sección longitudinal de semilla inmadura. B. Sección longitudinal de la misma semilla inmadura tras diseccionar con láser el endospermo. C. Secciones de tejido diseccionadas en el tubo colector. en (endospermo), un (nucela), te (tegumento externo).

Extracción de ARN a partir de material fresco

Se llevaron a cabo polinizaciones dirigidas como se describe anteriormente. Para analizar tres replicas biológicas por cada tipo de polinización y tiempo, se recolectaron tres flores autopolinizadas o de cruzamiento 4 DDP, otras tres flores 8 DDP y otras tres 15 DDP, muestreándose, por tanto, un total de 18 réplicas biológicas. Los pistilos de cada flor se diseccionaron para obtener los óvulos que fueron colocados en un tubo Eppendorf con tampón CTAB. Inmediatamente después, se procedió a realizar la extracción de ARN de

estos óvulos en fresco mediante un protocolo específico para angiospermas basales que combina el CTAB (Doyle & Doyle, 1987) y RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Standford, CA) siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante. La calidad del RNA total extraído se midió con un espectrofotómetro NanoDrop One (Thermo Scientific, EEUU).

Secuenciación y análisis

La preparación de la librería (enriquecimiento en poli-A) y la secuenciación del ARNm (ADNc) se realizaron en las instalaciones centrales de secuenciación de Novogene Company Limited (Cambridge, Reino Unido), utilizando un secuenciador Illumina NovaSeq PE150, con el objetivo de obtener 30 millones de pares de lecturas por muestra. Las lecturas sin procesar se evaluaron con FastQC v0.11.9 (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>) y MultiQC v1.11 (Ewels et al., 2016), y se preprocesaron con Trimmomatic v0.39 (Bolger et al., 2014) para eliminar secuencias de adaptadores y recortar lecturas de baja calidad, utilizando las opciones ILLUMINACLIP:TruSeq3-PE.fa:2:30:10 LEADING:3TRAILING:3 SLIDINGWINDOW:4:15 MINLEN:36. Las lecturas preprocesadas se evaluaron nuevamente con FastQC y MultiQC para confirmar que se eliminaron las secuencias de los adaptadores y para evaluar su calidad. Las lecturas preprocesadas se alinearon al genoma de *Asimina triloba* v105 (sin publicar) utilizando Hisat2 v2.2.1 (Kim et al., 2019). Samtools v1.13 se utilizó para convertir los resultados de los alineamientos en formato SAM a archivos BAM ordenados, eliminando las lecturas que no alineaban con el genoma. Se usaron FeatureCounts del paquete Subread v.2.0.3 (Liao et al., 2013) para la cuantificación de las lecturas alineadas en cada gen, y DESeq2 v1.36.0 (Love et al., 2014) para normalizar los datos de expresión génica e identificar genes expresados diferencialmente (DEG). Con las proteínas de *Arabidopsis thaliana* más similares a los DEG encontrados en las diferentes condiciones experimentales estudiadas en este trabajo, se usaron g:Profiler (Reimand et al., 2007) para encontrar procesos biológicos enriquecidos y String v11.5 (Szklarczyk et al., 2015) para visualizar e identificar asociaciones funcionales.

Tras evaluar los datos se decidió eliminar una réplica de semillas inmaduras procedentes de autopolinización 8 DDP ya que su expresión estaba sesgada en comparación con las otras dos réplicas, debido a una posible contaminación de tejidos adyacentes del pistilo. El análisis bioinformático se realizó en colaboración con el investigador Noé Fernández Pozo. El análisis de enriquecimiento funcional se realizó con g:Profiler (versión e109_eg56_p17_1d3191d) con el método de corrección de pruebas múltiples g:SCS aplicando un umbral significativo de 0'05 (Raudvere et al., 2019). El análisis de componentes principales (PCA) de 17 muestras se realizó tras el análisis de DEGs, usando software R versión 3.5.1 con el paquete ggplot2 versión 3.3.

Resultados

El tubo polínico alcanza el micrópilo del óvulo tanto en autopolinizaciones como en polinizaciones cruzadas

En estudios previos se ha observado la llegada del tubo polínico al lóculo del ovario 3 horas (Losada et al., 2014) y al micrópilo 24 horas (Capítulo 2) tras la polinización. Basándonos en estos datos, evaluamos la llegada del tubo polínico al micrópilo 9 y 24 horas tras la autopolinización y cruzamiento. En ambos tipos de polinizaciones, observamos tubos polínicos en el micrópilo (Fig. 20A, B) no observándose diferencias significativas a las 9 horas. A las 24h tras la polinización, observamos un mayor número de tubos polínicos en los micrópilos respecto a las 9h en ambos tipos de polinizaciones (Fig. 20). Con estos datos concluimos que, en las autopolinizaciones, la germinación y el posterior crecimiento del tubo polínico incompatible no se ve afectado a lo largo del estigma, estilo y ovario, confirmando la presencia de un SIT en *A. triloba*.

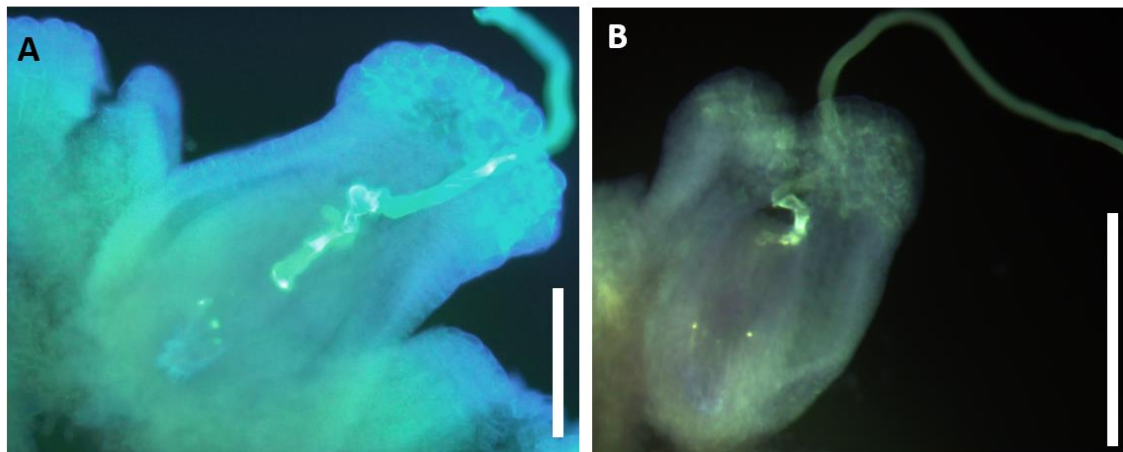
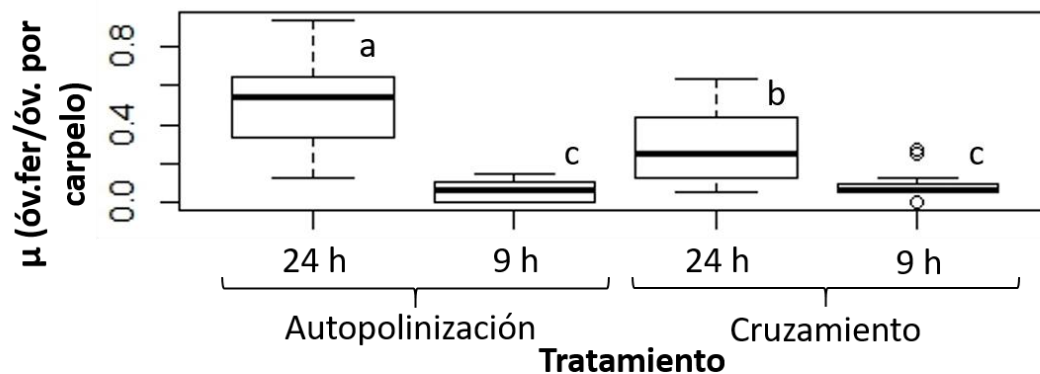


Figura 20. Gráfica con las medias de la proporción de óvulos con tubo polínico en el micropilo respecto al total de óvulos por carpelo; óvulos tras autopolinización y cruzamiento 9 y 24 horas después de la polinización manual. A. “squash” de óvulo tras autopolinización con tubo polínico en el micropilo. B. “squash” de óvulo tras cruzamiento con tubo polínico en el micropilo. En A y B la caperuza formada por el tegumento externo está retirada. Escala= 100 μ m.

Los frutos inmaduros se caen 20 días tras la autopolinización.

Para determinar cuándo se produce la reacción de incompatibilidad, se realizó una primera aproximación a través de un estudio comparativo del desarrollo del fruto, evaluando el peso, longitud y grosor de los frutos procedentes de autopolinización y cruzamiento. No se observaron diferencias significativas entre peso y tamaño de ambos tipos de polinizaciones a los 14 DDP (medias de peso p-valor 0,13, medias de grosor p-valor 0,66 y medias de longitud p-valor 0,17, $\alpha=0,05$). Sin embargo, en días sucesivos los frutos inmaduros procedentes de cruzamiento presentaron un aumento en estas variables, lo cual no se observó en los frutos procedentes de autopolinización, produciéndose la abscisión de los frutos resultantes de autopolinización 20 DDP (n=26) (Fig. 21A, B; Fig. 22). Por otra parte, la abscisión de las flores sin polinizar se produce 4 después de la dehiscencia de las anteras (n=10).

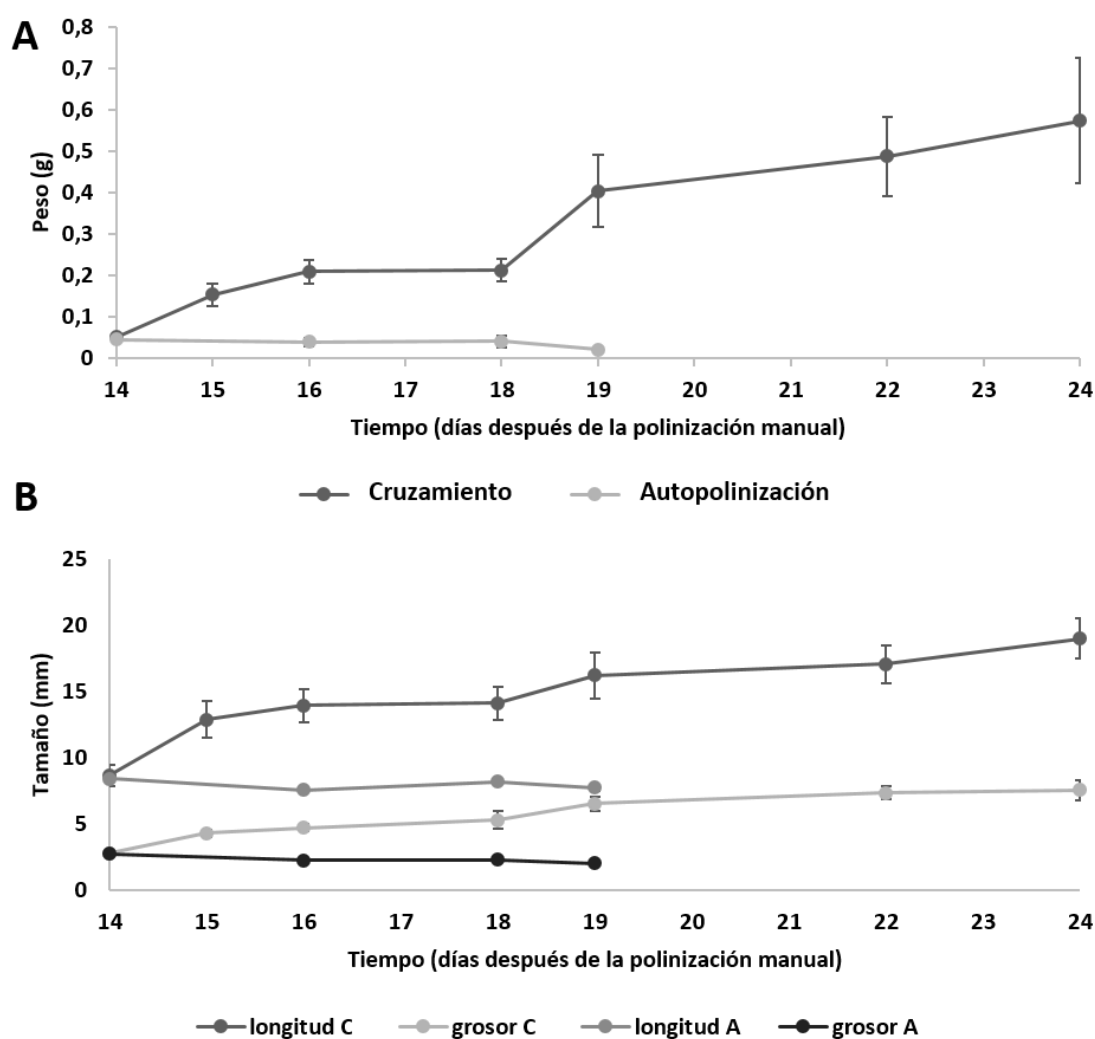
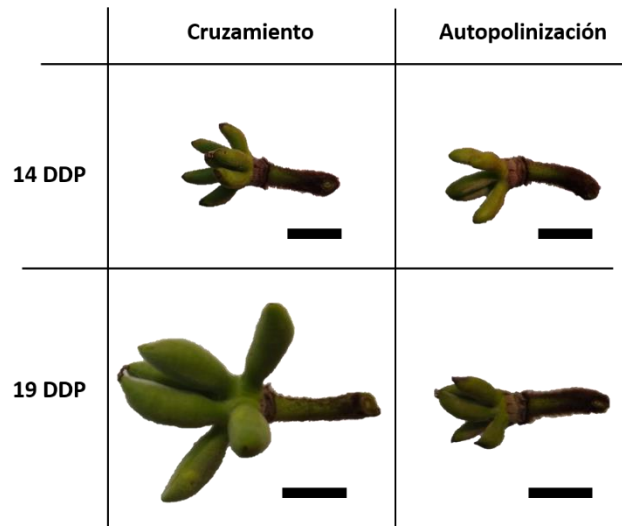


Figura 21. Gráficas comparativas de peso y tamaño de frutos tras autopolinización y cruzamiento. A. Gráfica con el peso medio de los frutos inmaduros tras autopolinización y cruzamiento. En un periodo de 10 días. B. Gráfica con la longitud y grosor medio de frutos en desarrollo tras autopolinización y cruzamiento en un periodo de 10 días. C, cruzamiento; A, autopolinización. No hay datos de frutos de autopolinización más allá de 19 DDP debido a la abscisión de los mismos.

Figura 22. Imágenes de frutos inmaduros tras autopolinización y cruzamiento 14 y 19 DDP. Escala=1cm.



A. triloba muestra un SIT poscigótico observándose diferencias a nivel celular a los 13-14 días después de la polinización entre autopolinización y cruzamiento

Tras el estudio macroscópico del desarrollo del fruto, se evaluó con mayor detalle el momento de incompatibilidad a través de un estudio histológico. En los óvulos tras la autopolinización, se observó la penetración del tubo polínico a través de la nucela en el extremo micropilar, formando un bucle citoplasmático sobre el aparato del huevo 1-2 DDP (Fig. 23A). Entre 3-4 DDP, se observó un cigoto con dos nucléolos (Fig. 23B) similar a lo observado en los cruzamientos (Capítulo 2) y que confirma la existencia de fecundación en los óvulos tras la autopolinización.

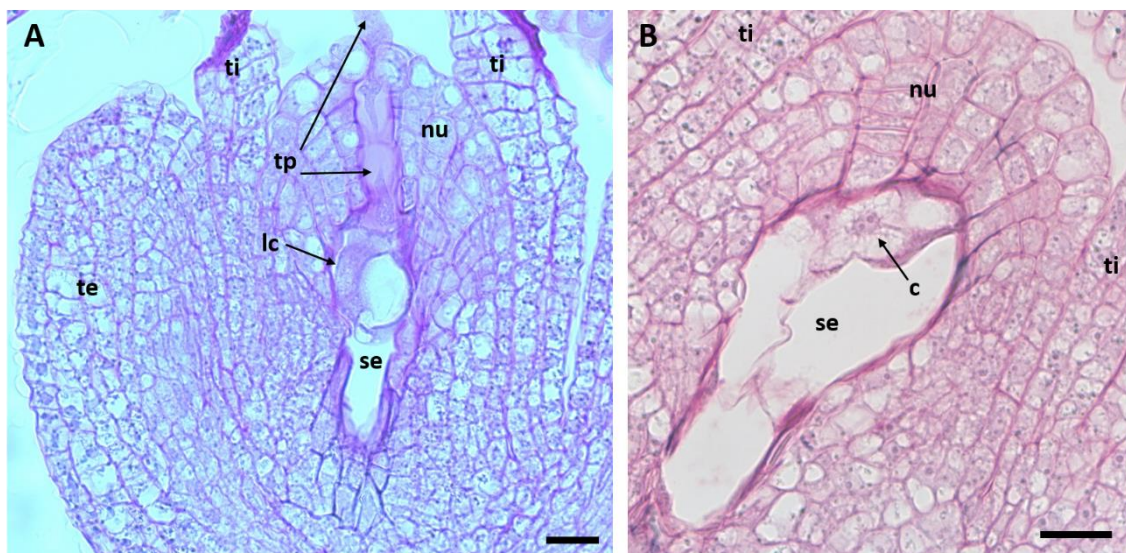


Figura 23. Secciones histológicas de semilla inmadura tras autopolinización, con tinción combinada PAS y azul de toluidina. A. Semilla inmadura 2 DDP, B. Semilla inmadura 4 DDP. c, cigoto; lc, “loop” citoplasmático; nu, nucela; se, saco embrionario, te, tegumento externo, ti, tegumento interno; tp, tubo polínico. Escala: 20 μ m.

Tras 13-14 DDP, se observó el cigoto unicelular (Fig. 24A) y, en muy raras ocasiones, una primera división del mismo que, en los cruzamientos tiene lugar 18-19 DDP. Aunque

no se observó desarrollo del cigoto en las autopolinizaciones, sí se observó un desarrollo del endospermo, el cual fue uniseriado formando una hilera central compuesta por unas 8-15 células grandes y vacuoladas 13-14 DDP. Se produjo un aumento en el tamaño de la nucela principalmente debido a una mayor división celular y al mayor tamaño que presentaban las células en contacto con el endospermo, que también presentaban una gran vacuola. En esta etapa del desarrollo en las semillas inmaduras procedentes de autopolinización fue común ver restos del tubo polínico (Fig. 24B). Por tanto, hasta los 13-14 DDP el desarrollo del endospermo y del cigoto es similar al observado en los cruzamientos (Fig. 24E, F).

A partir de 13-14 DDP fue cuando se observaron diferencias entre autopolinización y cruzamiento. En los cruzamientos, el embrión y el endospermo continuaron su desarrollo, mientras que este se detuvo en las autopolinizaciones. No se observó un proembrión ni formación del dominio micropilar del endospermo que en los cruzamientos tiene lugar 14-15 DDP. A los 20 DDP las semillas provenientes de autopolinización presentaban claros signos de degeneración tisular, presentando un estado de desarrollo similar al que presentaban 13-14 DDP (Fig. 24C, D).

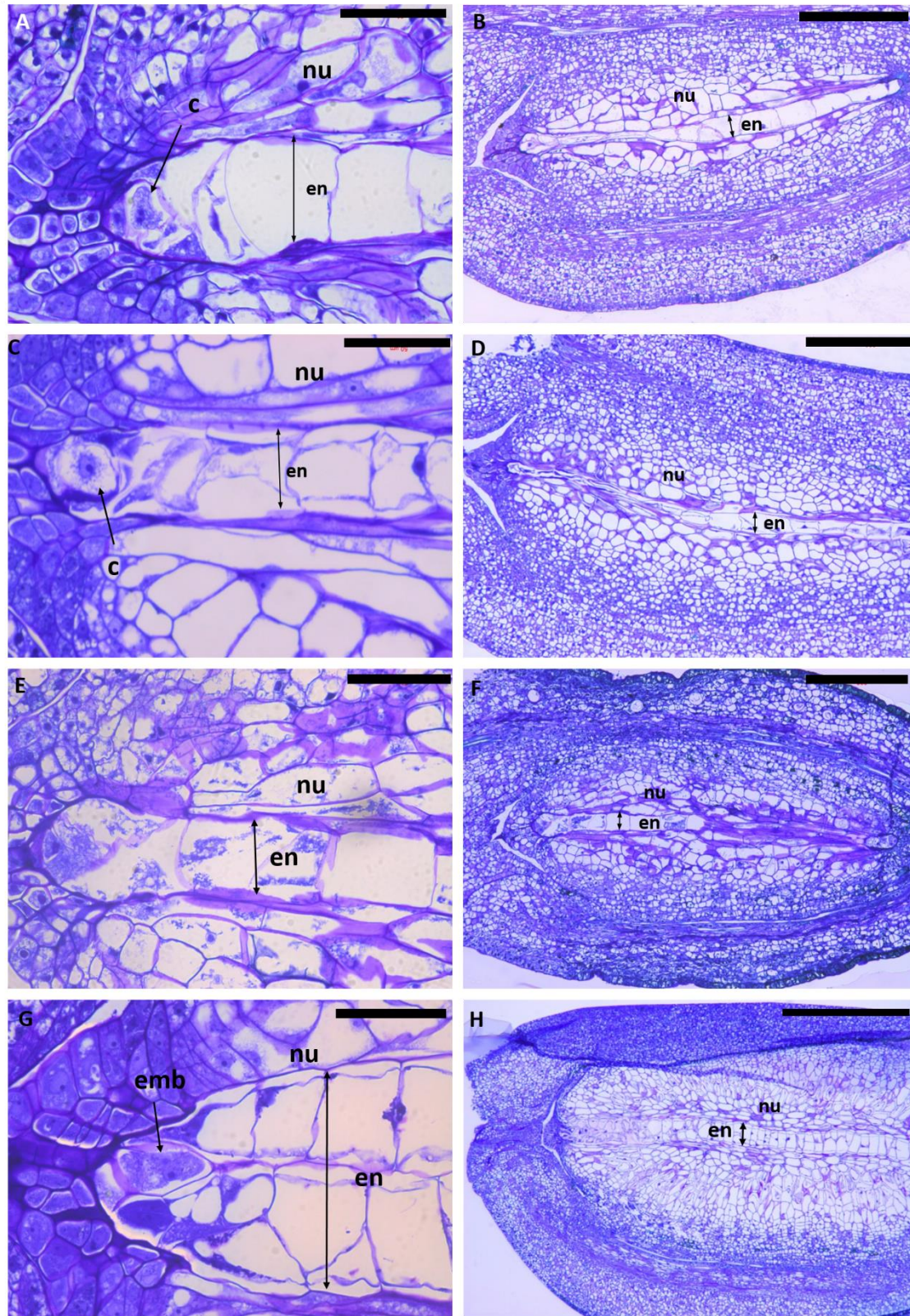
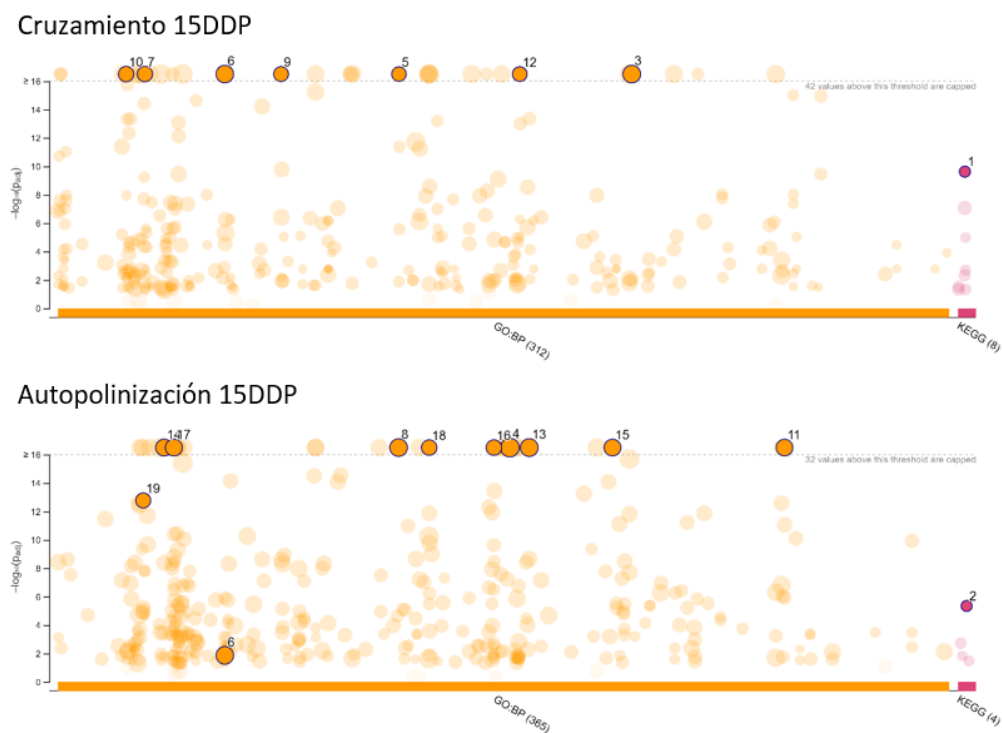


Figura 24. Secciones histológicas de semillas inmaduras procedentes de autopolinización y cruzamiento. A. Semilla inmadura tras autopolinización, detalle de la zona micropilar 14 DDP, B. Sección longitudinal de una semilla inmadura tras autopolinización 14 DDP, C. Semilla inmadura tras cruzamiento, detalle de la zona micropilar 14 DDP. D. Sección longitudinal de una semilla inmadura de cruzamiento 14 DDP. E. Semilla inmadura

procedente de autopolinización, detalle de la zona micropilar 20 DDP, F. Sección longitudinal de una semilla inmadura procedente de autopolinización 20 DDP. G. Semilla inmadura de cruzamiento, detalle de la zona micropilar 20 DDP. H. Sección longitudinal de semilla inmadura procedente de cruzamiento 20 DDP. en: endospermo, c: cigoto, nu: nucela, tp: tubo polínico. En todas las imágenes el extremo micropilar de la semilla se encuentra orientado hacia la izquierda. Escala A, C, E, G= 50 μ M. Escala B, D, F= 200 μ m, Escala H= 500 μ m.

Expresión génica en semillas inmaduras procedentes de autopolinización y cruzamiento
Tras el estudio histológico preliminar y la conclusión de que las diferencias entre ambos tipos de polinizaciones comienzan a observarse a partir de los 14-15 DDP, se hizo un estudio transcriptómico en este punto del desarrollo. Para observar la expresión de genes específicamente en el cigoto y endospermo, se extrajo ARN a partir de secciones de tejido obtenidas mediante láser de microdissección (LMD). Un análisis preliminar reveló una cantidad de lecturas insuficiente para tener resultados estadísticamente significativos. Para aumentar la cantidad de lecturas, se realizaron extracciones de ARN a partir de semillas inmaduras en fresco 4, 8 y 15 DDP. En esta ocasión los resultados mostraron grandes diferencias a nivel de expresión génica (\approx 13.000 genes) 15 DDP entre semillas inmaduras procedentes de cruzamiento y autopolinización. En estas semillas inmaduras procedentes de autopolinización se sobreexpresaban, entre otros, genes relacionados con estrés abiótico e hipoxia. Sin embargo, las semillas inmaduras de cruzamiento expresaban genes relacionados con replicación de ácidos nucleicos y proliferación celular (Fig. 25). Estos resultados muestran un gran número de genes que se expresan diferencialmente e implicados en diferentes procesos, por lo que el mecanismo a nivel molecular del SIT se inicia antes de los 14-15 DDP, aunque a nivel histológico todavía las diferencias no eran apreciables.



ID	Source	Term ID	Term Name	P _{adj} Cruzamiento 15 DDP	P _{adj} Autopolinización 15 DDP
1	KEGG	KEGG:03030	DNA replication	2.335x10 ⁻¹⁰	1
2	KEGG	KEGG:04136	Autophagy - other	1	4.523x10 ⁻⁶
3	GO:BP	GO:0071840	cellular component organization or biogenesis	2.544x10 ⁻⁷⁰	1
4	GO:BP	GO:0050896	response to stimulus	1	1.457x10 ⁻⁵⁰
5	GO:BP	GO:0042254	ribosome biogenesis	3.178x10 ⁻⁴³	1
6	GO:BP	GO:0016043	cellular component organization	3.532x10 ⁻⁴³	1.362x10 ⁻²
7	GO:BP	GO:0007049	cell cycle	7.746x10 ⁻⁴²	1
8	GO:BP	GO:0042221	response to chemical	1	7.357x10 ⁻⁴¹
9	GO:BP	GO:0022402	cell cycle process	4.693x10 ⁻³⁵	1
10	GO:BP	GO:0006259	DNA metabolic process	6.759x10 ⁻³¹	1
11	GO:BP	GO:1901700	response to oxygen-containing compound	1	5.395x10 ⁻²⁹
12	GO:BP	GO:0051301	cell division	1.701x10 ⁻²⁷	1
13	GO:BP	GO:0051716	cellular response to stimulus	1	9.963x10 ⁻²⁷
14	GO:BP	GO:0009056	catabolic process	1	8.482x10 ⁻²⁴
15	GO:BP	GO:0070887	cellular response to chemical stimulus	1	2.778x10 ⁻¹⁹
16	GO:BP	GO:0048583	regulation of response to stimulus	1	1.424x10 ⁻¹⁹
17	GO:BP	GO:0009605	response to external stimulus	1	7.917x10 ⁻¹⁸
18	GO:BP	GO:0044248	cellular catabolic process	1	2.561x10 ⁻¹⁷
19	GO:BP	GO:0006970	response to osmotic stress	1	1.666x10 ⁻¹³

Figura 25. Resultados de g:GOST como gráfico de Manhattan de consulta múltiple que ilustra los resultados del análisis de enriquecimiento de dos listas de genes 15 DDP, una de cruzamientos y otra de autopolinizaciones. El eje x muestra los términos funcionales agrupados y codificados por colores según la fuente de datos, GO:BP (Procesos biológicos, amarillo), KEGG (“Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes”, rosa). El número entre paréntesis que sigue al nombre de la fuente indica cuantos términos hay en dicha fuente enriquecidos significativamente. El eje y muestra los p-valores de enriquecimiento ajustados en una escala $-\log_{10}$. Para facilitar la visualización y comparación el valor inferior del eje y está limitado a un p-valor de 10^{-16} ya que todo p-valor menor se considera altamente significativo. Los círculos de color más pálido representan términos estadísticamente no significativos. El tamaño del círculo representa el enriquecimiento del término: a mayor tamaño mayor número de genes anotados. En la tabla bajo el gráfico se muestran los resultados de los círculos marcados en la figura con un número (ID), en esta gráfica aparecen marcados los términos según un algoritmo de dos fases que tiene en cuenta no solo los p-valores más significativos sino también la conexión entre los términos en un contexto biológico.

Los resultados obtenidos en estudios transcriptómicos en etapas más tempranas del desarrollo de la semilla, en concreto 4 DDP, no mostraron diferencias en la expresión génica entre ambos tipos de polinizaciones, deduciéndose, por tanto, que en ese momento de desarrollo aún no había tenido lugar la reacción de incompatibilidad (Fig. 26). Por ello, se decidió estudiar la transcriptómica 8 DDP como un punto del desarrollo intermedio entre 4 y 15 DDP. En este punto se empezaron a observar algunas diferencias en la expresión génica (≈ 400 genes) entre semillas inmaduras procedentes de ambos tipos de polinizaciones, aunque sin mostrar patrones de expresión tan diferenciales y ligados a procesos finales como ocurre 15 DDP (Fig. 26). Por ejemplo, de 11 genes relacionados con mutantes EMBRYO-DEFECTIVE, 9 de ellos se encontraban sobreexpresados en las semillas inmaduras procedentes de cruzamiento respecto a las de autopolinización. Además, las semillas inmaduras de cruzamiento sobreexpresaban genes relacionados con la reorganización de orgánulos mediante cambios en el citoesqueleto debido a modificaciones en los microtúbulos y filamentos de actina como MT-ring, F-acting y proteína fosfolipasa A1. A los 8 DDP, estas semillas de cruzamiento también sobreexpresaban genes relacionados con la compactación de la cromatina mediante desmetilación de histonas y regulación epigenética como metiltransferasa 1 (MET1) y, muy relacionado con este proceso, está el inicio de la transcripción del nuevo genoma del cigoto mediante toda la maquinaria relacionada con la ARN polimerasa II también sobreexpresada en las semillas tras los cruzamientos. Por otro lado, las semillas inmaduras provenientes de autopolinización 8 DDP mostraban expresión génica relacionada predominantemente con proliferación celular pero no genes propiamente relacionados con la primera división del cigoto (Fig. 27).

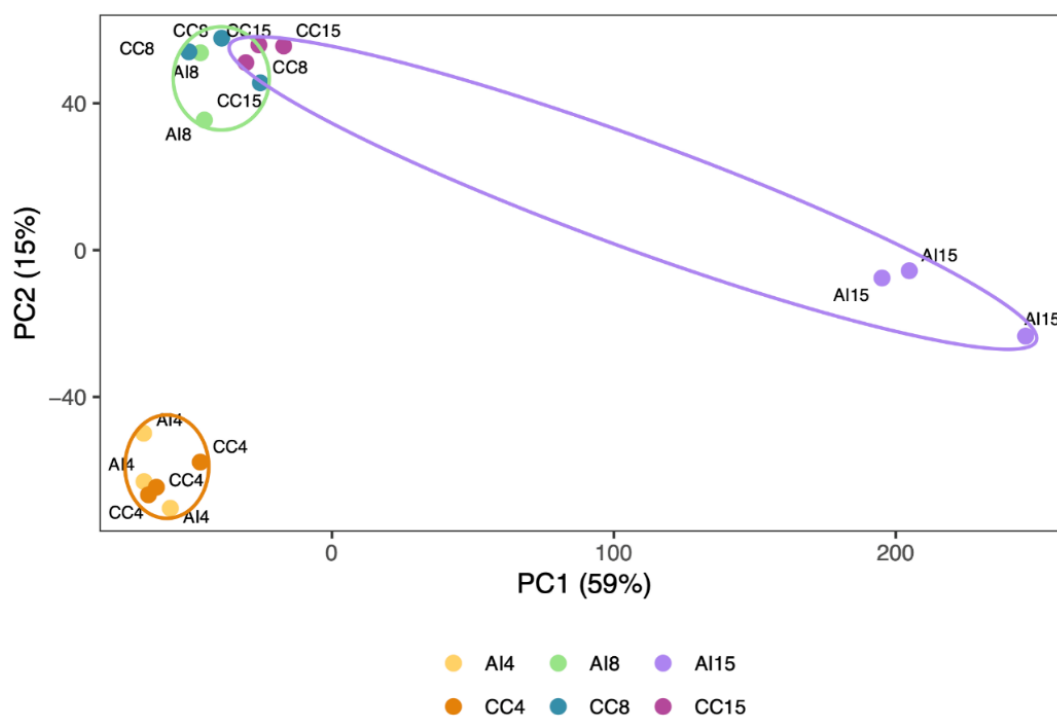
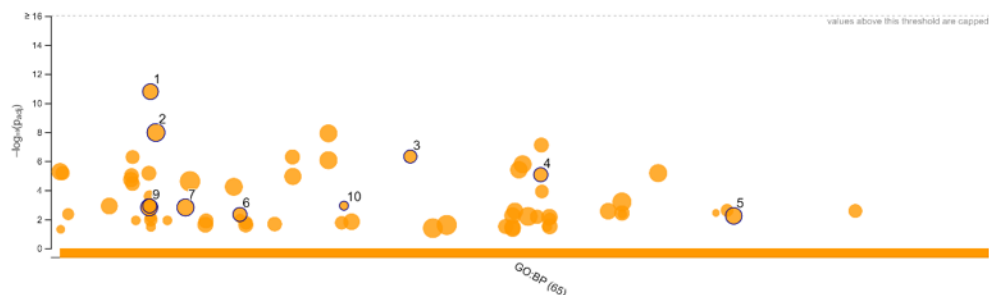


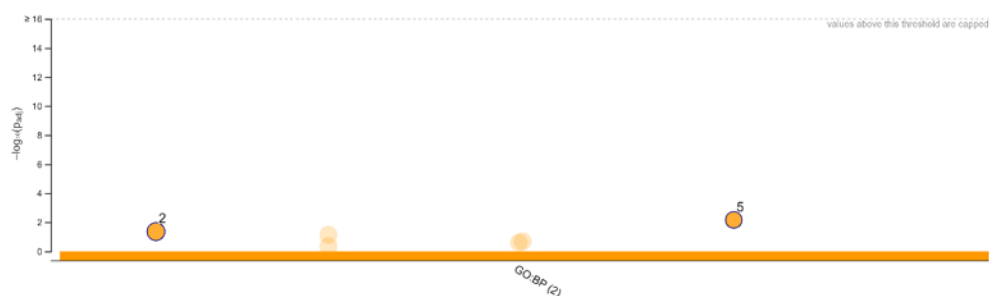
Figura 26. Análisis de componentes principales (PCA) de 17 muestras. Muestras de cruzamiento (CC) 4 DDP (naranja oscuro), 3 réplicas biológicas procedentes de autopolinización (AI) 4 DDP (naranja claro), 3 réplicas biológicas de cruzamiento (CC)

8 DDP (azul), 2 réplicas biológicas de autopolinización (AI) 8 DDP (verde), 3 réplicas biológicas de cruzamiento (CC) 15 DDP (morado), 3 réplicas biológicas de autopolinización (AI) 15 DDP (morado claro). Los círculos agrupan las muestras por el número de días después de la polinización: naranja 4 DDP, verde 8 DDP y morado 15 DDP.

Cruzamiento 8DDP



Autopolinización 8DDP



ID	Source	Term ID	Term Name	P_{adj} Cruzamiento 8 DDP	P_{adj} Autopolinización 8 DDP
1	GO:BP	GO:0007049	cell cycle	1.626×10^{-11}	1
2	GO:BP	GO:0007275	Multicelular organism development	1.060×10^{-8}	4.401×10^{-2}
3	GO:BP	GO:0040029	Epigenetic regulation of gene expression	4.758×10^{-7}	1
4	GO:BP	GO:0051276	Chromosome organization	8.612×10^{-6}	1
5	GO:BP	GO:0099402	Plant organ development	5.820×10^{-3}	6.916×10^{-3}
6	GO:BP	GO:0016570	Histone modification	4.666×10^{-3}	1
7	GO:BP	GO:0009791	Post-embryonic development	1.535×10^{-3}	1
8	GO:BP	GO:0006996	Organelle organization	1.504×10^{-3}	1
9	GO:BP	GO:0007017	Microtubule-based process	1.207×10^{-3}	1
10	GO:BP	GO:0033169	Histone H3-K9 demethylation	1.161×10^{-3}	1

Figura 27. Resultados de g:GOST como gráfico de Manhattan de consulta múltiple que ilustra los resultados del análisis de enriquecimiento de dos listas de genes, una de cruzamientos y otra de autopolinizaciones 8 DDP. El eje x muestra los términos funcionales agrupados y codificados por colores según la fuente de datos, GO:BP (Procesos biológicos, amarillo). El número entre paréntesis que sigue al nombre de la



fuente indica cuantos términos hay en dicha fuente significativamente enriquecidos. El eje y muestra los p-valores de enriquecimiento ajustados en una escala $-\log_{10}$. Para facilitar la visualización y comparación el valor inferior del eje y está limitado a un p-valor de 10^{-16} ya que todo p-valor menor se considera altamente significativo. Los círculos de color más claro representan términos insignificantes. El tamaño del círculo representa el enriquecimiento del término: a mayor tamaño mayor número de genes anotados. En la tabla bajo el gráfico se muestran los resultados de los círculos marcados en la figura con un número (ID), en esta gráfica aparecen marcados los términos según un algoritmo de dos fases que tiene en cuenta no solo los p-valores más significativos si no también la conexión de los términos en un contexto biológico.

Mediante un análisis de componentes principales de la expresión génica del conjunto de muestras se observa que el componente principal 1 explica el 59% de la variación y el componente principal 2 el 15%. También revela una agrupación de ambos tipos de polinizaciones 4 DDP. Las semillas inmaduras de cruzamiento y de autopolinización comienzan a diferenciarse 8 DDP y las muestras de cruzamiento 15 DDP están localizadas cerca de las de 8 DDP, siendo las más diferentes las muestras provenientes de autopolinización 15 DDP (Fig. 26).

Discusión

En este trabajo, se demuestra la presencia de un SIT poscigótico en la angiosperma de divergencia temprana *A. triloba*. En autopolinizaciones, a nivel macroscópico, se observa la caída de los frutos inmaduros de manera masiva 20 DDP. A nivel celular, las diferencias se encuentran fundamentalmente a partir de los 13-14 DDP. A nivel transcriptómico, las diferencias empiezan a observarse tan sólo 4-8 DDP.

A. triloba presenta dos mecanismos para evitar la autofecundación.

A. triloba presenta dicogamia protogínica, mostrando una separación temporal de la receptividad estigmática y la dehiscencia de las anteras que dificulta la autopolinización. Este mecanismo ha sido observado mayoritariamente en angiospermas de divergencia temprana y podría considerarse como la condición ancestral en angiospermas (Bertin and Newman, 1993; Routley et al., 2004, Endress 2010). La efectividad para evitar la autofecundación de esta separación temporal vendrá determinada por la duración de la receptividad estigmática, que, en la mayoría de las especies, es de 1 o 2 días (Saunders, 2012). Esta efectividad también viene determinada por las condiciones ambientales que pueden variar la duración de la receptividad estigmática, favoreciendo la autofecundación o aumentando la separación temporal del estado femenino y masculino (Lora et al., 2011). Sin embargo, *A. triloba* es un caso especial en este sistema puesto que la duración de la receptividad estigmática es particularmente larga, pudiendo ser de hasta 11 días, algo poco común en las especies que presentan dicogamia protogínica.

A. triloba presenta, además, otro mecanismo añadido para evitar la autofecundación, un sistema de incompatibilidad genética. La presencia de un mecanismo de incompatibilidad es muy poco frecuente en *Annonaceae* (Bawa et al., 1985; Bernhardt & Thien, 1987), y la presencia de dicogamia protogínica junto con un sistema de incompatibilidad, como ocurre en *A. triloba*, es un carácter extremadamente poco frecuente en plantas. Entre las

angiospermas basales se han descrito algunas especies de *Nuphar* que producen un fruto anormal tras autopolinización y se ha sugerido que puede ser debido a algún tipo de SIT (Schneider & Moore, 1977), lo que también se ha propuesto en *Illicium floridanum* y *Austrobaileya scandens* pero, en ambos casos, no fue posible dilucidar si se trata de un SIT poscigótica o DE (Koehl et al., 2004; Williams & Kennard, 2006). Los SI están ampliamente distribuidos entre el clado Magnoliid en forma de SIS y SIG, y se encuentran casos en los cuatro órdenes del clado, Canellales, Piperales, Laurales y Magnoliales (Allen & Hiscock, 2008). Sin embargo, entre estas angiospermas de divergencia temprana solo se ha sugerido un SIT poscigótico en *Pseudowintera axillaris* (Winteraceae), descartándose la DE al observarse un aborto uniforme de los embriones tras la polinización (Sage & Sampson, 2003).

La eficiencia de la dicogamia protogínica para evitar la autofecundación ha sido poco evaluada en *Annonaceae*. Aunque parece ser efectiva, como se observa en *A. cherimola*, también se ha observado un cierto solapamiento con un pequeño cuajado proveniente de autofecundación (Lora et al., 2011), que podría ocurrir a través de insectos polinizadores entre flores del mismo genotipo en lugar de dentro de la propia flor. La eficiencia de la separación temporal del estado femenino y masculino no ha sido evaluada en *A. triloba*, pero dada la larga duración de la receptividad estigmática, esta efectividad podría verse comprometida y es posible que la baja eficiencia promoviera un segundo mecanismo para evitar el autocruzamiento, en este caso un SIT.

Sistema de incompatibilidad tardía en A. triloba, un sistema eficaz para evitar la autofecundación

Se sabe muy poco del SIT en angiospermas que ha sido fundamentalmente estudiado a nivel macroscópico mediante estudios de cuajado de fruto y producción de semilla tras la autopolinización (Bertin et al., 1989; Burbidge & James, 1991; Seavey & Carter, 1994) o, con más detalle, mediante la visualización de tubos polínicos penetrando el micropilo (Pound et al., 2002). Normalmente, como ocurre en *Hymenaea stigonocarpa* (Gibbs et al., 1999), solo con estos métodos no es posible discriminar entre SIT y DE.

El SIT englobaría a todas las especies cuya incompatibilidad comienza tras la llegada del tubo polínico al ovario, a diferencia del SIS o SIG cuya incompatibilidad suele tener lugar en el estigma o el estilo, respectivamente (Gibbs, 2014). En *A. triloba*, se observó que los tubos polínicos incompatibles germinaron en los estigmas, recorrieron el estilo y penetraron los óvulos de forma similar a lo que ocurre con los tubos polínicos compatibles, mostrando claramente un SIT. En algunos casos, un SIG estilar tardío es el que provoca una SIT mediante la no estimulación correcta de los tegumentos (Sears, 1937) como también se ha sugerido en *T. cacao*, especie que parece combinar SIG y se manifiesta como SIT precigótico (Ford & Wilkinson, 2012).

El SIT normalmente se manifiesta con una caída masiva de los pistilos o frutos inmaduros en un corto periodo de tiempo tras la autopolinización como por ejemplo entre 3-8 DDP en *Chorisia chodatii*, *C. speciosa*, *Tabebuia caraiba*, *T. ochracea* (Gibbs & Bianchi,

1993), *Dolichandra cynanchoides* y *Tabebuia nodosa* (Gibbs & Bianchi, 1999), *Spathodea campanulata* (Bittencourt et al., 2003) y *Jacaranda racemosa* (Bittencourt & Semir, 2006), y siendo poco común la abscisión masiva de frutos en días posteriores como ocurre 30 DDP en *Acca sellowiana* (Finatto et al., 2011). En el caso de *A. triloba*, inicialmente el crecimiento y el desarrollo de los frutos provenientes de autopolinización y cruzamiento es muy similar hasta los 14 DDP produciéndose una caída masiva de los frutos inmaduros de autopolinización 20 DDP.

El sistema de incompatibilidad tardía en A. triloba empieza entre los 4 y 8 DDP

A nivel genético/molecular, son pocos los estudios que han analizado los mecanismos que rigen el SIT y ninguno en angiospermas basales o de divergencia temprana. En el caso de *Camellia oleifera*, que presenta SIT precigótico, se hizo un estudio transcriptómico comparativo entre pistilos autopolinizados y de cruzamiento. En este estudio, mediante un análisis bioinformático que determinaba los mecanismos funcionales más representativos, observaron que el SIT estaba relacionado con genes que controlan la muerte celular programada, como rutas de señalización mediada por quinasas MAP (MAPK), transducción de señal mediada por hormonas, transportadores dependientes de ATP (ABC, del inglés ATP-binding cassette) y proteólisis mediada por ubiquitina. Estos resultados proporcionaron una base genética sólida para sugerir que el SIT precigótico de *C. oleifera* esta mediado por muerte celular programada (Zhou et al., 2020). Por otro lado, en el genoma de *T. cacao* están presentes 6 clases de genes candidatos asociados al SIT, como calcio/calmodulina proteína quinasa, serina-treonina proteína fosfatasa, serina-treonina proteína quinasa, “plant selfincompatibility S1”, proteína FAR1 y glicoproteína locus-S, pero no han sido confirmados mediante un estudio de la expresión génica que tiene lugar en los óvulos autofecundados (da Silva et al., 2016). Por tanto, hasta la fecha, solo existe un estudio transcriptómico sobre SIT poscigótico, en *X. sorbifolium*. En este estudio, no observan diferencias histológicas 5 DDP entre semillas procedentes de autopolinización y cruzamiento. Es el único estado de desarrollo que someten a estudio de expresión génica, observando una diferencia en el número de genes expresados entre ambos tipos de óvulo. En los óvulos autofecundados se sobreexpresan genes que codifican componentes de transducción de señal como quinasas y fosfatasas, además de un factor de transcripción (TF) que proponen como un candidato específico del sistema de incompatibilidad de *X. sorbifolium* (Zhou et al., 2020).

En pawpaw no se observaron diferencias significativas a nivel de expresión génica entre semillas inmaduras procedentes de autopolinización y cruzamiento 4 DDP, pero si a los 8 DDP. En los cruzamientos, a los 8 DDP se observó la expresión de genes relacionados con proliferación celular y numerosos genes específicos del embrión tanto de expresión génica del cigoto como de la reorganización celular necesaria para una primera división del mismo. Sin embargo, las semillas inmaduras procedentes de autopolinización 8 DDP expresaron solo genes de proliferación celular pero no relacionados estrictamente con el cigoto. Estos resultados tienen sentido si se tiene en cuenta que entre los 8 y 14 DDP sí tuvo lugar un crecimiento del resto de la semilla procedente de autopolinización. Por

tanto, hipotetizamos que la reacción de autoincompatibilidad puede desencadenar un bloqueo en la primera división del cigoto. Adicionalmente, cabe destacar que no se observó la formación de un dominio micropilar en la gran mayoría de las semillas tras la autopolinización. Se ha propuesto que esta diferenciación del endospermo en dos dominios tenga lugar debido a estímulos, dentro de la semilla inmadura, provenientes de la nucela y el embrión (Floyd & Friedman, 2000), y puede ocurrir que un cigoto anormal no inicie este proceso de diferenciación correctamente. Es muy interesante hacer hincapié en el hecho de que histológicamente las semillas inmaduras de autopolinización y de cruzamiento son indistinguibles 14 DDP, mientras que a nivel transcriptómico las de autopolinización ya expresan genes que indican su inminente abscisión, como también se observó en *X. sorbifolium*, especie en la cual no se observaron diferencias histológicas entre óvulos de cruzamiento y autopolinización 5 DDP (Zhou & Zheng, 2015).

Finalmente, los resultados de este trabajo sugieren que *A. triloba* presenta un tipo de SIT poscigótico y no DE ya que cumple con la serie de criterios propuestos en estudios previos (Lipow & Wyatt, 1999; Waser & Price, 1991). A diferencia de las especies que muestran DE, en pawpaw se ha visto que las semillas inmaduras de autopolinización detienen su desarrollo en la misma etapa de manera uniforme con un cigoto sin dividir y endospermo uniseriado, además de producirse su abscisión de manera general 20 DDP. Adicionalmente, todos los individuos estudiados tanto en el IHSM- La Mayora como en el Arnold Arboretum son autoestériles y las semillas de autopolinización abortan de manera uniforme.

En este trabajo se analiza por primera vez a nivel celular y genético un SIT en *Annonaceae* y en angiospermas de divergencia temprana. Este proceso ha sido escasamente evaluado en angiospermas por lo que los datos obtenidos en *A. triloba* pueden ser muy valiosos para discernir de forma más específica los genes implicados en los SIT, que podría considerarse como uno de los primeros sistemas de incompatibilidad que aparecieron en las plantas con flor y, por tanto, entender la evolución de los sistemas de incompatibilidad genética en angiospermas.





DISCUSIÓN GENERAL



Discusión general

Los resultados obtenidos en este trabajo han permitido caracterizar la fenología y biología reproductiva del pawpaw (*Asimina triloba* [L.] Dunal), conocimientos esenciales para la expansión de este cultivo infrautilizado, pero con un gran nicho de expansión en climas templados y fríos. Además de su potencial como un nuevo cultivo en Europa, tiene el interés añadido de pertenecer a la familia Annonaceae dentro del clado Magnoliid, considerado como un grupo de divergencia temprana entre las plantas con flor. El género *Asimina* tiene también el interés de ser el único con especies adaptadas a clima templado en Annonaceae, familia de distribución fundamentalmente tropical y subtropical.

Fenología del pawpaw y su adaptación a climas templados

El pawpaw es el frutal nativo de Norteamérica con un mayor tamaño de fruto, pero es poco conocido incluso en su lugar de origen, Estados Unidos. La extensión de su cultivo es muy limitada y su comercialización se produce sólo a nivel local en algunos estados. En Europa es prácticamente desconocido, siendo más conocido como árbol ornamental. Sin embargo, tanto la fenología y adaptación del pawpaw a climas templados, como el sabor y aroma tropical de sus frutos convierten al pawpaw en un candidato excepcional para su cultivo en prácticamente todos los países europeos, proveyendo al mercado de frutos de sabor exótico, pero de cultivo local. Para ello, la descripción de los caracteres fenológicos mediante la escala BBCH (Capítulo 1) permite estandarizar los estados de desarrollo de la planta y proveer de una herramienta esencial para el manejo de este cultivo en diferentes ambientes.

Los estados fenológicos descritos en pawpaw, y más concretamente su duración, se asemejan a los descritos en otras especies frutales adaptadas a climas templados como el cerezo y el kiwi (Fadón et al., 2015; Salinero et al., 2009), aunque el tiempo requerido para el crecimiento del fruto (4-5 meses) es mucho más prolongado en pawpaw, posiblemente debido a su mayor tamaño (etapa principal de desarrollo 7, Capítulo 1). Encontramos, por ejemplo, el estado de dormancia de yemas foliares y florales (etapa 00 y 50 respectivamente, Capítulo 1) en el cual se produce una ralentización de la actividad metabólica y se detiene su crecimiento desde octubre a mitad de mayo en la yema vegetativa y de octubre a mitad de abril en el caso de la yema floral. La senescencia y abscisión de las hojas se inicia a mediados de agosto y concluye a mitad de diciembre (etapa principal de desarrollo 9, Capítulo 1), haciendo que el pawpaw sea una especie de hoja caduca a diferencia de otras especies de Annonaceae que presentan una distribución subtropical como *Annona squamosa* y *A. cherimola* que son descritas como semicaducifolias. El conocimiento de estos estados fenológicos es esencial para la adaptación del cultivo a distintas zonas edafoclimáticas. En *A. squamosa* y *A. cherimola* tras la formación de la yema dormante esta no brota hasta la caída progresiva de las hojas en primavera, y la floración se produce cuando ya hay un gran desarrollo vegetativo (Liu et al., 2014); en cambio, el pawpaw es una especie histeranta ya que primero ocurre la floración y, progresivamente, se desarrollan las hojas, de forma muy similar a lo que ocurre en otros frutales de clima templado como el cerezo (Fadón et al., 2015). Bajo

nuestras condiciones climáticas, la floración del pawpaw dura cuatro semanas con un pico de floración en las dos centrales (estado principal de desarrollo 6, Capítulo 1), lo que supone un periodo algo más reducido que el de *A. cherimola* (1-2 meses). En el caso de *A. cherimola* la época de floración puede alargarse mediante un manejo de poda.

Debido a la peculiar adaptación del pawpaw a climas fríos en una familia cuyas especies están en su inmensa mayoría adaptadas a climas subtropicales y tropicales, el estudio de los caracteres fenológicos y genéticos que le han permitido esta adaptación nos puede proporcionar además información sobre la adaptación de especies a diferentes climas, lo que tiene especial interés en un contexto de cambio climático. Este interés se ve reforzado por la situación filogenética de las anonáceas en la historia evolutiva de las angiospermas.

Biología reproductiva de Asimina triloba

Dentro de los estados fenológicos, uno de los periodos más críticos y limitantes para el éxito de cualquier cultivo, en el que el interés es el fruto o la semilla, es la fase reproductiva. El conocimiento en profundidad de la biología reproductiva y las posibles limitaciones en la producción de fruto del pawpaw es esencial para su implantación y expansión en nuevas regiones. Por otra parte, esta información completa, en parte, el gran vacío de información existente en este campo en angiospermas de linajes de divergencia temprana.

Entre las limitaciones para la producción que presenta la fase reproductiva del pawpaw, se encuentra su ciclo floral con una dicogamia protogínica que implica una separación temporal de la receptividad estigmática y la dehiscencia de las anteras que impide la autopolinización y, por tanto, dirigida a evitar la depresión endogámica. La dicogamia protogínica también es común en el resto de anonáceas (Gottsberger, 2015) pero, en el caso del pawpaw, la receptividad estigmática es más prolongada (unos 11 días) que la que presentan normalmente las especies con dicogamia protogínica (1-2 días) lo que disminuye la efectividad para evitar la autopolinización (Losada et al., 2017b).

El pawpaw conserva un gineceo que presenta características propias de la familia Annonaceae (Leins & Erbar, 1996). Los pistilos tienen un estigma húmedo y un corto estilo hueco en el cual compiten los tubos polínicos para alcanzar a los óvulos localizados en el lóculo alargado del ovario. El óvulo de pawpaw presenta a su vez, características plesiomórficas propias de linajes tempranos de angiospermas y comunes a las anonáceas como micropilo formado únicamente por el tegumento interno, pericalaza, disposición anátropa y crasinucelado (Capítulo 2).

Tras la fecundación, el desarrollo inicial del endospermo es celular, en lo cual hay consenso respecto a su carácter ancestral entre angiospermas (Floyd & Friedman, 2000); una primera división da lugar a una célula micropilar más ancha y una calazal alargada. La diferenciación estructural y posiblemente fisiológica en los dos dominios del endospermo (micropilar y calazal) ha sido descrita en muy pocas ocasiones (Floyd & Friedman, 2000) y en pawpaw se forma a partir de los días 14-15 DDP, se continúa

observando a los 41 DDP pero no a los 68 DDP cuando el embrión presenta forma de corazón (Capítulo 2).

En este trabajo se ha descrito por primera vez y en detalle la formación y desarrollo de las ruminaciones del endospermo en pawpaw, estructuras ampliamente distribuidas entre las angiospermas y particularmente diversas en las anonáceas (Doyle & Le Thomas, 1996). Las ruminaciones de *A. triloba* se empiezan a formar 20-22 DDP mediante el plegamiento del tegumento interno (dos capas de células) junto con la endo- y mesotesta del tegumento externo. Estos pliegues siguen desarrollándose e internándose en la nucela hasta los 41 DDP cuando el endospermo empieza a expandirse, para finalmente desplazar a la nucela en las etapas finales. En la semilla de pawpaw, en el momento de la dispersión, se observa un endospermo ruminado lameliforme como tejido de almacenamiento de nutrientes, en el que las ruminaciones están formadas por restos de tegumento interno, endotesta y fibras de la mesotesta (Capítulo 2). Dado el pequeño tamaño del embrión respecto al endospermo, se ha sugerido que las ruminaciones tienen la función de facilitar la imbibición de la semilla promoviendo la movilización de nutrientes (Svoma, 1998). En esta semilla madura, el embrión está relativamente poco desarrollado, necesitando unos 75-80 días de estratificación fría para germinar. Durante ese proceso, los cotiledones consumen el endospermo obteniendo los nutrientes y energía necesaria para la emergencia de la radícula; estos cotiledones nunca emergen de la testa tratándose por tanto de germinación epigea criptocotilar (Capítulo 2).

El desarrollo del embrión sólo tiene lugar en polinización cruzada, lo que difiere de las demás especies de Annonaceae que mayoritariamente son descritas como autofértiles salvo algunas excepciones (Gottsberger, 2015) como *Polyalthia glauca* y *P. hypoleuca*, *Popowia pisocarpa* y *Uvariaa elmeri* que, al igual que el pawpaw, presentan dicogamia protogámica y son autoincompatibles (Momose et al., 1998; Nagamitsu & Inoue, 1997; Rogstad, 1994). Es común en plantas la combinación de mecanismos para evitar la autofecundación si solo uno de ellos es insuficiente (Lloyd & Webb, 1986). Este puede ser el caso del pawpaw ya que, aunque presenta dicogamia protogámica, esta es asincrónica y en el mismo árbol coinciden flores en estado femenino junto a flores en estado masculino. Este hecho, unido a la prolongada receptividad estigmática necesaria en climas templados por el menor número de visitas de polinizadores, hace que la efectividad de la separación temporal no sea muy eficiente y, por tanto, sea necesaria la presencia de un segundo sistema de incompatibilidad para evitar la autofecundación.

Sistema de incompatibilidad de acción tardía (SIT) poscigótica en pawpaw, un abordaje macroscópico, histológico y transcriptómico

El sistema de incompatibilidad en pawpaw fue tenido en cuenta para la mejora del cultivo y su manejo en campo por Zimmerman (1938, 1940), Kral (1960), Davis (1974), Willson y Schemske (1980) (Davis, 1974; Peterson, 1991; Zimmerman, 1938, 1940). En este trabajo sobre *Asimina triloba*, se describe por primera vez en detalle la incompatibilidad de acción tardía poscigótica desde una perspectiva comparativa macroscópica, histológica y transcriptómica en una angiosperma de divergencia temprana. La importancia de este

estudio no reside únicamente en su potencial de aplicación agronómica sino también a nivel evolutivo gracias a la posición clave de esta especie en la filogenia de las plantas con flor (Capítulo 3).

En primera instancia los sistemas de autoesterilidad se manifiestan en frutos de aspecto amorfo, bajo cuajado o baja producción de semilla, por lo que los estudios iniciales de estos procesos suelen ser a nivel macroscópico (Gibbs et al., 2004). En pawpaw hemos determinado que la abscisión de las flores sin polinizar se produce 4 días después de la dehiscencia de las anteras. Se observó, además, que los frutos inmaduros provenientes de autopolinización dejan de crecer 14 DDP, produciéndose generalmente su abscisión 20 DDP (Capítulo 3).

Tras confirmar la existencia de un sistema de incompatibilidad mediante una aproximación macroscópica, fue necesario realizar un estudio histológico para evaluar el momento y lugar en el que se produce el rechazo del tubo polínico incompatible. En pawpaw observamos una germinación, crecimiento de los tubos polínicos y penetración de los óvulos, similar en ambos tipos de polinización, por lo que se descartó la posibilidad de un SIS estigmático o un SIG estigmático y estilar. Por este motivo, se llevó a cabo un estudio histológico comparativo del desarrollo entre semillas inmaduras tras polinización cruzada (cruces compatibles) y autopolinización (cruces incompatibles) revelándose que, en los óvulos tras la autopolinización se produce la fecundación del saco embrionario, observándose la formación de un cigoto y un endospermo uniseriado a la misma velocidad que el óvulo tras cruzamiento. Sin embargo, el desarrollo de la semilla inmadura tras autopolinización se detiene 14 DDP (Capítulo 3).

Tras este estudio histológico comparativo del desarrollo entre ambos tipos de polinización se concluyó que el sistema de incompatibilidad de *A. triloba* es un SIG ovárico, es decir, un sistema de incompatibilidad de acción tardía poscigótica (SIT poscigótica).

Los estudios sobre los mecanismos genéticos que controlan el SIT en especies leñosas son muy escasos debido a que suelen ser impracticables, ya que para estudiar como segregan los genes implicados en el mecanismo de incompatibilidad son necesarios cruzamientos y estudios de progenie, debido a que todavía no disponemos de herramientas moleculares que nos faciliten este estudio (Gibbs, 2014). Los ejemplos son muy escasos, se puede citar *C. oleifera*, que presenta un SIT precigótica en el que los tubos polínicos incompatibles se detienen en su mayoría antes del micrópilo; para esta especie se ha propuesto que el mecanismo de incompatibilidad desencadena muerte celular programada (Liao et al., 2014). En el caso de *T. cacao*, especie mucho más estudiada debido a su gran interés comercial, los tubos polínicos propios alcanzan los óvulos pero no se produce singamia entre los gametos siendo estrictamente un SIT precigótica (Ford & Wilkinson, 2012). Adicionalmente, se han observado en su genoma familias de genes que posiblemente están relacionadas con su mecanismo de SI pero no se ha realizado hasta la fecha un estudio transcriptómico (Lanaud et al., 2017). El caso de *X. sorbifolium* sí parece tratarse de un auténtico SIT poscigótica. En esta especie se ha realizado un estudio comparativo de la expresión génica entre óvulos procedentes de cruzamiento y autopolinización, pero solo en una única etapa del desarrollo 5 DDP, etapa

en la cual no observaron diferencias histológicas entre ambos tipos de óvulo (Zhou & Zheng, 2015) pero sí que observaron un gran número de genes que se expresan únicamente en el óvulo autofecundado, entre ellos genes que codifican numerosas proteínas implicadas en transducción de señal y un factor de transcripción (TF) que proponen como un posible gen candidato del SI en esta especie. Basándonos en esta poca información previa decidimos inicialmente realizar en pawpaw el estudio transcriptómico comparativo 14 DDP ya que no observábamos diferencias histológicas antes de ese periodo, pero el análisis de expresión génica reveló que en este punto ya se había producido la reacción de incompatibilidad y realmente se observaban las consecuencias, posiblemente de forma similar a lo ocurrido en el estudio realizado en *X. sorbifolium* por Zhou y Zheng (2015). Por este motivo, se decidió estudiar una etapa mucho más temprana en el desarrollo de las semillas, 4 DDP; en esta etapa no se observaron diferencias en la expresión génica. Finalmente se tomó la decisión de estudiar un punto intermedio, 8 DDP, en el que se comenzaron a observar diferencias en la expresión génica entre autopolinización y cruzamiento. Se pudo concluir que, la reacción del SIT poscigótica de pawpaw tiene lugar entre los 4 y 8 DDP y además afecta a la primera división del cigoto mientras que el resto de la semilla inmadura intenta continuar con su desarrollo. Este fallo en la primera división del cigoto además afecta a la diferenciación del endospermo en los dominios micropilar y calazal (Capítulos 2 y 3).

La evolución de los sistemas de incompatibilidad en angiospermas

Existen evidencias contradictorias sobre si la condición ancestral de las primeras angiospermas es la autoincompatibilidad (AI) o la autocompatibilidad (AC). Por un lado, existe una corriente de pensamiento que postula la AI como condición ancestral y que la AC evolucionó en etapas posteriores en la diversificación de las angiospermas (Stebbins, 1957). Por otro lado, se ha sugerido que la condición ancestral es la AC y que la AI apareció de manera progresiva e independiente en numerosas ocasiones durante la evolución. Esta última hipótesis se apoya en el hecho de la prevalencia de los sistemas de autoincompatibilidad en las plantas herbáceas lo que indicaría un origen más reciente de la AI (Bateman, 1954; East, 1940). Los datos moleculares más actuales respaldan también esta segunda opción, observándose un origen polifilético de los SI (Allen & Hiscock, 2008).

Actualmente, sabemos que existen casos de autoesterilidad y SI en cuatro de los cinco linajes de angiospermas basales, Austrobaileyaceae, Illiaceae, Trimeniaceae, y Chlorantaceae (Bernhardt et al., 2003; Koehl et al., 2004; Williams & Kennard, 2006). También existen indicios en al menos un miembro de Nymphaeaceae (Bernhardt & Thien, 1987). De hecho, se ha visto que existe un auténtico SI precigótico mediante la inhibición estigmática del polen propio en Trimeniaceae, Chloranthaceae y Sauraceae. El sistema más extendido entre angiospermas basales parece ser el SI de acción tardía por lo que lo más probable es que sea la condición ancestral. Esta diversidad de SI entre angiospermas basales sugiere una rápida evolución en paralelo de distintos sistemas, pero probablemente el ancestral fue un SIT (Sage & Sampson, 2003).

La autoincompatibilidad ovárica o SIT está presente en casi todos los clados de angiospermas, desde los taxones más basales a los más derivados. La detención del crecimiento del tubo polínico incompatible en el ovario y poca o ninguna formación de semilla tras la autopolinización se ha descrito en especies leñosas de un gran número de familias diferentes como, Ericaceae (*Rhododendron ssp.*); Sterculiaceae (*Theobroma cacao*, *Sterculia chicha*, *Cola nítida*); Fabaceae (*Acacia retinoides*); Myrtaceae (*Eucalyptus ssp.*); Winteraceae (*Pseudowintera colorata*); Bignoniaceae (*Tabebuia sp.*) y Malvaceae (*Chorisia sp.*). También se ha descrito un SIT en algunos taxones de herbáceas como, *Narcissus sp.* y *Hemerocallis sp.* (Amarillidaceae) y *Lilium sp.* (Liliaceae) (Allen & Hiscock, 2008).

En comparación con lo que se sabe sobre los SIS y SIG, el conocimiento sobre la fisiología y la genética que controlan los SIT es muy escaso. Comúnmente se sugiere que los sistemas de incompatibilidad tardía se encuentran bajo control gametofítico mientras que estudios realizados en algunas especies hipotetizan que la incompatibilidad tardía que observan está bajo control esporofítico. De hecho, hay estudios que apoyan que en *Theobroma cacao* y *Passiflora edulis* hay un control combinado gametofítico/esporofítico (Hasenstein & Zavada, 2001; Suassuna et al., 2003). A menudo la autoincompatibilidad ovárica o tardía se asocia a un hábito de crecimiento perenne leñoso, un gineceo de estilos huecos e incluso la ausencia de un estilo auténtico lo que provoca que el contacto entre el tejido reproductivo masculino y femenino no sea estrecho (Kenrick et al., 1986); estas estructuras son comunes en angiospermas basales, de divergencia temprana y de distribución tropical/subtropical como la familia Annonaceae a la que pertenece *A. triloba*. Además de la naturaleza críptica de los sistemas de incompatibilidad tardía, su estudio se dificulta al estar mayoritariamente presentes en árboles haciendo que el análisis genético sea más difícil que en especies herbáceas (Seavey & Bawa, 1986).

La distribución filogenética de los SIT indica que muy probablemente es evolutivamente anterior a los SIS. De hecho se ha sugerido que este sistema es incluso anterior a la evolución de un carpelo cerrado (Endress & Igersheim, 2000; Kenrick et al., 1986; Sage & Williams, 1994). Este sistema ancestral pudo haber evolucionado o ser reemplazado por mecanismos más avanzados estigmáticos y estilares cambiando el momento y lugar de expresión de los genes implicados en el mecanismo de incompatibilidad conforme aumentaba la complejidad del gineceo (Sage et al., 1994).

CONCLUSIONES



Conclusiones

1. *Asimina triloba* presenta una buena adaptación al clima mediterráneo. A pesar de que las temperaturas en el sur de España son más altas que en el hábitat natural de esta especie, esto no implica cambios significativos en la sucesión de las etapas fenológicas.
2. Los tubos polínicos germinan en el estigma y recorren el estilo en un corto periodo de tiempo. Tras la fecundación del óvulo se observa la formación de un cigoto con un núcleo de bordes difusos y dos prominentes nucléolos 4 días después de la polinización, mientras que la primera división del endospermo forma una célula micropilar ancha y una calazal más alargada 4-5 días después de la polinización. En el endospermo se forma un dominio micropilar y otro calazal 14-15 días después de la polinización.
3. El embrión de *Asimina triloba* se desarrolla lentamente. El tejido de almacenamiento de nutrientes inicialmente es la nucela y sobre esta los tegumentos se pliegan formando ruminaciones. En etapas posteriores, el endospermo crece y se expande reemplazando a la nucela, formando finalmente en la semilla madura un endospermo ruminado lameliforme que rodea al pequeño embrión lineal y con dos cotiledones planos.
4. La semilla de *Asimina triloba* necesita de 75-80 días de estratificación fría para su germinación. El pequeño embrión se desarrolla consumiendo el endospermo a través de sus cotiledones que en ningún momento salen de la testa (germinación epigea criptocotilar).
5. *Asimina triloba* presenta un sistema de autoincompatibilidad tardía poscigótico, que se manifiesta macroscópicamente en la detención del crecimiento de los frutos 14 días después de la autopolinización y su abscisión 6 días después. La abscisión de las flores no polinizadas tiene lugar 4 días después de la dehiscencia de las anteras.
6. A nivel histológico, el desarrollo de ambos tipos de semilla procedentes de autopolinización y cruzamiento, es igual hasta 14 días después de la polinización cuando se observa un cigoto, un endospermo uniseriado de 8-14 células y una nucela parcialmente desarrollada. Todas las semillas procedentes de autopolinización detuvieron su crecimiento en este punto, mostrando claros signos de degeneración tisular 20 días después de la autopolinización.
7. A nivel transcriptómico, no hubo diferencias en la expresión génica entre semillas inmaduras procedentes de autopolinización y cruzamiento a los 4 días después de la polinización. Se empiezan a observar diferencias 8 días después de la polinización cuando las semillas de cruzamiento presentan expresión génica

relacionada con la primera división del cigoto además de la proliferación celular. En cambio, las semillas de autopolinización no expresan genes estrictamente relacionados con el cigoto. Finalmente, 14 días después de la polinización las semillas de cruzamiento expresan genes propios de proliferación celular, mientras que las semillas de autopolinización muestran una expresión génica relacionada con la inminente abscisión del fruto inmaduro que las alberga, aunque no sea todavía apreciable a nivel histológico.

BIBLIOGRAFÍA



Bibliografía

- Alali, F. Q., Liu, X. X., & McLaughlin, J. L. (1999). Annonaceous acetogenins: Recent progress. *Journal of Natural Products*, 62(3), 504–540. <https://doi.org/10.1021/np980406d>
- Alcaraz, M. L., Thorp, T. G., & Hormaza, J. I. (2013). Phenological growth stages of avocado (*Persea americana*) according to the BBCH scale. *Scientia Horticulturae*, 164, 434–439. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.09.051>
- Allen, A. M., & Hiscock, S. J. (2008). Evolution and phylogeny of self-incompatibility systems in angiosperms. *Self-Incompatibility in Flowering Plants: Evolution, Diversity, and Mechanisms*, 73–101. https://doi.org/10.1007/978-3-540-68486-2_4
- Archbold, D. D., & Pomper, K. W. (2003). Ripening pawpaw fruit exhibit respiratory and ethylene climacterics. *Postharvest Biology and Technology*, 30(1), 99–103. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(03\)00135-2](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(03)00135-2)
- Baroux, C., & Grossniklaus, U. (2019). Seeds—An evolutionary innovation underlying reproductive success in flowering plants. *Current Topics in Developmental Biology*, 131, 605–642. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2018.11.017>
- Bateman, A. J. (1954). Self-incompatibility systems in angiosperms. II. *Iberis amara*. *Heredity*, 8, 305–332.
- Bawa, K. S., Perry, D. R., & Beach, J. H. (1985). Reproductive Biology of Tropical Lowland Rain Forest Trees. I. Sexual Systems and Incompatibility Mechanisms. *American Journal of Botany*, 72(3), 331–345. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1985.tb05357.x>
- Bayer, C., & Appel, O. (1996). Occurrence and Taxonomic Significance of Ruminant Endosperm. *Springer on Behalf of New York Botanical Garden Press*.
- Bernhardt, P., Kenrick, J., & Knox, R. . B. (1984). Pollination Biology and the Breeding System of *Acacia Retinodes* (Leguminosae: Mimosoideae). *Missouri Botanical Garden Press*, 71(1), 17–29.
- Bernhardt, P., Sage, T., Weston, P., Azuma, H., Lam, M., Thien, L. B., & Bruhl, J. (2003). The pollination of *Trimenia moorei* (Trimeniaceae): Floral volatiles, insect/wind pollen vectors and stigmatic self-incompatibility in a basal angiosperm. *Annals of Botany*, 92(3), 445–458. <https://doi.org/10.1093/aob/mcg157>
- Bernhardt, P., & Thien, L. B. (1987). Self-isolation and insect pollination in the primitive angiosperms: New evaluations of older hypotheses. *Plant Systematics and Evolution*, 156(3–4), 159–176. <https://doi.org/10.1007/BF00936071>
- Berry, E. (1916). The lower Eocene floras of southeastern North America. In *Biologia Centrali-Americana* (Vol. 2).
- Bertin, R. I., Barnes, C., & Guttman, S. I. (1989). Self-sterility and cryptic self-fertility in *Campsis radicans* (Bignoniaceae). *Botanical Gazette*, 150(4), 397–403.

<https://doi.org/10.1086/337785>

- Bhandari, N. (1971). Embryology of the Magnoliales and Comments on Their Relationships. *Journal of the Arnold Arboretum*, 52(2), 285–304.
- Bhandari, N. N. (1971). EMBRYOLOGY OF MAGNOLIALES AND COMMENTS ON THEIR RELATIONSHIPS. *Journal of the Arnold Arboretum*, 52(1), 1–39.
- Bianchi, M., & Gibbs, P. (2000). Late-acting self-incompatibility in *Capparis retusa* (Capparaceae), a species of Chaco woodland in NE Argentina. *Revista Brasileira de Botânica*, 23(4), 395–400. <https://doi.org/10.1590/s0100-84042000000400005>
- Bittencourt, N. S., Gibbs, P., & Semir, J. (2003). Histological study of post-pollination events in *Spathodea campanulata* beav. (Bignoniaceae), a species with late-acting self-incompatibility. *Annals of Botany*, 91(7), 827–834. <https://doi.org/10.1093/aob/mcg088>
- Bittencourt, N. S., & Semir, J. (2006). Floral biology and late-acting self-incompatibility in *Jacaranda racemosa* (Bignoniaceae). *Australian Journal of Botany*, 54(3), 315–324. <https://doi.org/10.1071/BT04221>
- Boavida, L. C., Becker, J. D., & Feijó, J. A. (2005). The making of gametes in higher plants. *International Journal of Developmental Biology*, 49(5–6), 595–614. <https://doi.org/10.1387/ijdb.052019lb>
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Brett, M., & Callaway, D. J. (1992). Our Native Pawpaw: The Next New Commercial Fruit? *Arnoldia*, 52(3), 21–29. <http://arnoldia.arboretum.harvard.edu/pdf/articles/1992-52-3-our-native-pawpaw-the-next-new-commercial-fruit.pdf>
- Burbidge, A. H., & James, S. H. (1991). Postzygotic seed abortion in the genetic system of *Stylidium* (angiospermae: Stylidiaceae). *Journal of Heredity*, 82(4), 319–328. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a111092>
- Carvalho, R., & Webber, A. C. (2000). Biología floral de *Unonopsis guatterrioides* (A. D.C.) R.E. Fr., una Annonaceae polinizada por Euglossini. *Revista Brasileira de Botânica*, 23(4), 421–425. <https://doi.org/10.1590/s0100-84042000000400008>
- Cautín, R., & Agustí, M. (2005). Phenological growth stages of the cherimoya tree (*Annona cherimola* Mill.). *Scientia Horticulturae*, 105(4), 491–497. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2005.01.035>
- Chase, M. W., Christenhusz, M. J. M., Fay, M. F., Byng, J. W., Judd, W. S., Soltis, D. E., Mabberley, D. J., Sennikov, A. N., Soltis, P. S., Stevens, P. F., Briggs, B., Brockington, S., Chautems, A., Clark, J. C., Conran, J., Haston, E., Möller, M., Moore, M., Olmstead, R., ... Weber, A. (2016). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 181(1), 1–20.

<https://doi.org/10.1111/boj.12385>

- Cheung, A. Y., Boavida, L. C., Aggarwal, M., Wu, H. M., & Feijó, J. A. (2010). The pollen tube journey in the pistil and imaging the in vivo process by two-photon microscopy. *Journal of Experimental Botany*, *61*(7), 1907–1915. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq062>
- Codierung, E., Feller, C., Hack, H., Heß, M., & Klose, R. (1992). *Phänologische Entwicklungsstadien mono- und dikotyle Pflanzen Inhaltsverzeichnis*. April.
- Corner, E. J. H. (1949). The Annonaceous seed and its four integuments. *New Phytologist*, *48*(3), 332–364. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1949.tb05129.x>
- Couvreur, T. L. P., Helmstetter, A. J., Koenen, E. J. M., Bethune, K., Brandão, R. D., Little, S. A., Sauquet, H., & Erkens, R. H. J. (2019). Phylogenomics of the major tropical plant family annonaceae using targeted enrichment of nuclear genes. *Frontiers in Plant Science*, *9*(January). <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01941>
- Currier. (1957). *Callose Substance in Plant Cells Author (s): H . B . Currier Published by : Wiley Stable URL : https://www.jstor.org/stable/2438916*. *44*(6), 478–488.
- da Silva, M. R., Clément, D., Gramacho, K. P., Monteiro, W. ., Argout, X., Lanaud, C., & Lopes, U. (2016). Genome-wide association mapping of sexual incompatibility genes in cacao (*Theobroma cacao* L.). *Tree Genetics and Genomes*, *12*(3). <https://doi.org/10.1007/s11295-016-1012-0>
- Davis, C. (1974). The paw paw in Southern Michigan. *Calif. Rare Fruit Growers Yearbook*, *6*, 181–187.
- Decraene, L. -P R., & Smets, E. (1990). The floral development of *Popowia whitei* (Annonaceae). *Nordic Journal of Botany*, *10*(4), 411–420. <https://doi.org/10.1111/j.1756-1051.1990.tb01781.x>
- Donoghue, M. J., & Scheiner, M. (1992). The evolution of endosperm: a phylogenetic account. In R. E. Wyatt (Ed.), *Ecology and Evolution of Plant Reproduction: New Approaches* (pp. 356–389). Chapman and Hall.
- Doyle, J. A., Manchester, S. R., & Sauquet, H. (2008). A seed related to Myristicaceae in the Early Eocene of southern England. *Systematic Botany*, *33*(4), 636–646. <https://doi.org/10.1600/036364408786500217>
- Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1987). *A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue*.
- Doyle, J., & Le Thomas, A. (1996). Phylogenetic analysis and character evolution in Annonaceae. *Bulletin Du Muséum National d'histoire Naturelle. Section B, Adansonia*, *18*(3), 279–334.
- Duffrin, M. W., & Pomper, K. W. (2006). Development of flavor descriptors for Pawpaw fruit puree: A step toward the establishment of a native tree fruit industry. *Family and Consumer Sciences Research Journal*, *35*(2), 118–130. <https://doi.org/10.1177/1077727X06292931>

- East, E. M. (1940). *The distribution of self-sterility in the flowering plants. Proc Amer Phil Soc* 82:449-518F476. 82(4).
- Endress, P. K. (2010). The evolution of floral biology in basal angiosperms. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365(1539), 411–421. <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0228>
- Endress, P. K. (2011a). Angiosperm ovules: Diversity, development, evolution. *Annals of Botany*, 107(9), 1465–1489. <https://doi.org/10.1093/aob/mcr120>
- Endress, P. K. (2011b). Evolutionary diversification of the flowers in angiosperms. *American Journal of Botany*, 98(3), 370–396. <https://doi.org/10.3732/ajb.1000299>
- Endress, P. K., & Igersheim, A. (2000). Gynoecium structure and evolution in basal angiosperms. *International Journal of Plant Sciences*, 161(6), S211–S223.
- Endress, P. K., & Igersheim, A. (2011). Gynoecium Structure and Evolution in Basal Angiosperms. *International Journal of Plant Sciences*, 161(November 2000), S211–S213.
- Ewels, P., Magnusson, M., Lundin, S., & Källér, M. (2016). MultiQC: Summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics*, 32(19), 3047–3048. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw354>
- Fadón, E., Herrero, M., & Rodrigo, J. (2015). Flower development in sweet cherry framed in the BBCH scale. *Scientia Horticulturae*, 192, 141–147. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.05.027>
- Faure, J. E., Rotman, N., Fortuné, P., & Dumas, C. (2002). Fertilization in *Arabidopsis thaliana* wild type: Developmental stages and time course. *Plant Journal*, 30(4). <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2002.01305.x>
- Ferrer-Blanco, C., Hormaza, J. I., & Lora, J. (2022). Phenological growth stages of “pawpaw” [*Asimina triloba* (L.) Dunal, Annonaceae] according to the BBCH scale. *Scientia Horticulturae*, 295, 110853. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110853>
- Finatto, T., Dos Santos, K. L., Steiner, N., Bizzocchi, L., Holderbaum, D. F., Ducroquet, J. P. H. J., Guerra, M. P., & Nodari, R. O. (2011). Late-acting self-incompatibility in *Acca sellowiana* (Myrtaceae)1. *Australian Journal of Botany*, 59(1), 53–60. <https://doi.org/10.1071/BT10152>
- Finneseth, C. H., Layne, D. R., & Geneve, R. L. (1998). Morphological development of the North American pawpaw during germination and seedling emergence. In *HortScience* (Vol. 33, Issue 5, pp. 802–805). <https://doi.org/10.21273/hortsci.33.5.802>
- Floyd, S., & Friedman, W. (2000). *Evolution of Endosperm Developmental Patterns among Basal Flowering Plants*. 161(November 2000).
- Floyd, S. K., & Friedman, W. E. (2000). Evolution of endosperm developmental patterns among basal flowering plants. *International Journal of Plant Sciences*, 161(6 SUPPL.), S57–S81. <https://doi.org/10.1086/317579>

- Floyd, S. K., & Friedman, W. E. (2001). Developmental evolution of endosperm in basal angiosperms: Evidence from *Amborella* (Amborellaceae), *Nuphar* (Nymphaeaceae), and *Illicium* (Illiciaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 228(3–4), 153–169. <https://doi.org/10.1007/s006060170026>
- Forbis, T. A., Floyd, S. K., & De Queiroz, A. (2002). The evolution of embryo size in angiosperms and other seed plants: Implications for the evolution of seed dormancy. *Evolution*, 56(11), 2112–2125. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2002.tb00137.x>
- Ford, C. S., & Wilkinson, M. J. (2012). Confocal observations of late-acting self-incompatibility in *Theobroma cacao* L. *Sexual Plant Reproduction*, 25(3), 169–183. <https://doi.org/10.1007/s00497-012-0188-1>
- Fox, S. (2012). Picking up the pawpaws: The rare woody plants of Ontario program at the University of Guelph Arboretum. *Arnoldia*, 69(3), 2–13.
- Franklin-Tong, N., & Franklin, F. C. H. (2003). Gametophytic self-incompatibility inhibits pollen tube growth using different mechanisms. *Trends in Plant Science*, 8(12), 598–605. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2003.10.008>
- Friedman, W. E. (1994). The evolution of embryogeny in seed plants and the developmental origin and early history of endosperm. *American Journal of Botany*, 81(11). <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1994.tb15633.x>
- Friedman, W. E. (2006). Embryological evidence for developmental lability during early angiosperm evolution. *Nature*, 441(7091), 337–340. <https://doi.org/10.1038/nature04690>
- Friedman, W. E., & Bachelier, J. B. (2013). Seed development in *Trimenia* (Trimeniaceae) and its bearing on the evolution of embryo-nourishing strategies in early flowering plant lineages. *American Journal of Botany*, 100(5), 906–915. <https://doi.org/10.3732/ajb.1200632>
- Friedman, W. E., Bachelier, J. B., & Hormaza, J. I. (2012). Embryology in *trithuria submersa* (Hydatellaceae) and relationships between embryo, endosperm, and perisperm in early-diverging flowering plants. *American Journal of Botany*, 99(6), 1083–1095. <https://doi.org/10.3732/ajb.1200066>
- Friedman, W. E., & Williams, J. H. (2004). Developmental evolution of the sexual process in ancient flowering plant lineages. *Plant Cell*, 16(SUPPL.), 119–132. <https://doi.org/10.1105/tpc.017277>
- Galastri, N. A., & Oliveira, D. M. T. (2016). Megasporogenesis and megagametogenesis in species of Annonaceae, the largest family of early-diverging angiosperms. *New Zealand Journal of Botany*, 54(1), 63–73. <https://doi.org/10.1080/0028825X.2015.1109526>
- Gibbs, P. (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., & Bianchi, M. (1993). Post-pollination Events in Species of *Chorisia*

(Bombacaceae) and *Tabebuia* (Bignoniaceae) with Late-acting Self-incompatibility. *Botanica Acta*, 106(1), 64–71. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.1993.tb00339.x>

Gibbs, P., & Bianchi, M. B. (1999). Does late-acting self-incompatibility (LSI) show family clustering? Two more species of bignoniaceae with LSI: *Dolichandra cynanchoides* and *Tabebuia nodosa*. *Annals of Botany*, 84(4), 449–457. <https://doi.org/10.1006/anbo.1999.0933>

Gibbs, P., Bianchi, M., & Taroda Ranga, N. (2004). Effects of self-, chase and mixed self/cross-pollinations on pistil longevity and fruit set in *Ceiba* species (Bombacaceae) with late-acting self-incompatibility. *Annals of Botany*, 94(2), 305–310. <https://doi.org/10.1093/aob/mch141>

Gibbs, P., Oliveira, P., & Bianchi, M. (1999). Postzygotic Control of Selfing in *Hymenaea stigonocarpa* (Leguminosae - Caesalpinioideae), a Bat - Pollinated Tree of the Brazilian Cerrados Author (s): Peter E . Gibbs , Paulo E . Oliveira , and Marta B . Bianchi Published by: The University of Chica. *International Journal of Plant Sciences*, 160(1), 72–78.

Gottberger, G. (1999). Pollination and evolution in neotropical Annonaceae. *Plant Species Biology*, 14(2), 143–152. <https://doi.org/10.1046/j.1442-1984.1999.00018.x>

Gottberger, G. (2015). Generalist and specialist pollination in basal angiosperms (ANITA grade, basal monocots, magnoliids, Chloranthaceae and Ceratophyllaceae): what we know now. *Plant Diversity and Evolution*, 131(4), 263–362. <https://doi.org/10.1127/pde/2015/0131-0085>

Hackluyt, R. (1609). *A Narrative of the expedition of Hernando de Soto into Florida published at Evora in 1557*.

Hasenstein, K. H., & Zavada, M. S. (2001). Auxin modification of the incompatibility response in *Theobroma cacao*. *Physiologia Plantarum*, 112(1), 113–118. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2001.1120115.x>

Hayat, A. M. (1963). Morphology of seed germination and seedling in *Annona squamosa*. *Botanical Gazette*, 124(5), 360–362.

Hayat, M. A., & Canright, J. E. (1965). The Developmental Anatomy of the Annonaceae. I. Embryo and Early Seedling Structure. *American Journal of Botany*, 52(3), 228. <https://doi.org/10.2307/2439935>

Hormaza, J. I. (2014). The Pawpaw, a Forgotten North American Fruit Tree. *Arnoldia*, 72(1), 13–23. <http://bigtime.arboretum.harvard.edu/pdf/articles/2014-72-1-the-pawpaw-a-forgotten-north-american-fruit-tree.pdf>

Janzen, D. H., & Martin, P. S. (1982). Neotropical anachronisms: The fruits the gomphotheres ate. *Science*, 215(4528), 19–27. <https://doi.org/10.1126/science.215.4528.19>

Kawashima, T., & Berger, F. (2011). Green love talks; cell-cell communication during double fertilization in flowering plants. *AoB PLANTS*, 11(1), 1–10. <https://doi.org/10.1093/aobpla/plr015>

- Kenrick, J., Kaul, V., & Williams, E. G. (1986). Self-incompatibility in *Acacia retinodes*: Site of pollen-tube arrest is the nucellus. *Planta*, *169*(2), 245–250. <https://doi.org/10.1007/BF00392321>
- Kiill, L. H. P., & Costa, J. G. da. (2003). Biologia floral e sistema de reprodução de *Annona squamosa* L. (Annonaceae) na região de Petrolina-PE. *Ciência Rural*, *33*(5), 851–856. <https://doi.org/10.1590/s0103-84782003000500009>
- Kim, D., Paggi, J. M., Park, C., Bennett, C., & Salzberg, S. L. (2019). Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. *Nature Biotechnology*, *37*(8), 907–915. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0201-4>
- Knight, R., & Rogers, H. (1955). Incompatibility in *Theobroma cacao*. *Heredity*, *9*, 69–77.
- Koehl, V., Thien, L. B., Heij, E. G., & Sage, T. L. (2004). The causes of self-sterility in natural populations of the relictual angiosperm, *Illicium floridanum* (Illiciaceae). *Annals of Botany*, *94*(1), 43–50. <https://doi.org/10.1093/aob/mch113>
- Kral, R. (1960). A revision of *Asimia* and *Deeringothamnus* (Annonaceae). *Brittonia*, *12*, 233–278.
- Lampton, R. K. (1957). Floral Morphology in *Asimina triloba* Dunal. I. Development of Ovule and Embryo Sac. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, *84*(3), 151. <https://doi.org/10.2307/2482886>
- Lanaud, C., Fouet, O., Legavre, T., Lopes, U., Sounigo, O., Eyango, M. C., Mermaz, B., Da Silva, M. R., Llor Solórzano, R. G., Argout, X., Gyapay, G., Ebaiarrey, H. E., Colonges, K., Sanier, C., Rivallan, R., Mastin, G., Cryer, N., Boccara, M., Verdeil, J. L., ... Clément, D. (2017). Deciphering the *Theobroma cacao* self-incompatibility system: From genomics to diagnostic markers for self-compatibility. *Journal of Experimental Botany*, *68*(17), 4775–4790. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx293>
- Lau, S., Slane, D., Herud, O., Kong, J., & Jürgens, G. (2012). Early embryogenesis in flowering plants: Setting up the basic body pattern. In *Annual Review of Plant Biology* (Vol. 63). <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105507>
- Layne, D. R. (1996). Exotic horticultural plants with commercial potential in the United States market: Introduction to the Workshop. *HortScience*, *31*(5), 764–765. <https://doi.org/10.21273/hortsci.31.5.764>
- Leins, P., & Erbar, C. (1996). Early floral developmental studies in Annonaceae In: Morawetz W, Winkler H, eds. Reproductive Morphology in Annonaceae. *Akademie Der Wissenschaften*, 1–27.
- Liao, T., Yuan, D. Y., Zou, F., Gao, C., Yang, Y., Zhang, L., & Tan, X. F. (2014). Self-sterility in *Camellia oleifera* may be due to the prezygotic late-acting self-incompatibility. *PLoS ONE*, *9*(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099639>
- Liao, Y., Smyth, G. K., & Shi, W. (2013). The Subread aligner: Fast, accurate and scalable read mapping by seed-and-vote. *Nucleic Acids Research*, *41*(10). <https://doi.org/10.1093/nar/gkt214>

- Linkies, A., Graeber, K., Knight, C., & Leubner-Metzger, G. (2010). The evolution of seeds. *New Phytologist*, 186(4), 817–831. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03249.x>
- Linskens & Esser. (1956). *Über eine spezifische anfärbung der pollenschlauche im griffel und die zahl der kallosepfropfen nach selbstung und fremdung*. 147004, 1–21.
- Lipow, S. R., & Wyatt, R. (1999). Single gene control of postzygotic self-incompatibility in poke milkweed, *Asclepias exaltata* L. *Genetics*, 154(2), 893–907. <https://doi.org/10.1093/genetics/154.2.893>
- Liu, K., Li, H., Yuan, C., Huang, Y., Chen, Y., & Liu, J. (2014). Identification of phenological growth stages of sugar apple (*Annona squamosa* L.) using the extended BBCH-scale. *Scientia Horticulturae*, 181, 76–80. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.10.046>
- Liu, Y., Yan, Z., Chen, N., Di, X., Huang, J., & Guo, G. (2010). Development and function of central cell in angiosperm female gametophyte. *Genesis*, 48(8), 466–478. <https://doi.org/10.1002/dvg.20647>
- Lloyd, D., & Webb, C. (1986). The avoidance of interference between the presentation of pollen and stigmas in angiosperms I. dichogamy. *New Zealand Journal of Botany*, 24(1), 135–162. <https://doi.org/10.1080/0028825X.1986.10409725>
- Lora, J., Herrero, M., & Hormaza, J. I. (2011). Stigmatic receptivity in a dichogamous early-divergent angiosperm species, *Annona cherimola* (Annonaceae): Influence of temperature and humidity. *American Journal of Botany*, 98(2), 265–274. <https://doi.org/10.3732/ajb.1000185>
- Lora, J., Herrero, M., & Hormaza, J. I. (2014). Microspore development in annona (Annonaceae): Differences between monadand tetrad pollen. *American Journal of Botany*, 101(9), 1508–1518. <https://doi.org/10.3732/ajb.1400312>
- Lora, J., Hormaza, J. I., & Herrero, M. (2010). The progamic phase of an early-divergent angiosperm, *Annona cherimola* (Annonaceae). *Annals of Botany*, 105(2), 221–231. <https://doi.org/10.1093/aob/mcp276>
- Lora, J., Hormaza, J. I., & Herrero, M. (2016). The diversity of the pollen tube pathway in plants: Toward an increasing control by the sporophyte. *Frontiers in Plant Science*, 7(FEB2016), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00107>
- Losada, J. M., Bachelier, J. B., & Friedman, W. E. (2017a). Prolonged embryogenesis in *Austrobaileya scandens* (Austrobaileyaceae): its ecological and evolutionary significance. *New Phytologist*, 215(2), 851–864. <https://doi.org/10.1111/nph.14621>
- Losada, J. M., Herrero, M., Hormaza, J. I., & Friedman, W. E. (2014). Arabinogalactan proteins mark stigmatic receptivity in the protogynous flowers of *Magnolia virginiana* (Magnoliaceae). *American Journal of Botany*, 101(11), 1963–1975. <https://doi.org/10.3732/ajb.1400280>
- Losada, J. M., Hormaza, J. I., & Lora, J. (2017b). Pollen-pistil interaction in pawpaw (*Asimina triloba*), the northernmost species of the mainly tropical family

- annonaceae. *American Journal of Botany*, 104(12), 1891–1903. <https://doi.org/10.3732/ajb.1700319>
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12), 1–21. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Lu, J., & Magnani, E. (2018). Seed tissue and nutrient partitioning, a case for the nucellus. *Plant Reproduction*, 31(3), 309–317. <https://doi.org/10.1007/s00497-018-0338-1>
- Maheshwari, P. (1950). An introduction to the embryology of angiosperms. In *The botanical sciences* (Vol. 53, Issue 9).
- Martinez Maldonado, F. E., Miranda Lasprilla, D., & Magnitskiy, S. (2013). Anatomy of sugar apple (*annona squamosa* l.) seeds (annonaceae). *Fabio Martinez, Diego Miranda Stanislav Magnitskiy*, 31(3), 279–287. <http://revistas.unal.edu.co/index.php/agrocol/article/view/37045>
- Matsumoto, D., & Tao, R. (2016). Distinct self-recognition in the *Prunus* S-RNase-based gametophytic self-incompatibility system. *Horticulture Journal*, 85(4), 289–305. <https://doi.org/10.2503/hortj.MI-IR06>
- McGrath, M. J., & Karahadian, C. (1994). Evaluation of Physical, Chemical, and Sensory Properties of Pawpaw Fruit (*Asimina triloba*) as Indicators of Ripeness. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(4), 968–974. <https://doi.org/10.1021/jf00040a025>
- Meier, U., Bleiholder, H., Buhr, L., Feller, C., Hack, H., Heß, M., Lancashire, P., Schnock, U., Stauß, R., & Van Den Boom, T. (2009). The BBCH system to coding the phenological growth stages of plants—history and publications. *Journal Für Kulturpflanzen*, 61(2), 41–52. <https://doi.org/10.5073/JfK.2009.02.01>
- Mohana, Rao, P. . (1982). Seed and fruit anatomy in *asimina triloba*, with a discussion on the affinities of Annonaceae. *Bot. Jahrb. Syst.*, 103, 47–57.
- Momose, K., Nagamitsu, T., & Inoue, T. (1998). Thrips cross-pollination of *Popowia pisocarpa* (Annonaceae) in a lowland dipterocarp forest in Sarawak. *Biotropica*, 30(3), 444–448. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7429.1998.tb00078.x>
- Naarborgh, A. T., & Willemse, M. T. M. (1992). The ovular incompatibility system in *Gasteria verrucosa*. *Euphytica*, 58, 231–240.
- Nagamitsu, T., & Inoue, T. (1997). Cockroach pollination and breeding system of *Uvaria elmeri* (Annonaceae) in a lowland mixed-dipterocarp forest in Sarawak. *American Journal of Botany*, 84(2), 208–213. <https://doi.org/10.2307/2446082>
- Norman, E. M. (2003). Reproductive biology of *Deeringothamnus rugelii* and *D. pulchellus* (Annonaceae). *Taxon*, 52(3), 547–555. <https://doi.org/10.2307/3647453>
- Norman, E. M., & Clayton, D. (1986). *Reproductive Biology of two Florida Pawpaws : Asimina obovata and A . pygmaea*. 113(1), 16–22.
- Norman, E. M., Rice, K., & Cochran, S. (1992). Reproductive Biology of *Asimina parviflora* (Annonaceae). *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 119(1), 1–5.

- Nurhayani, F. O., Wulandari, A. S., & Suharsi, T. K. (2019). Morphology and anatomy of the fruit and seed of *Cananga odorata* (lam.) hook.f. & Thomson. *Biodiversitas*, 20(11). <https://doi.org/10.13057/biodiv/d201112>
- Periasamy, K. (1964). Studies on seeds with ruminant endosperm - V. Seed development and rumination in two genera of the rubiaceae. *Proceedings of the Indian Academy of Sciences - Section B*, 60(5), 351–360. <https://doi.org/10.1007/BF03053893>
- Peterson, R. N. (1991). Pawpaw (*Asimina*). Genetic resources of temperate fruit and nut crops. *Acta Horticulturae*, 290, 567–600. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4585-1_2374
- Pomper, K.W. & Layne, D. R. (2005). The North American Pawpaw: Botany and Horticulture. In *Horticultural Reviews, Volume 31*.
- Pomper, K. W., Crabtree, S. B., Brown, S. P., Jones, S. C., Bonney, T. M., & Layne, D. R. (2003). Assessment of genetic diversity of pawpaw (*Asimina triloba*) cultivars with intersimple sequence repeat markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 128(4), 521–525. <https://doi.org/10.21273/jashs.128.4.0521>
- Pomper, K. W., Crabtree, S. B., Layne, D. R., & Peterson, R. N. (2008). Flowering and fruiting characteristics of eight pawpaw [*Asimina triloba* (L.) Dunal] selections in Kentucky. *Journal of the American Pomological Society*, 62(3), 89–97. [http://www.pawpaw.kysu.edu/ppf/Pomper et al. 62\(3\).pdf](http://www.pawpaw.kysu.edu/ppf/Pomper%20et%20al.%2062(3).pdf)
- Pound, L. M., Wallwork, M. A. B., Potts, B. M., & Sedgley, M. (2002). Self-incompatibility in *Eucalyptus globulus* spp. *globulus* (Myrtaceae). *Australian Journal of Botany*, 50, 365–372.
- Radoeva, T., Vaddepalli, P., Zhang, Z., & Weijers, D. (2019). Evolution, Initiation, and Diversity in Early Plant Embryogenesis. *Developmental Cell*, 50(5), 533–543. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.07.011>
- Raudvere, U., Kolberg, L., Kuzmin, I., Arak, T., Adler, P., Peterson, H., & Vilo, J. (2019). G:Profiler: A web server for functional enrichment analysis and conversions of gene lists (2019 update). *Nucleic Acids Research*, 47(W1), W191–W198. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz369>
- Reimand, J., Kull, M., Peterson, H., Hansen, J., & Vilo, J. (2007). G:Profiler—a web-based toolset for functional profiling of gene lists from large-scale experiments. *Nucleic Acids Research*, 35(SUPPL.2), 193–200. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm226>
- Rensing, S. A., & Weijers, D. (2021). Flowering plant embryos: How did we end up here? *Plant Reproduction*, 34(4), 365–371. <https://doi.org/10.1007/s00497-021-00427-y>
- Rogstad, S. H. (1994). The biosystematics and evolution of the *Polyalthia hypoleuca* species complex (Annonaceae) of Malesia. III. Floral ontogeny and breeding systems. *American Journal of Botany*, 81(2), 145–154. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1994.tb15423.x>
- Rudall, P. J. (2021). Evolution and patterning of the ovule in seed plants. *Biological Reviews*. <https://doi.org/10.1111/brv.12684>

- Russel, S. D. (1992). Double Fertilization. *International Review of Cytology*, 140, 357–388. All Papers/Other/73019- 1991 - Scott D. Russell.pdf
- Sage, T. L., Bertin, R. I., & Williams, E. G. (1994). Ovarian and other late-acting self-incompatibility systems. In *Genetic control of self-incompatibility and reproductive development in flowering plants* (pp. 116–140).
- Sage, T. L., & Sampson, F. (2003). Evidence for ovarian self-incompatibility as a cause of self-sterility in the relictual woody angiosperm, *Pseudowintera axillaris* (Winteraceae). *Annals of Botany*, 91(7), 807–816. <https://doi.org/10.1093/aob/mcg085>
- Sage, T. L., & Williams, E. G. (1994). Ovarian and other late-acting self-incompatibility systems. In E. G. Williams, A. E. Clarke, & R. B. Knox (Eds.), *Genetic Control of Self- Incompatibility and Reproductive Development in Flowering Plants* (pp. 116–140). Kluwer Academic Publishers.
- Salinero, M. C., Vela, P., & Sainz, M. J. (2009). Phenological growth stages of kiwifruit (*Actinidia deliciosa* 'Hayward'). *Scientia Horticulturae*, 121(1), 27–31. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.01.013>
- Sanzol, J., & Herrero, M. (2001). The “effective pollination period” in fruit trees. *Scientia Horticulturae*, 90(1–2), 1–17. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(00\)00252-1](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(00)00252-1)
- Saunders, R. M. K. (2012). The diversity and evolution of pollination systems in Annonaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 169(1), 222–244. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2011.01208.x>
- Schneider, E., & Moore, L. (1977). Morphological studies of the Nymphaeaceae. The Floral Biology of *Nuphar lutea* subsp. *Macrophylla*. *Brittonia*, 29, 88–99.
- Sears, E. R. (1937). Cytological Phenomena Connected With Self-Sterility in the Flowering Plants. *Genetics*, 22(1), 130–181. <https://doi.org/10.1093/genetics/22.1.130>
- Seavey, S. R., & Bawa, K. S. (1986). Late-acting self-incompatibility in angiosperms. *The Botanical Review*, 52(2), 195–219. <https://doi.org/10.1007/BF02861001>
- Seavey, S. R., & Carter, S. K. (1994). Self-sterility in *Epilobium obcordatum* (Onagraceae) . *American Journal of Botany*, 81(3), 331–338. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1994.tb15451.x>
- Shivanna, K. R., & Tandon, R. (2017). Reproductive Ecology of Flowering Plants: A MAnnual. In *Henry David Thoreau in Context*. <https://doi.org/10.1017/9781316569214.026>
- Sivaramakrishna, D. (1978). Size relationships of apical cell and basal cell in two-celled embryos in angiosperms. *Canadian Journal of Botany*, 56(12). <https://doi.org/10.1139/b78-166>
- Stebbins. (1957). Self fertilization and population variability in the higher plants. *The American Naturalist*, XCI(861), 337–354.

- Suassuna, T. D. M. F., Bruckner, C. H., De Carvalho, C. R., & Borém, A. (2003). Self-incompatibility in passionfruit: Evidence of gametophytic-sporophytic control. *Theoretical and Applied Genetics*, *106*(2), 298–302. <https://doi.org/10.1007/s00122-002-1103-1>
- Svoma, E. (1997a). *Artabotrys hexapetalus* (*Annonaceae*). *207*, 205–223.
- Svoma, E. (1997b). Seed development and function in *Artabotrys hexapetalus* (*Annonaceae*). *Plant Systematics and Evolution*, *207*(3–4), 205–223.
- Svoma, E. (1998). Seed morphology and anatomy in some *Annonaceae*. *Plant Systematics and Evolution*, *209*(3–4), 177–204. <https://doi.org/10.1007/BF00985228>
- Szilagyi, B. A. et al. (2016). Flowering of *Asimina triloba* (L .) Dunal in the conditions of Transylvania. *Muzeul Olteniei Craiova. Oltenia. Studii Și Comunicări. Științele Naturii*, *32*(1), 50–54.
- Szklarczyk, D., Franceschini, A., Wyder, S., Forslund, K., Heller, D., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Roth, A., Santos, A., Tsafou, K. P., Kuhn, M., Bork, P., Jensen, L. J., & Von Mering, C. (2015). STRING v10: Protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Research*, *43*(D1), D447–D452. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1003>
- The pawpaw Foundation. (1990). Pawpaws in the garden. In *Plant Industries Bulletin*.
- Tobe, H., Stuessy, T. F., Raven, P. H., & Oginuma, K. (1993). Embryology and Karyomorphology of Lactoridaceae. *American Journal of Botany*, *80*(8), 933–946. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1993.tb15315.x>
- Van Setten, A., & KoeK-Noorman, J. (1986). Studies in *Annonaceae*. VI. A leaf anatomical survey of genera of *Annonaceae* in the Neotropics. *Bot. Jahrb. Syst.*, *108*, 17–50.
- Van Zonneveld, M., Larranaga, N., Blonder, B., Coradin, L., Hormaza, J. I., & Hunter, D. (2018). Human diets drive range expansion of megafauna-dispersed fruit species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*(13), 3326–3331. <https://doi.org/10.1073/pnas.1718045115>
- Waser, N. M., & Price, M. V. (1991). Reproductive costs of self-pollination in *Ipomopsis aggregata* (*Polemoniaceae*): are ovules usurped? *American Journal of Botany*, *78*(8), 1036–1043. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1991.tb14511.x>
- Weber, H., Borisjuk, L., & Wobus, U. (2005). Molecular physiology of legume seed development. In *Annual Review of Plant Biology* (Vol. 56). <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144201>
- Williams, J. H., & Friedman, W. E. (2002). Identification of diploid endosperm in an early angiosperm lineage. *Nature*, *415*(6871), 522–526. <https://doi.org/10.1038/415522a>
- Williams, J. H., & Kennard, K. S. (2006). Microsatellite loci for the basal angiosperm

- Austrobaileya scandens (Austrobaileyaceae). *Molecular Ecology Notes*, 6(1), 201–203. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01192.x>
- Williams, J. H., McNeilage, R. T., Lettre, M. T., & Taylor, M. L. (2010). Pollen tube growth and the pollen-tube pathway of *Nymphaea odorata* (Nymphaeaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 162(4), 581–593. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2010.01039.x>
- Willson, M. F., & Schemske, D. W. (1980). Pollinator Limitation, Fruit Production, and Floral Display in Pawpaw (*Asimina triloba*). *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 107(3), 401. <https://doi.org/10.2307/2484160>
- Wu, C. C., Diggle, P. K., & Friedman, W. E. (2011). Female gametophyte development and double fertilization in Balsas teosinte, *Zea mays* subsp. *parviglumis* (Poaceae). *Sexual Plant Reproduction*, 24(3), 219–229. <https://doi.org/10.1007/s00497-011-0164-1>
- Zhou, J., Lu, M., Yu, S., Liu, Y., Yang, J., & Tan, X. (2020). In-depth understanding of *Camellia oleifera* self-incompatibility by comparative transcriptome, proteome and metabolome. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(5). <https://doi.org/10.3390/ijms21051600>
- Zhou, Q., & Zheng, Y. (2015). Comparative de novo transcriptome analysis of fertilized ovules in *Xanthoxylum sorbifolium* uncovered a pool of genes expressed specifically or preferentially in the selfed ovule that are potentially involved in late-acting self-incompatibility. *PLoS ONE*, 10(10), 1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140507>
- Zimmerman, G. A. (1938). The papaw. *North. Nut Growers Assoc. Annu. Rep.*, 29, 99–102.
- Zimmerman, G. A. (1940). Further report on the papaw. *North. Nut Growers Assoc. Annu. Rep.*, 31, 133–136.
- Zimmerman, G. A. (1941). Hybrids of the american papaw. *Journal of Heredity*, 32(1), 82–91.

ANEXO 1

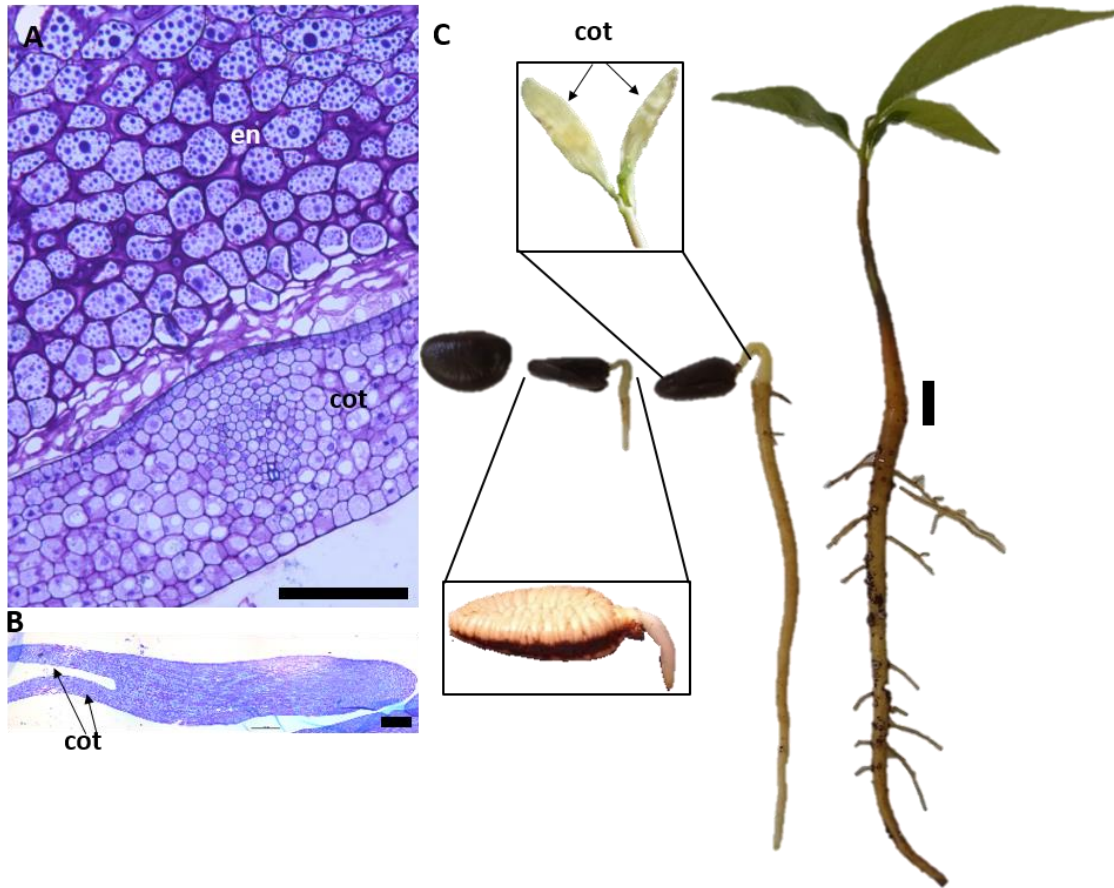
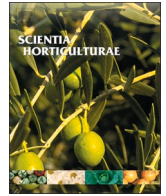


Figura S1. Semilla y germinación. A. Sección histológica de una semilla de pawpaw madura, corte transversal de un cotiledón rodeado de endospermo, escala= 100 μ m. B. Sección longitudinal de un embrión maduro, escala= 200 μ m. C. Germinación y plántula, escala= 1mm. en (endospermo), cot (cotiledón).

ANEXO 2

Ferrer-Blanco, C., Hormaza, J. I., & Lora, J. (2022). Phenological growth stages of “pawpaw” [*Asimina triloba* (L.) Dunal, Annonaceae] according to the BBCH scale. *Scientia Horticulturae*, 295, 110853.



Phenological growth stages of “pawpaw” [*Asimina triloba* (L.) Dunal, Annonaceae] according to the BBCH scale

C. Ferrer-Blanco, J.I. Hormaza, J. Lora *

Department of Subtropical and Mediterranean Fruit Crops, Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea La Mayora (IHSM la Mayora-CSIC-UMA), 29750 Algarrobo-Costa, Málaga, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:
BBCH scale
growth stage
Annonaceae, *Asimina triloba*
Phenology

ABSTRACT

The “pawpaw” [*Asimina triloba* (L.) Dunal] is a deciduous fruit tree native to eastern North America where it is produced at a limited commercial scale. It is particularly interesting due to its tropical flavor and powerful aroma, unique features for a fruit crop adapted to temperate climates. Although the “pawpaw” is still an underutilized fruit crop, it has a clear niche for expansion in regions with temperate climates. However, appropriate phenological comparisons in different regions are hampered due to the lack of a standardized phenological coding system in this species. Thus, in order to fill this gap, in this work, we describe with detail the phenological growth stages of the “pawpaw” by using a two-digit decimal coding system, according to the extended BBCH-scale (Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt und Chemische Industrie). The BBCH code allows to easily identify the standard phenological stages under field conditions, a useful tool for management of fruit crops and essential for the expansion of “pawpaw” to other growing areas.

1. Introduction

The “pawpaw” [*Asimina triloba* (L.) Dunal] belongs to the Annonaceae, the largest living family in the order Magnoliales in the magnoliid clade, sister to the eudicot and monocot clades of angiosperms (Chase et al., 2016). The Annonaceae comprise 110 genera and about 2450 species of trees, shrubs and lianas (Couvreur et al., 2019), including edible tropical/subtropical fruits, such as *Annona cherimola* Mill. (“cherimoya”), *Annona squamosa* Linn. (“sugar apple”), “atemoya” (a hybrid between *A. cherimola* and *A. squamosa*), *Annona muricata* Linn. (“soursop”), *Annona reticulata* Linn. (“custard apple”), *Annona macrophyllata* Donn. Smith. (“ilama”), *Annona purpurea* L. (“soncoya”) or *Annona mucosa* Jacq. (“biriba”). While almost all the species in the Annonaceae are originated from regions with tropical and subtropical climates, *Asimina* is the only genus of the family with species adapted to cold climates. *Asimina* includes at least eight species and several inter-specific hybrids, all native to North America: *Asimina incarna* (Bartr.) Exell. (“flag pawpaw”), *Asimina longifolia* Kral, *Asimina obovata* (Willd.) Nash, *Asimina parviflora* (Michx.) Dunal (“dwarf pawpaw”), *Asimina pygmaea* (Bartr.) Dunal, *Asimina reticulata* Shuttlw. ex Chapman, *Asimina tetramera* Small (“opossum pawpaw”) and *Asimina* × *nashi* Kral, hybr. nov. (*Asimina speciosa* × *Asimina longifolia*) (Kral, 1960). Except for

A. triloba and *A. parviflora*, the natural range of the genus is restricted to Florida and Georgia in the USA. *Asimina triloba*, the north American “pawpaw”, is the most widespread species of the genus, indigenous to 26 states in eastern USA, ranging from southern Ontario (Canada), New York, and southern Michigan on the north, south to northern Florida, and west to eastern Texas, Nebraska, and Kansas (Callaway, 1993; Fox, 2012). The “pawpaw” is a deciduous fruit tree that can grow successfully in USDA plant hardiness zones 5 (minimum of -29°C) through 8 (minimum of -7°C) and maximum temperatures above 35°C (Pomper and Layne, 2005).

The first fossil records of *Asimina* have been dated to the Eocene (about 56 to 34 million years ago) and the first clearly resembling *A. triloba* to the Miocene (23–5 million years ago) in the Denver formation of the Denver Basin of Colorado (Berry, 1916). At that time, large fruits such as “pawpaw” were dispersed by large mammals of the now extinct American megafauna (Janzen and Martin, 1982; van Zonneveld et al., 2018). With the extinction of the megafauna, the “pawpaw” probably survived due to its ability to reproduce vegetatively through the production of root suckers that form “pawpaw” patches in the wild. “Pawpaw” seeds could have also been dispersed by American natives who could have carried out initial genotype selection after the last ice age and expand the geographical range of the “pawpaw” (Hormaza,

* Corresponding author.

E-mail address: jlora@eelm.csic.es (J. Lora).

<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110853>

Received 5 August 2021; Received in revised form 9 December 2021; Accepted 20 December 2021

0304-4238/© 2021 The Author(s).

Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).



2014).

The earliest written record about “pawpaw” was made in 1541 by a Portuguese officer member of Spaniard Hernando de Soto’s expedition in southern North America (Hackluyt, 1609). The members of the expedition named the tree “pawpaw” because of the resemblance of the “pawpaw” fruit to the tropical fruit papaya (*Carica papaya*). Indeed, in some English speaking countries, such as Australia and New Zealand, the tropical papaya is also known as “pawpaw”, resulting in confusion between the two species (Hormaza, 2014). After this first report, the “pawpaw” was described in additional explorations of the United States (Hormaza, 2014).

The “pawpaw” fruit is the largest edible fruit native to USA. The skin of the “pawpaw” fruit is soft and thin, which makes its transport difficult and limits postharvest shelf life. Thus, local farmers also process the pulp to make ice cream, compote, jam, and wine (Duffrin and Pomper, 2006). Currently, the “pawpaw” is almost exclusively grown and produced in the eastern United States at limited commercial scale and mainly for local consumption and, therefore, shows a clear niche for expansion. The first breeding program in the US selected 56 “pawpaw” cultivars between 1900 and 1960. Although some of these cultivars have been lost, there are currently more than 40 “pawpaw” cultivars commercially available (Peterson, 1991; Pomper et al., 2003).

The description of the different phenological growth stages is essential for the expansion and development of an incipient crop. The phenological growth stages have been traditionally described based on the Fleckinger scale in crops such as pome fruits (Fleckinger, 1948). The Fleckinger scale assigned capital letters to the main stages of the bud formation of apple, in which each phase was specifically named by numbers. A few years later, in 1974, Zadoks presented a numeric decimal scale for cereals based on the previous scale. Bleiholder et al. (1989) refined the decimal scale described by Zadoks et al. (1974) with the BBCH coding system, including a uniform growth scale for mono- and dicotyledonous plants. In 1992, the extended BBCH scale was published and, since then, it has been applied for the description of the phenological stages in many crops (Hack et al., 1992; Meier et al., 2009). The basic principles of the scale provides the same code to the similar phenological stages of each plant species. These stages are clear and easily recognised by external morphological characteristics. Post-harvest or storage characteristic and seed treatments before planting that are particularly important for farmers, are also coded by the BBCH scale. Moreover, the BBCH scale is very useful in agriculture to determine the application timing of nutrients and chemicals and, in plant breeding, allows to define harvest ripeness and perform controlled pollinations (Meier et al., 2009). BBCH scale codes facilitate electronic data processing and solve interdisciplinary communication problems. For example, long series of phenological observations may be used for climate monitoring and detection of changes. In fact, the BBCH system is fully compatible with *The Global Phenological Monitoring Program* (Intern. Society of Biometeorology) (Meier et al., 2009).

Although many fruit crops have been characterized using the BBCH scale (Alcaraz et al., 2013; Fadón et al., 2015; Meier et al., 2009), only two species of the Annonaceae have been characterized by this scale: “sugar apple” (*Annona squamosa* L.) (Liu et al., 2014) and “cherimoya” (*Annona cherimola* Mill.) (Cautín and Agustí, 2005), and their phenology is very different from that of the “pawpaw”. Some efforts have been made to describe the phenology stages of the “pawpaw” but mainly focused on flowering and flower and fruit development (Pomper et al., 2008; Szilagyi, 2016). Thus, the phenological characterization of “pawpaw” is incomplete and not standardized. To fill this gap, in this work we characterize the phenological growth stages of the “pawpaw” according to the BBCH scale, an essential tool for an appropriate management and expansion of the crop.

2. Materials and methods

Data were recorded from three adult “pawpaw” trees (25 years old

Table 1

Phenological growth stages of *Asimina triloba* (L.) Dunal, “pawpaw”, according to the BBCH scale.

BBCH code	Description
Principal growth stage 0: bud development	
00	Dormancy
01	Beginning of leaf bud swelling
03	End of leaf bud swelling
09	Green leaf tips visible
Principal growth stage 1: leaf development	
10	First leaves separating
11	First leaves unfolded
19	First leaves fully expanded
Principal growth stage 3: shoot development	
31	Beginning of shoot growth
32	20% of final shoot length
33	30% of final shoot length
3.	Stages continuous till...
39	90% of final shoot length
Principal growth stage 5: reproductive development	
50	Dormancy
51	Flower bud swelling
56	Flower pedicel elongating
Principal growth stage 6: flowering	
60	First flower open
61	Beginning of flowering
62	20% of flowers open
63	30% of flowers open
64	40% of flowers open
65	Full flowering
67	Flower fading
69	End of flowering
Principal growth stage 7: fruit development	
71	Ovary growing; green ovary surrounded by dying petal crown
72	20% of final fruit size
75	50% of final fruit size
76	60% of final fruit size
77	70% of final fruit size
78	80% of final fruit size
79	Fruit ripe for harvest
Principal growth stage 9: senescence, beginning of dormancy	
91	Shoot growth completed; foliage still fully green
92	Leaves begin to discolor
93	Beginning of leaf fall
95	50% of leaves fallen
97	All leaves fallen

seedling trees) from an experimental orchard located at the IHSM La Mayora in Málaga (Spain) at latitude 36°45'N, longitude 4° 4'W and altitude 35 m above sea level. Málaga has a typical Mediterranean climate (CSa according to the Köppen climate classification) (Kottek et al., 2006). Long-term climate data for this region show annual mean temperatures of 18.4 °C, average maximum temperatures of 28.9 °C in the hottest month (August) and an average minimum temperature of 9.8 °C in the coolest month (January) with an average annual rainfall of 520 mm.

Phenological observations were carried out over two growing seasons (2019–2020). Measurements were made once per week, from June to February, and twice per week, from March to May. The diameter of the flower buds and the length of leaf buds and leaves were measured with a digital caliper. External phenological growth stages were sequentially photographed in the orchard. In order to characterize flower development, buds were collected during autumn, winter and spring and dissected and photographed with a Leica L2 stereomicroscope equipped with a Leica MC190 HD camera.

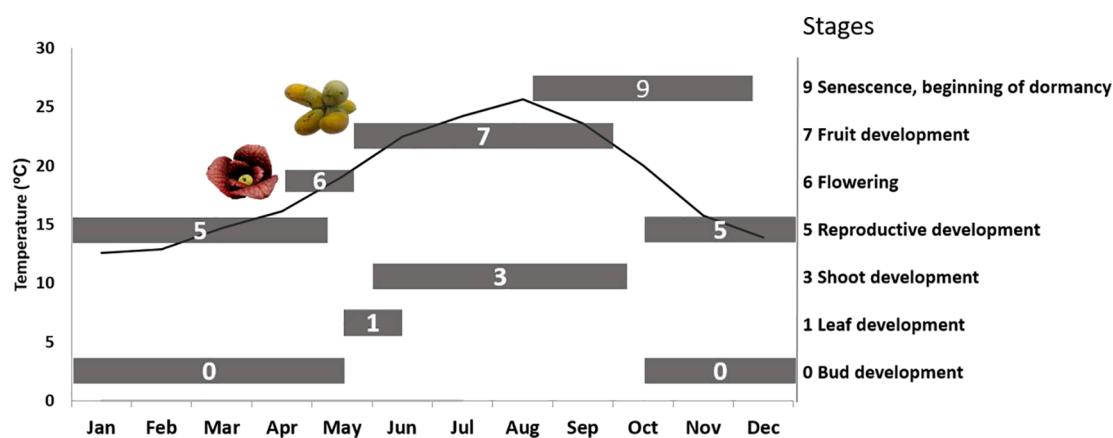


Fig. 1. Flower, fruit and leaf development of *Asimina triloba* (L.) Dunal, “pawpaw”, framed in the principal growth stages of the BBCH scale in southern Spain. Time elapsed in each stage (horizontal bars), and mean temperature (2017- 2019) (continuous line).



Fig. 2. BBCH stages for leaf development of *Asimina triloba* (L.) Dunal, “pawpaw”.

In the BBCH scale, the principal growth stages are described using numbers from 0 to 9 in ascending order and, depending upon the plant species, certain stages may be omitted. Some plant developmental stages need to be described by an additional number (0 to 9), which results in the two-digit code. Only in some plant species, an additional subdivision is necessary to accurately describe the phenological stages and, in those cases, the scale offers this possibility through a three-digit scale (Table 1).

3. Results and discussion

In this work, we describe the phenological growth stages of “pawpaw” under the environmental conditions of southern Spain. They are divided in seven principal growth stages. “Pawpaw” trees typically have a conical pyramidal shape in sunny locations and are moderately small, reaching up to 10 m tall (Hormaza, 2014; Pomper and Layne, 2005). The “pawpaw” is a deciduous tree whose leaves fall in autumn and enter dormancy during winter. Floral bud development and flowering occur in spring, when also new leaves start to grow, displaying full green foliage in summer. Fruit development takes place within four months, and the fruits are ready to harvest from the end of August to mid-September (Fig. 1).

For “pawpaw”, the BBCH scale uses 7 of the 10 principal growth stages starting with vegetative bud dormancy (stage 00) and ending when all the leaves fall (stage 97) (Table 1).

3.1. Principal growth stage 0: vegetative bud development

Under the environmental conditions of southern Spain, vegetative buds develop after flowering.

00 Dormancy, vegetative buds are closed and covered by gray-brown scales.

01 Beginning of leaf bud swelling.

03 End of leaf bud swelling.

09 Green leaf tips visible.

3.2. Principal growth stage 1: leaf development (Fig. 2)

In southern Spain, leaves begin to grow at the end of flowering (Fig. 1). The leaves have an oblong-lanceolate shape with dark green color in spring and summer but become yellow with dark brown spots before leaves fall in autumn (Pomper and Layne, 2005). To avoid herbivory, “pawpaw” leaves and twigs accumulate acetogenins, a class of natural compounds with reported antitumoral properties that are specific of the Annonaceae (Alali et al., 1999).

10 First leaves separating.

11 First leaves unfolded while flowering is ending.

19 First leaves fully expanded.

3.3. Principal growth stage 3: shoot development

In southern Spain, the shoots develop in summer (from June to August).

31 Beginning of shoot growth

32 20% of final shoot length

33 30% of final shoot length

3. Stages continuous till...

39 90% of final shoot length.



Fig. 3. BBCH stages for reproductive development and flowering of *Asimina triloba* (L.) Dunal, “pawpaw”. an (anther), ec (extragynoecial compitum), da (dehiscent anthers), pp (pubescent pedicel), sp (separated pistils), t (trichomes).

3.4. Principal growth stage 5: reproductive development (Fig. 3)

From mid-October to the end of April, the flower buds are dormant in southern Spain.

50 Dormancy, floral buds closed and covered by gray scales, with no peduncle.

51 Flower bud swelling, covered by trichomes (Fig. 3A), dark brown with no scales, the pedicel starts elongating.



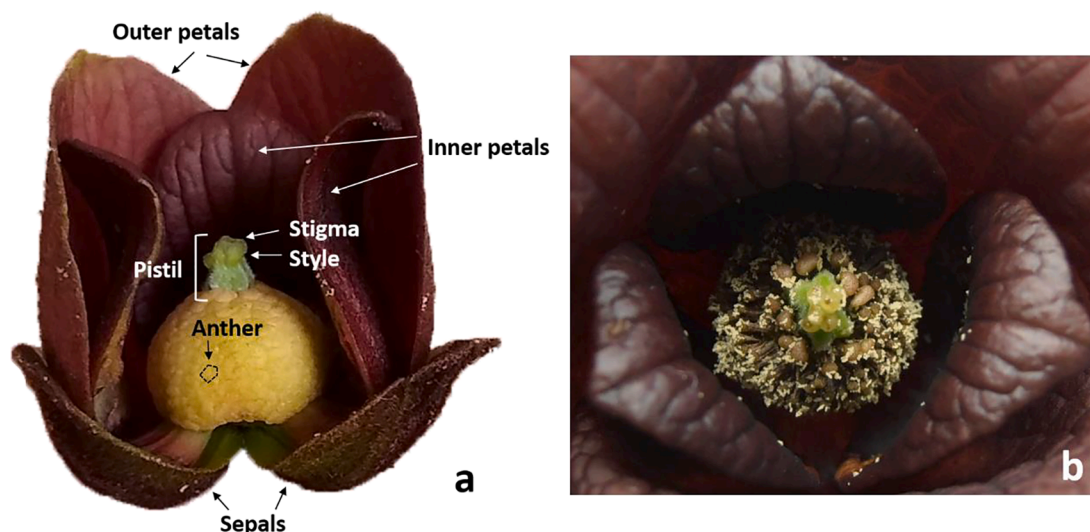


Fig. 4. Floral morphology of *Asimina triloba* (L.) Dunal, “pawpaw”. (a) flower in the female stage, sub-stage 61; (b) flower in the male stage, sub-stage 62.

56 Flower pedicel elongating. Flowers are pendant with sturdy pubescent pedicels.

3.5. Principal growth stage 6: flowering

The flower bud starts to open slightly, showing the stigmas, about 15 days before anther dehiscence (Losada et al., 2017). The flowers of the “pawpaw” have three sepals, three outer petals and three inner petals

(Fig. 4). In the early developmental stages of the flower bud, the petals are green (stage 60, Fig. 3) but become dark red (stage 61, Fig. 3) five days before anther dehiscence (Losada et al., 2017), when flowers emit a fetid odor to attract flies, beetles and, possibly, some nocturnal insects (Pomper and Layne, 2005). The gynoecium and the androecium have a conical arrangement that is usually found in other species of the Annonaceae. The “pawpaw” gynoecium has 3–10 uniloculate carpels surrounded by the globular androecium containing numerous anthers

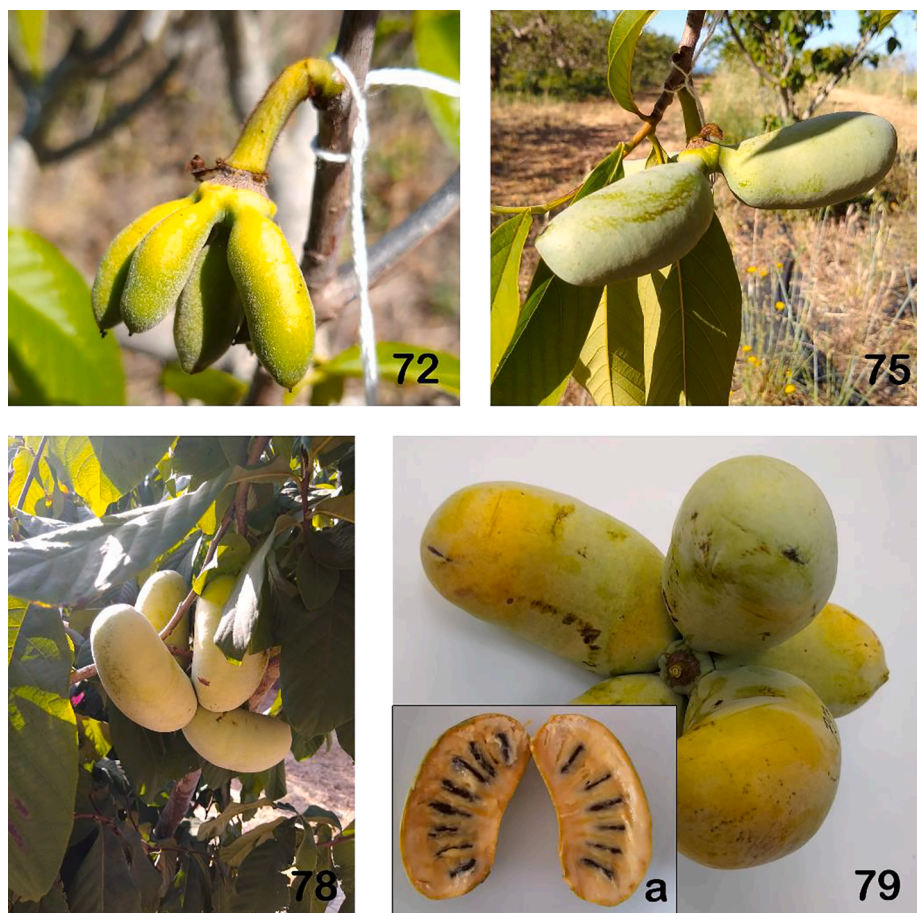


Fig. 5. BBCH stages for fruit development of *Asimina triloba* (L.) Dunal, “pawpaw”. (a) longitudinal section of a mature fruit.



Fig 6. BBCH stages for vegetative development of *Asimina triloba* (L.) Dunal, "pawpaw".

with short and stout filaments (Endress, 2010; Losada et al., 2017) (Fig. 4). The "pawpaw" flower has many features that are also found in other species of the magnoliid and other clades sister to eudicot and monocot angiosperms, such as plicate carpels with a short stylar canal, an extragynoecial compitum (Fig. 4) and anatropous and crassinucellar ovules (Endress and Igersheim, 2011; Losada et al., 2017). It also shows protogynous dichogamy where female structures mature before the male structures, thus preventing self-fertilization (Brett and Callaway, 1992). In southern Spain, most flowers bloom during the last three weeks of April but the flowering period is extended and can be as long as 30 days. Similarly, during April to May, the flowering period lasts over 3–4 weeks in Kentucky (United States) (Pomper et al., 2008) and in Transylvania (Romania) (Szilagyi, 2016). It has been reported that flowers with higher ratio of female:male parts are more frequent in large and sunlit stems (Willson and Schemske, 1980).

60 First flowers open: corolla bell-shaped with green petals showing stigmas with little secretion (Fig. 3D).

61 Beginning of flowering: 10% of flowers open. Female stage: flower with dark red corolla, stigmas covered by an extragynoecial compitum (Fig. 3E)

62 20% of flowers open: 15 days after the opening of the flower, the stigmas start to dry and the extragynoecial compitum disappears, the tips of the petals curl toward the outside and the switch to the male stage occurred with the dehiscence of all anthers (Fig. 3F).

63 30% of flowers open: petals start to wilt (Fig. 3)

64 40% of flowers open: first petals falling (Fig. 3H).

65 Full flowering: at least 50% of flowers open.

67 Flower fading: unpollinated pistils fall four days after anthesis.

69 End of flowering, initial fruit set visible, pistils start to separate from each other (Fig. 3J).

3.6. Principal growth stage 7: fruit development (Fig. 5)

The 3–10 carpels of the "pawpaw" gynoecium develop to become a fruit cluster (Fig. 5). The "pawpaw" fruit has an oblong shape, green skin and sometimes black spots, resulting from damage by wind or sunburn, are visible. The "pawpaw" fruit is climacteric (Archbold and Pomper, 2003). The fruit color progressively changes from green to yellow and this is concomitant with softening of the fruit during ripening, which is accelerated after being harvested from the tree (McGrath and Karahadian, 1994). In southern Spain, ripening takes place from the last days of August to mid-September and this is similar to that observed in Kentucky (USA), from August 20 to September 21, depending on the cultivar (Pomper and Layne, 2005).

71 Ovary growing; green ovary surrounded by dying petal crown

72 20% of final fruit size

75 50% of final fruit size

76 60% of final fruit size

77 70% of final fruit size

78 80% of final fruit size

79 Fruit ripe for harvesting, skin turns yellowish if it has been exposed to direct sunlight. Pulp attains appropriate consistency and taste (Fig. 5a).

3.7. Principal growth stage 9: senescence, beginning of dormancy (Fig. 6)

In southern Spain senescence lasts four months, from July to October.

91 Shoot growth completed; foliage still fully green.

92 Leaves begin to discolor.

93 Beginning of leaf fall.

95 50% of leaves fallen

97 All leaves fallen.

In this work, the phenological growth stages of "pawpaw" have been described using the extended BBCH scale. Previous studies on the phenology of this species have been mainly focused on the flowering season and without a standardization by using a code scale (Pomper et al., 2008; Szilagyi, 2016). A detailed and standardized description of the full life-cycle (vegetative and reproductive phase) of a plant is essential for phenological comparative studies among different environments and this is even more important for crops under the current climate change scenario. Although "pawpaw" is native to eastern North America with a temperate climate, a unique feature in the tropical/subtropical family Annonaceae, it has shown good adaptation to Mediterranean climates. Indeed, despite to warmer temperatures during April in southern Spain compared to the same dates, with early morning temperatures dropping to -2°C or lower, in Kentucky, there are not significant changes in the phenological growth stages of "pawpaw" between the two situations.

An accurate understanding of the life-cycle of "pawpaw" can lead to optimization of many horticultural practices such as grafting, pruning, pollination techniques, fertilization, fruit ripening and pesticide applications. For example, knowing the female stage and, consequently, the duration of the stigmatic receptivity and the length of the effective pollination period is essential for a successful fruit set (Lora et al., 2011; Sanzol and Herrero, 2001). This is even more important in dichogamous species. Indeed, hand pollination is a common practice for *Annona cherimola* ("cherimoya") commercial production in countries with a mediterranean climate (Lora et al., 2011), and this should also be the case for "pawpaw" in those places with the absence of the proper pollinating vectors. Another example of the importance of understanding phenological stages for appropriate crop management is fertilization strategies. In Kentucky (USA), the recommendation is to increase fertilization during the active growth phase, which, in those conditions, takes place in May, June and July (Layne, 1996). However, the active growth phase can be different under other environmental conditions and, definitely, the months will be switched in countries of the Southern

Hemisphere. Furthermore, this work will not only help to increase the efficiency of “pawpaw” crop management practices, but it will provide basic and useful information for scientific studies in this crop under the current climate change scenario.

CRedit authorship contribution statement

C. Ferrer-Blanco: Methodology, Validation, Investigation, Writing – original draft, Writing – review & editing, Visualization. **J.I. Hormaza:** Conceptualization, Resources, Writing – original draft, Writing – review & editing, Supervision. **J. Lora:** Conceptualization, Resources, Writing – original draft, Writing – review & editing, Supervision.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

This work was supported by the Spanish ‘Ministerio de Ciencia e Innovación’ - European Regional Development Fund, European Union (PID2019-109566RB-100) and Junta de Andalucía (Proyecto de Excelencia P18-RT-3272). C. Ferrer-Blanco was supported by an FPI fellowship from Ministerio de Ciencia e Innovación (BES-2017-082558).

References

- Alali, F.Q., Liu, X.X., McLaughlin, J.L., 1999. Annonaceous acetogenins: recent progress. *J. Nat. Prod.* 62, 504–540. <https://doi.org/10.1021/np980406d>.
- Alcaraz, M.L., Thorp, T.G., Hormaza, J.I., 2013. Phenological growth stages of avocado (*Persea americana*) according to the BBCH scale. *Sci. Hortic.* 164, 434–439. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.09.051>.
- Archbold, D.D., Pomper, K.W., 2003. Ripening pawpaw fruit exhibit respiratory and ethylene climacterics. *Postharvest Biol. Technol.* 30, 99–103. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(03\)00135-2](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(03)00135-2).
- Berry, E., 1916. *The Lower Eocene floras of Southeastern North America*, 91. U.S. Geological Survey Professional Paper, pp. 1–481.
- Bleiholder, H., Van Den Boom, J., Langeldüdeke, P., Stauss, R., 1989. Einkeittliche codierung der phänologischen stadien bei kultur-und schadpflanzten. *Gesunde Pflanzen* 41 (11), 381–384.
- Brett, M., Callaway, D.J., 1992. Our native pawpaw: the next new commercial fruit? *Arnoldia* 52, 21–29.
- Callaway, M.Brett, 1993. Pawpaw (*Asimina triloba*): A “Tropical” Fruit for Temperate Climates. *New Crops*. Wiley, New York, pp. 505–515. Edited by J. Janick, J. E. Simon.
- Cautín, R., Agustí, M., 2005. Phenological growth stages of the cherimoya tree (*Annona cherimola* Mill.). *Sci. Hortic.* 105, 491–497. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2005.01.035>.
- Chase, M.W., Christenhusz, M.J.M., Fay, M.F., Byng, J.W., Judd, W.S., Soltis, D.E., Mabblerley, D.J., Sennikov, A.N., Soltis, P.S., Stevens, P.F., Briggs, B., Brockington, S., Chautems, A., Clark, J.C., Conran, J., Haston, E., Möller, M., Moore, M., Olmstead, R., Perret, M., Skog, L., Smith, J., Tank, D., Vorontsova, M., Weber, A., 2016. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Bot. J. Linn. Soc.* 181, 1–20. <https://doi.org/10.1111/boj.12385>.
- Couvreur, T.L.P., Helmstetter, A.J., Koenen, E.J.M., Bethune, K., Brandão, R.D., Little, S. A., Sauquet, H., Erkens, R.H.J., 2019. Phylogenomics of the major tropical plant family annonaceae using targeted enrichment of nuclear genes. *Front. Plant Sci.* 9 <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01941>.
- Duffrin, M.W., Pomper, K.W., 2006. Development of flavor descriptors for Pawpaw fruit puree: a step toward the establishment of a native tree fruit industry. *Fam. Consum. Sci. Res. J.* 35, 118–130. <https://doi.org/10.1177/1077727X06292931>.
- Endress, P.K., 2010. The evolution of floral biology in basal angiosperms. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 365, 411–421. <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0228>.
- Endress, P.K., Igersheim, A., 2011. Gynoecium structure and evolution in basal angiosperms. *Int. J. Plant Sci.* 161, S211–S213.
- Fadón, E., Herrero, M., Rodrigo, J., 2015. Flower development in sweet cherry framed in the BBCH scale. *Sci. Hortic.* 192, 141–147. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.05.027>.
- Fleckinger, J., 1948. Les stades végétatifs des arbres fruitiers en rapport avec les traitements. *Pomol. Franç.* 1, 81–93.
- Fox, S., 2012. Picking up the pawpaws: the rare woody plants of Ontario program at the University of Guelph Arboretum. *Arnoldia* 69 (3), 2–13.
- Hack, H., Bleiholder, H., Buhr, L., Meier, U., Schnock-Fricke, U., Weber, E., Witzemberger, A., 1992. Einheitliche codierung der phänologischen entwicklungsstadien mono-und dikotyler pflanzen-erweiterte BBCH-Skala. *Allgemein. Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutz* 44 (12), 265–270.
- Hackluyt, R., 1609. A Narrative of the Expedition of Hernando de Soto into Florida published At Evora in 1557. London.
- Hormaza, J.I., 2014. The Pawpaw, a Forgotten North American Fruit Tree. *Arnoldia* 72, 13–23.
- Janzen, D.H., Martin, P.S., 1982. Neotropical anachronisms: the fruits the gomphotheres ate. *Science* 215, 19–27. <https://doi.org/10.1126/science.215.4528.19>.
- Kottek, M., Grieser, J., Beck, C., Rudolf, B., Rubel, F., 2006. World map of the Köppen-Geiger climate classification updated. *Meteorol. Z.* 15, 259–263. <https://doi.org/10.1127/0941-2948/2006/0130>.
- Kral, R., 1960. A revision of *Asimina* and *Deeringothamnus* (Annonaceae). *Brittonia* 12, 233–278.
- Layne, D., 1996. The Pawpaw [*Asimina triloba* (L.) Dunal]: a New Fruit Crop for Kentucky and the United States. *HortScience* 31, 777–784.
- Liu, K., Li, H., Yuan, C., Huang, Y., Chen, Y., Liu, J., 2014. Identification of phenological growth stages of sugar apple (*Annona squamosa* L.) using the extended BBCH-scale. *Sci. Hortic.* 181, 76–80. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.10.046>.
- Lora, J., Herrero, M., Hormaza, J.I., 2011. Stigmatic receptivity in a dichogamous early-divergent angiosperm species, *Annona cherimola* (Annonaceae): influence of temperature and humidity. *Am. J. Bot.* 98 (2), 265–274. <https://doi.org/10.3732/ajb.1000185>.
- Losada, J.M., Hormaza, J.I., Lora, J., 2017. Pollen-pistil interaction in pawpaw (*Asimina triloba*), the northernmost species of the mainly tropical family annonaceae. *Am. J. Bot.* 104, 1891–1903. <https://doi.org/10.3732/ajb.1700319>.
- McGrath, M.J., Karahadian, C., 1994. Evaluation of Physical, Chemical, and Sensory Properties of Pawpaw Fruit (*Asimina triloba*) as Indicators of Ripeness. *J. Agric. Food Chem.* 42, 968–974. <https://doi.org/10.1021/jf00040a025>.
- Meier, U., Bleiholder, H., Buhr, L., Feller, C., Hack, H., Heß, M., Lancashire, P., Schnock, U., Stauß, R., Van Den Boom, T., 2009. The BBCH system to coding the phenological growth stages of plants—history and publications. *J. für Kult.* 61, 41–52. <https://doi.org/10.5073/JfK.2009.02.01>.
- Pomper, K.W., Layne, D.R., 2005. The North American Pawpaw: botany and horticulture. *Hortic. Rev. (Am. Soc. Hortic. Sci.)* 31.
- Peterson, R.N., 1991. Pawpaw (*Asimina*). *Acta Hort.* 290, 567–600.
- Pomper, K.W., Crabtree, S.B., Brown, S.P., Jones, S.C., Bonney, T.M., 2003. Assessment of genetic diversity of pawpaw (*Asimina triloba*) cultivars with intersimple sequence repeat markers. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 128 (4), 521–525. <https://doi.org/10.21273/JASHS.128.4.0521>.
- Pomper, K.W., Crabtree, S.B., Layne, D.R., Peterson, R.N., 2008. Flowering and fruiting characteristics of eight pawpaw [*Asimina triloba* (L.) Dunal] selections in Kentucky. *J. Am. Pomol. Soc.* 62, 89–97.
- Sanzol, J., Herrero, M., 2001. The “effective pollination period” in fruit trees. *Sci. Hortic.* 90, 1–17.
- Szilagyi, B.A., et al., 2016. Flowering of *Asimina triloba* (L.) Dunal in the conditions of Transylvania. *Muzeul Olteniei Craiova. Oltenia. Stud. și comunicări. Științele Nat.* 32, 50–54.
- Willson, M.F., Schemske, D.W., 1980. Pollinator limitation, fruit production, and floral display in Pawpaw (*Asimina triloba*). *Bull. Torrey Bot. Club* 107, 401. <https://doi.org/10.2307/2484160>.
- van Zonneveld, M., Larranaga, N., Blonder, B., Coradin, L., Hormaza, J.I., Hunter, D., 2018. Human diets drive range expansion of megafauna-dispersed fruit species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 115, 3326–3331. <https://doi.org/10.1073/pnas.1718045115>.
- Zadoks, J.C., Chang, T.T., Konzak, C.F., 1974. A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Res.* 14 (6), 415–421.