

CONTENIDO DE POLIAMINAS EN ANTERAS Y DURANTE LA GERMINACIÓN DE POLEN EN *Pyrus pyrifolia* Nakai

POLYAMINE CONTENT IN ANTHEERS AND DURING POLLEN GERMINATION IN *Pyrus pyrifolia* Nakai

Omar Franco-Mora^{1,2*} y Kenji Tanabe¹

¹Laboratory of Horticulture, Faculty of Agriculture, Tottori University, Koyama Minami 4-101; 680-8553 Tottori, Tottori, Japan. (ofm@uaemex.mx) (tanabe@muses.tottori-u.ac.jp). ²Dirección actual: Laboratorio de Genética, Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Fitomejoramiento, Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Autónoma del Estado de México, Campus El Cerrillo, 50200, Toluca, México.

RESUMEN

En dos ciclos de producción, 2003 y 2004, se determinó por la técnica de cromatografía líquida de alta resolución el contenido de poliaminas en anteras de pera japonesa (*Pyrus pyrifolia* Nakai), cvs. Niitaka, Housui y Choujuurou, 3, 2, 1 y 0 d antes de la antesis (DAA). En los tres cultivares el contenido de putrescina disminuyó de entre 9.8 y 11.2, a 4.2 y 5.6 $\mu\text{mol g}^{-1}$ biomasa húmeda, al pasar de 3 a 2 DAA. El contenido de espermidina fue superior ($p \leq 0.05$) en Housui y Choujuurou que en Niitaka a 3 DAA y al inicio de antesis (DIA), pero no a 2 y 1 DAA. Los contenidos de espermina fueron valores menores de 1 $\mu\text{mol g}^{-1}$ BH en Niitaka, mientras que en Housui y Choujuurou se duplicaron de 4 a 8 y 3 a 6 $\mu\text{mol g}^{-1}$ BH, de 3 DAA a DIA. La disminución de putrescina sugiere que hubo síntesis de espermidina y espermina en la maduración de las anteras productoras de polen. Durante la germinación de polen con los dos cvs. andrófertil, Housui y Choujuurou, incubados en medio líquido por 0, 0.5, 1.5, 3, 4, 6 y 8 h, se alcanzó una germinación aproximada de 90% en 4 h. En dicha germinación la putrescina decreció significativamente en los primeros 30 min y la espermidina hasta las 4 h, en ambos cultivares. En cambio, la espermina aumentó significativamente ($p \leq 0.05$) a los 30 min y a las 3 h, lo que sugiere su biosíntesis durante la germinación del polen.

Palabras clave: *Pyrus pyrifolia*, espermidina, espermina, germinación del polen, putrescina, tubo polínico.

INTRODUCCIÓN

Las poliaminas son productos naturales presentes, en forma libre y conjugada, en todas las células vegetales. Putrescina, espermidina y espermina son las principales poliaminas, por su relación con numerosos procesos celulares, como división celular, empaquetamiento de ácidos nucleicos, replicación de ADN, y otros (Galston y Kaur-Sawhney,

* Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: Octubre, 2007. Aprobado: Junio, 2008

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 42: 529-536. 2008.

ABSTRACT

In two production cycles, 2003 and 2004, the polyamine content in anthers of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai), cvs. Niitaka, Housui and Choujuurou, was determined through the technique of high performance liquid chromatography, 3, 2, 1 and 0 d before anthesis (DBA). In the three cultivars, the putrescine content decreased from between 9.8 and 11.2, to 4.2 and 5.6 $\mu\text{mol g}^{-1}$ humid biomass (HB), when passing from 3 to 2 DBA. The spermidine content was higher ($p \leq 0.05$) in Housui and Choujuurou than in Niitaka at 3 DBA and at day of onset of anthesis (DOA), but not at 2 and 1 DBA. The spermidine contents values were lower than 1 $\mu\text{mol g}^{-1}$ HB in Niitaka, whereas in Housui and Choujuurou they doubled from 4 to 8 and 3 to 6 $\mu\text{mol g}^{-1}$ HB, from 3 DBA to DOA. The reduction in putrescine suggests that there was synthesis of spermidine and spermine in the maturation of the pollen producing anthers. During the germination of pollen in both androfertile cvs., Housui and Choujuurou, at 0, 0.5, 1.5, 2, 3, 4, 6 and 8 h, an approximate germination of 90% was reached in 4 h. In this germination, putrescine decreased significantly ($p \leq 0.05$) in the first 30 min and the spermidine in 4 h, in both cultivars. In contrast, the spermine increased significantly at 30 min and at 3 h, which suggests its biosynthesis during the germination of the pollen.

Key words: *Pyrus pyrifolia*, spermidine, spermine, germination of pollen, putrescine, pollen tube.

INTRODUCTION

The polyamines are natural products present in both free and conjugated form, in all plant cells. Putrescine, spermidine and spermine are the principal polyamines, due to their relationship with numerous cell processes, such as cell division, packing of nucleic acids, replication of DNA, and others (Galston and Kaur-Sawhney, 1995; Childs *et al.*, 2003). Plant cells seem to have developed mechanisms for regulating the intracellular levels of polyamines, as insufficient levels cause low growth rates and in some

1995; Childs *et al.*, 2003). Las células vegetales parecen haber desarrollado mecanismos para regular los niveles intracelulares de poliaminas, ya que niveles insuficientes provocan bajas tasas de crecimiento y en algunos casos la muerte celular; además, niveles altos de poliaminas pueden promover transformación celular y, en ocasiones, generan apoptosis (Childs *et al.*, 2003). La biosíntesis de poliaminas en vegetales se inicia con la agmatina o la ornitina, hasta la formación de putrescina, seguida de espermidina, y finalmente de espermina (Bagni y Tassoni, 2001).

En especies frutales, las poliaminas se han relacionado con procesos de la fructificación; como polinización, fecundación y desarrollo precosecha y postcosecha del fruto (Del Duca *et al.*, 1997; Franco-Mora *et al.*, 2005a). Se ha propuesto que la biosíntesis de poliaminas es necesaria para la maduración del polen y el crecimiento del tubo polínico en tabaco (*Nicotiana tabacum*) y tomate (*Solanum lycopersicum*, antes *Lycopersicon esculentum*) (Chibi *et al.*, 1993; Chibi *et al.*, 1994; Song *et al.*, 2001). En el mutante de tomate "sin-estambres-2" las cantidades altas de poliamina, en comparación con los contenidos normales, se han asociado con la expresión de esterilidad masculina (Biasi *et al.*, 2001). En kiwi (*Actinidia deliciosa*), se ha asociado un contenido alto de poliaminas con la degeneración del polen en flores femeninas y la división celular de óvulos; la espermidina se ha propuesto como un marcador bioquímico adecuado para estudios de diferenciación sexual en flores (Biasi *et al.*, 2001).

En pera japonesa Housui (*Pyrus pyrifolia* Nakai) se determinó que el contenido de poliaminas en estilos polinizados varía con la fuente de polen, compatible o auto-incompatible (Franco-Mora *et al.*, 2005b). Cultivares como Niitaka y Kumoi no desarrollan polen o éste es estéril (Kajiura y Sato, 1990; Masseron *et al.*, 1992). Debido a que cantidades anormales pueden estar relacionados con la esterilidad masculina en vegetales (Rastogi y Sawhney, 1990), en este trabajo se determinó el contenido de poliaminas en anteras próximas a apertura floral de tres cultivares de pera japonesa: dos con producción normal de polen y uno con escasa presencia. La hipótesis fue que la cantidad de poliaminas en las anteras de Niitaka sería estadísticamente diferente al de Housui y Choujuurou. Además, se determinó el contenido de poliaminas durante la germinación del polen para observar su cinética durante este proceso.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se emplearon árboles de tres cultivares del Huerto Otsuka de la Universidad de Tottori, Tottori, Japón; esta prefectura produce más

cases cell death; besides, high levels of polyamines can promote cell transformation, and occasionally, generate apoptosis (Childs *et al.*, 2003). The biosynthesis of polyamines in plants begins with agmatine or ornithine, to the formation of putrescine, followed by spermidine and finally of spermine (Bagni and Tassoni, 2001).

In fruit species, the polyamines have been related to fructification processes such as pollination, fecundation and preharvest and postharvest development of the fruit (Del Duca *et al.*, 1997; Franco-Mora *et al.*, 2005a). It has been proposed that the biosynthesis of polyamines is necessary for the maturation of the pollen and the growth of the pollen tube in tobacco (*Nicotiana tabacum*) and tomato (*Solanum lycopersicum*, previously *Lycopersicon esculentum*) (Chibi *et al.*, 1993; Chibi *et al.*, 1994; Song *et al.*, 2001). In the tomato mutant "stamenless-2" the high amounts of polyamine, with respect to the normal contents, have been associated with the expression of masculine sterility (Biasi *et al.*, 2001). In kiwi (*Actinidia deliciosa*), a high content of polyamines has been associated with the degeneration of the pollen in female flowers and the cellular division of ovules; spermidine has been proposed as a biochemical marker adequate for studies of sexual differentiation in flowers (Biasi *et al.*, 2001).

In Japanese pear Housui (*Pyrus pyrifolia* Nakai) it was determined that the content of polyamines in pollinated styles varies with the source of pollen, compatible or auto-incompatible (Franco-Mora *et al.*, 2005b). Cultivars such as Niitaka and Kumoi do not develop pollen, or if they do, it is sterile (Kajiura and Sato, 1990; Masseron *et al.*, 1992). Because abnormal amounts may be related to masculine sterility in plants (Rastogi and Sawhney, 1990), in the present work the polyamine content was determined in anthers close to floral anthesis of three cultivars of Japanese pear: two with normal production of pollen and one with scant presence. The hypothesis was that the amount of polyamines in the anthers of Niitaka would be statistically different from that of Housui and Choujuurou. In addition, the polyamine content was determined during the germination of the pollen, in order to observe its kinetic during this process.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Trees of three cultivars of the Otsuka orchard of the University of Tottori, Tottori, Japan were used; this prefecture produces over 50% of the Japanese pear in that country, and is located between 133° 56' 56" and 134° 26' 37" E and 35° 34' 11" and 35° 16' 6" N. The trees of the cv. Niitaka were 10 years of age, and were found in

de 50% de la pera japonesa en ese país, y se localiza entre 133° 56' 56" y 134° 26' 37" E y 35° 34' 11" y 35° 16' 6" N. Los árboles del cv. Niitaka tenían 10 años de edad, y se encontraban en un sistema de conducción de pérgola; los árboles del cv. Housui tenían 24 años y son manejados en pérgola, mientras que los de Choujuurou tenían 24 años y su sistema de conducción es en líder central. Los árboles de Niitaka y Housui están establecidos en líneas de 12 y se usó tres árboles centrales de cada línea como una repetición. Choujuurou es usado tradicionalmente como donador de polen para los cultivares que actualmente se comercializan en el mercado japonés, como Niitaka y Housui (Franco-Mora *et al.*, 2005b). Sus árboles están establecidos en los bordos del huerto y de él se usaron dos árboles contiguos por repetición. Durante dos ciclos de cultivo (2003 y 2004) se hicieron muestreos en los mismos árboles en los primeros días de abril, cuya temperatura media es 16.9 °C, máxima 21.7 °C y mínima 12.7 °C, con una humedad relativa de 72% (Masseron *et al.*, 1992). Todos muestreos se realizaron a las 7 h.

Cuantificación de poliaminas en anteras

Durante 3 d antes de antesis (DAA) y hasta el día de inicio de antesis (DIA) se recolectaron flores en el mismo estadio de apertura, en cinco repeticiones por cultivar y por día, y se transportaron durante 10 min a 4 °C al laboratorio. Una vez separadas las anteras de los otros componentes, se pesó 0.1 g de ellas y se agregó 1 mL de ácido perclórico 5% (v/v, en agua destilada) que contenía 1,6-hexanediamina a 5 μmol como estándar interno. Del tejido macerado se extrajeron poliaminas por 1 h a 4 °C. Después de centrifugar las muestras a 4 °C por 15 min a 10000 g, se obtuvo el sobrenadante y se almacenó a -20 °C (Smith y Davies, 1985; Franco-Mora *et al.*, 2005b).

El análisis de poliaminas se hizo con el método de dansilación (Smith y Davies, 1985): 100 μL del extracto con las poliaminas libres se mezclaron con 200 μL de solución saturada de carbonato de sodio y 400 μL de solución de cloruro de dansilo (Sigma) (7.5 mg mL⁻¹ acetona). Después de agitar por 30 s con un vórtex, la solución se incubó a 60 °C en oscuridad por 1 h. El exceso de la solución de cloruro de dansilo se removió con 100 μL de una solución de prolina (100 mg mL⁻¹ agua destilada) que se agregó a la mezcla y se incubó 30 min más. Las poliaminas fueron extraídas con 1 mL de tolueno, con agitación vigorosa conseguida con un vórtex por 30 s. La fase orgánica se secó al vacío y se disolvió en 1 mL de metanol grado reactivo para cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Una vez filtrados, los derivados fueron analizados en un sistema HPLC (Hitachi Modelo 655A-12, Tokio) con una columna de sílica ODS-3056 (diámetro de partícula 5 μm , 4×250 mm). Las muestras fueron eluidas con metanol a un flujo de 1 mL min⁻¹, cambiando la concentración de metanol de 60 a 95% en 23 min. Se usó un detector de fluorescencia (Hitachi, Modelo F-1050), con excitación a una longitud de onda de 360 nm y emisión a 510 nm. Antes del análisis de muestras se prepararon curvas patrón con clorhidrato de putrescina (99% pureza), triclóridrato de espermidina (98% pureza) y tetrahidroclorhidrato de espermina (95% pureza). Los resultados se presentan en $\mu\text{mol g}^{-1}$ biomasa húmeda (BH). Todos los reactivos

a pérgola conduction system; the trees of the cv. Housui were 24 years old and are managed in pérgola, while those of Choujuurou were 24 years old and their conduction system is with central leader. The trees of Niitaka and Housui are established in rows of 12 and three central trees of each row were used as replicate. Choujuurou is employed traditionally as pollen donor for the cultivars that are commercialized in the Japanese market, such as Niitaka and Housui (Franco-Mora *et al.*, 2005b). Their trees are established at the edges of the orchard, from which two adjacent trees were used as a replicate. During two crop cycles (2003 and 2004), the samplings were made in the same trees on the first days of April, whose mean temperature is 16.9 °C, maximum 21.7 °C and minimum 12.7 °C, with a relative humidity of 72% (Masseron *et al.*, 1992). All the samplings were carried out at 7 h.

Quantification of polyamines in anthers

During 3 d before anthesis (DBA), and until the day of the onset of anthesis (DOA), flowers were collected in the same state of aperture, in five replicates per cultivar and per day, and were transported during 10 min at 4 °C to the laboratory. Once the anthers were separated from the other components, 0.1 g of them were weighed and 1 mL of perchloric acid at 5% (v/v, in distilled water), which contained 1,6-hexanediamine a 5 μmol as internal standard, was added. From the macerated tissue polyamines were extracted for 1 h at 4 °C. After centrifuging the samples at 4 °C for 15 min to 10000 g, the supernatant was obtained, and then stored at -20 °C (Smith and Davies, 1985; Franco-Mora *et al.*, 2005b).

The analysis of polyamines was made with the dansylation method (Smith and Davies, 1985): 100 μL of the extract with the free polyamines were mixed with 200 μL of saturated solution of sodium carbonate and 400 μL of dansyl chloride solution (Sigma) (7.5 mg mL⁻¹ acetone). After agitation for 30 s with a vortex, the solution was incubated at 60 °C in darkness for 1 h. The excess of the dansyl chloride solution was removed with 100 μL of a proline solution (100 mg mL⁻¹ of distilled water) which was added to the mixture, which was incubated for an additional 30 min. The polyamines were extracted with 1 mL of toluene, with vigorous agitation achieved with a vortex for 30 s. The organic phase was vacuum dried and was dissolved in 1 mL of reactive grade methanol for high performance liquid chromatography (HPLC).

Once filtered, the derivatives were analyzed in an HPLC system (Hitachi Model 655A-12, Tokio) with a silica column ODS-3056 (particle diameter 5 μm , 4×250 mm). The samples were eluted with methanol at a flow of 1 mL min⁻¹, changing the methanol concentration from 60 to 95% in 23 min. A fluorescence detector (Hitachi, Model F-1050), with excitation at a wave length of 360 nm and emission at 510 nm, was utilized.

Prior to the analysis of samples, pattern curves were prepared with putrescine chlorohydrate (99% purity), trichloridrate of spermidine (98% purity) and tetrahydrochlorohydrate of spermine (95% purity). The results are presented in $\mu\text{mol g}^{-1}$ fresh weight (BH). All of the reactivos were obtained from Wako (Osaka, Japan), except when another supplier is indicated.

se obtuvieron de Wako (Osaka, Japón), excepto cuando se indica otro proveedor.

Análisis estadístico

Los datos se analizaron conforme a un diseño estadístico completamente al azar con dos factores: 3 cultivares (Niitaka, Choujuurou y Housui) y 4 días a apertura floral. Así, hubo 12 tratamientos, cada uno con cinco repeticiones. Para los cvs. Niitaka y Housui hubo 3 árboles por unidad experimental, y 2 para Choujuurou. Cuando los valores de F fueron significativos, las medias se compararon con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

Cuantificación de poliaminas durante la germinación del polen

Para la germinación del polen se emplearon tres repeticiones por tiempo de incubación (0, 0.5, 1.5, 2, 3, 4, 6 y 8 h) para los cvs. Housui y Choujuurou; las anteras del cv. Niitaka tuvieron escasa producción de polen, por lo cual no fue posible incluirlo en el análisis de germinación de polen. El polen se obtuvo de anteras que se abrieron después de incubarse en el laboratorio a 20 °C con luz blanca proveniente de focos de 20 W durante 8 h; y se almacenó a -20 °C en frascos de vidrio con cápsulas de NaOH. Después, la germinación del polen se hizo en el medio líquido propuesto por Shivana y Heslop-Harrison (1981): H_3BO_3 , $Ca(NO_3)_2$, $MgCl_2$ y KNO_3 , todos a 10^{-3} M, más 10% (p/v) de sacarosa. En 1 mL de la solución se colocó 0.005 g de polen, se agitó por 20 s en un vortex, y se incubó a 24 °C en oscuridad. Para cada tiempo de incubación (0, 0.5, 1.5, 2, 3, 4, 6 y 8 h), se emplearon tres tubos por repetición. Al final de la incubación la solución del medio con el polen se centrifugó por 20 min a 10000 g para separar los componentes. La fase sólida, que contenía los granos de polen, se usó para determinar el contenido de poliaminas con el método de dansilación indicado.

El porcentaje de germinación del polen se determinó en una alícuota de una muestra de polen con medio. La solución se distribuyó en un portaobjeto y se tiñó con cinco gotas de ácido fucsínico a 1% (p:v, en agua destilada). Luego, los granos de polen germinados se contaron bajo un microscopio óptico. Un grano de polen germinado fue el que presentó un tubo polínico con longitud mayor que el diámetro del grano. En tres repeticiones se hicieron tres conteos con un mínimo de 100 granos de polen en cada una, para cada tratamiento y tiempo de incubación.

El diseño experimental fue de bloques completos al azar con dos factores: 2 cultivares y 8 tiempos de incubación. Se hizo un análisis de varianza, y cuando el valor de F fue significativo se usó la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) para comparar los contenidos de poliaminas en relación con los tiempos de incubación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Contenido de poliaminas en anteras

En los tres cultivares se observó un descenso significativo ($p \leq 0.05$) del contenido de putrescina de 3

Statistical analysis

The data were analyzed according to a completely randomized statistical design with two factors: three cultivars (Niitaka, Choujuurou and Housui), and 4 d to floral aperture. Thus, there were 12 treatments with five replicates each. For cvs. Niitaka and Housui there were 3 trees for each experimental unit, and 2 for Choujuurou. When the values of F were significant, a comparison of means was made with the Tukey test ($p \leq 0.05$).

Quantification of polyamines during the germination of the pollen

For the germination of the pollen, three replicates were employed per incubation time (0, 0.5, 1.5, 2, 3, 4, 6 and 8 h) for cvs. Housui and Choujuurou; the anthers of the cv. Niitaka had scant pollen production, thus it was not possible to include it in the analysis of pollen germination. The pollen was obtained from anthers that opened after being incubated in the laboratory at 20 °C under white light from 20 W bulbs during 8 h; and was stored at -20 °C in glass jars with capsules of NaOH. Afterwards, the germination of the pollen was made in the liquid medium proposed by Shivana and Heslop-Harrison (1981): H_3BO_3 , $Ca(NO_3)_2$, $MgCl_2$ and KNO_3 , all at 10^{-3} M, plus 10% (w/v) of saccharose. In 1 mL of the solution, 0.005 g of pollen was placed, then agitated for 20 s in a vortex, and incubated at 24 °C under darkness. For each incubation time (0, 0.5, 1.5, 2, 3, 4, 6 and 8 h), three tubes were employed per replicate. At the end of the incubation, the solution of the medium with the pollen was centrifuged for 20 min at 10000 g to separate the components. The solid phase, which contained the pollen grains, was used to determine the content of polyamines with the previously indicated dansylation method.

The percentage of pollen germination was determined in one aliquot of a pollen sample with medium. The solution was distributed on a slide and was stained with five drops of fuchsinic acid at 1% (w:v, in distilled water). Then, the germinated pollen grains were counted under an optical microscope. A germinated pollen grain was that which presented a pollen tube with a length greater than the diameter of the grain. In three replicates three counts were made with a minimum of 100 grains of pollen in each one, for each treatment and incubation time.

The experimental design was complete randomized blocks with two factors: 2 cultivars and 8 times of incubation. An analysis of variance was performed and when the value of F was significant, the Tukey test was used ($p \leq 0.05$) to compare the contents of polyamines in relation to the incubation times.

RESULTS AND DISCUSSION

Content of polyamines in anthers

In the three cultivars a significant ($p \leq 0.05$) decrease was observed of the putrescine content from 3 to 2 DBA; afterwards there was no statistical variation,

a 2 DAA; luego no hubo variación estadística, con excepción de Niitaka que descendió de 2 a 1 DAA (Figura 1). La espermidina decreció de 3 a 2 DAA en los cvs. Housui y Choujuurou pero no en Niitaka; después, la espermidina aumentó significativamente de 2 a 1 DAA, luego decreció en Niitaka y Housui, mientras que en Choujuurou aumentó (Figura 1). Entre cultivares varió el contenido de espermina: en Housui y Choujuurou, ambos con producción normal de polen, aumentó de 4 y 3 a $8 \mu\text{mol g}^{-1}$ BH, desde 3 DAA hasta DIA, pero en el cv. Niitaka permaneció estable en $1 \mu\text{mol g}^{-1}$ BH (Figura 1).

En mutantes de tomate se encontró relación entre contenidos altos de putrescina, espermidina y espermina en formas libres y la esterilidad masculina (Rastogi y Sawhney, 1990). Pero en la presente investigación en anteras sin producción de polen, (Niitaka), el contenido de espermina fue significativamente menor que en anteras productoras de polen. Según Chibi *et al.* (1994), durante el desarrollo de las anteras de tabaco la putrescina se convierte en espermidina y luego en espermina (Bagni y Tassoni, 2001), ya que el contenido de ésta aumentó cuando el de putrescina disminuyó. Los resultados del presente estudio sugieren que la biosíntesis de espermina ocurrió únicamente en los cultivares con producción de polen mientras que en Niitaka disminuyó el contenido de putrescina, posiblemente porque esta poliamina sólo se transformó en espermidina (Bagni y Tassoni, 2001), pero sin evolucionar hasta espermina.

Contenido de poliaminas durante la germinación del polen

Los dos cultivares evaluados en esta fase, Choujuurou y Housui, mostraron contenidos estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$) de putrescina, espermidina y espermina en diferentes tiempos de incubación del polen (datos no mostrados); sin embargo, el patrón de evolución de poliaminas fue similar en ambos cultivares. Putrescina decreció rápidamente a 30 min de iniciado el proceso, mientras que espermidina decreció significativamente hasta las 4 h y en espermina hubo un incremento tanto a los 30 min como a las 3 h (Figura 2). El porcentaje de germinación del polen no fue diferente ($p \leq 0.05$) para ambos cultivares, lo cual parece indicar que los patrones de poliaminas observados, a pesar de ser estadísticamente diferentes en cuanto a contenidos (datos no mostrados), son similares en cuanto a cinética y sugieren una biosíntesis inicial de espermina, factor indispensable para la germinación de polen en especies como tomate (Song *et al.*, 2001).

Contrario a lo aquí reportado, Chibi *et al.* (1994) observaron un incremento en el contenido de putrescina,

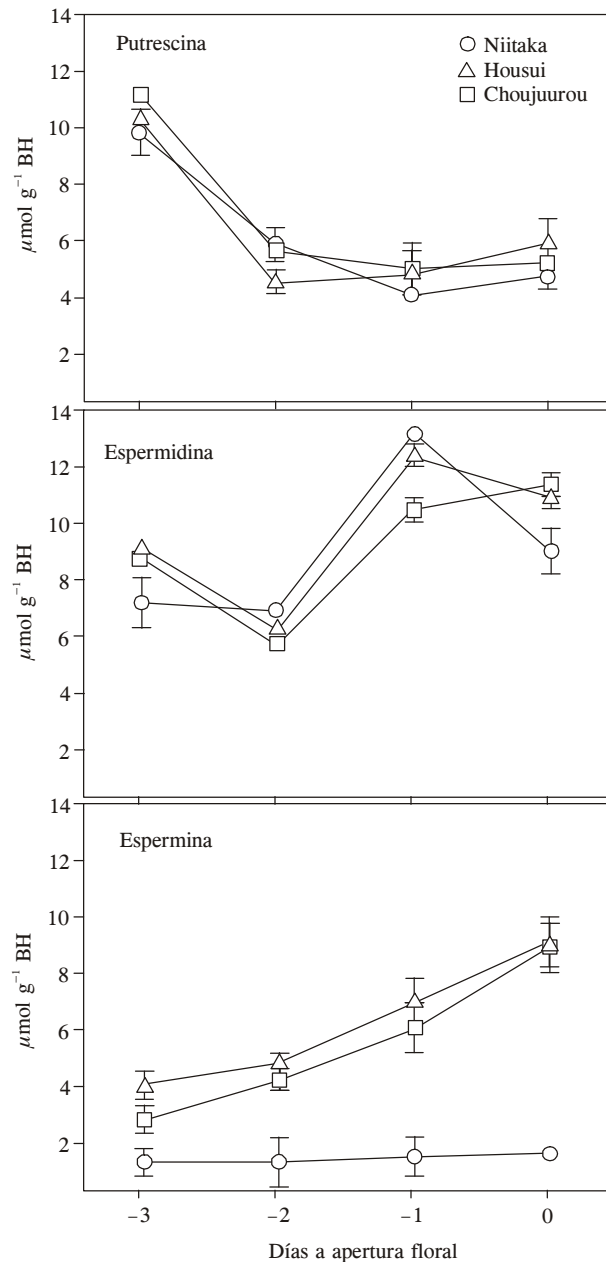


Figura 1. Cinética de los contenidos de las poliaminas libres en anteras de tres cultivares de pera japonesa, desde 3 días antes de apertura floral hasta apertura floral. Los datos son las medias \pm EE de cinco repeticiones.
Figure 1. Kinetic of the contents of the free polyamines in anthers of three cultivars of Japanese pear, from 3 days prior to floral aperture until floral aperture. The data are the means \pm SE of five replicates.

except for Niitaka which decreased from 2 to 1 DBA (Figure 1). The spermidine decreased from 3 to 2 DBA in the cvs. Housui and Choujuurou, but not in Niitaka; later, the spermidine increased significantly from 2 to 1 DBA, then decreasing in Niitaka and Housui, while it increased in Choujuurou (Figure 1). Among cultivars

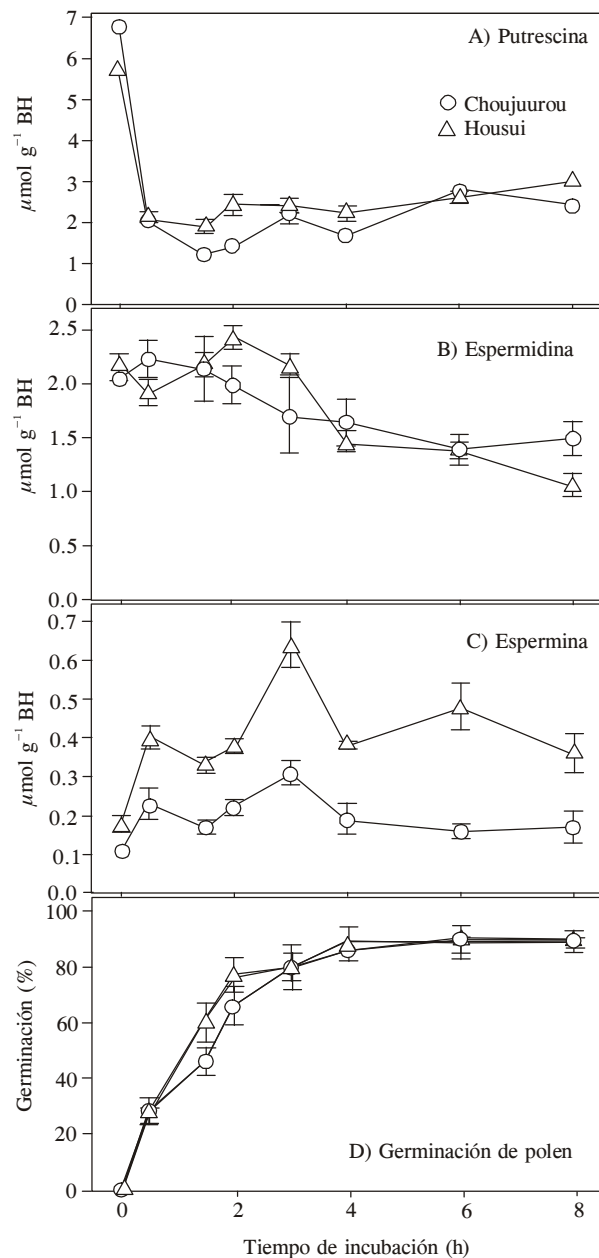


Figura 2. Contenido de poliaminas libres (A,B,C) durante la germinación *in vitro* de polen (D) de dos cultivares de pera japonesa. Los datos son las medias \pm EE de tres repeticiones.

Figure 2. Content of free polyamines (A,B,C) during the germination *in vitro* of pollen (D) of two cultivars of Japanese pear. The data are the means \pm SE of three replicates.

espermidina y espermina 60 min después del inicio de la germinación de polen de tabaco; pero son similares a los resultados de Bagni *et al.* (1981), quienes observaron una reducción de putrescina durante la germinación de polen de manzano (*Malus domestica* Borkh.) en medio líquido, reducción que atribuyeron a

there was a change in the content of spermine: in Housui and Choujuurou, both with normal production of pollen, increased from 4 and 3, to 8 $\mu\text{m g}^{-1}$ BH, from 3 DBA until DOA, but in cv. Niitaka remained stable at 1 $\mu\text{m g}^{-1}$ BH (Figure 1).

In mutants of tomato a relationship was found between high contents of putrescine, spermidine and spermine in free forms and male sterility (Rastogi and Sawhney, 1990). But, in the present research it was observed that in anthers without production of pollen (Niitaka), the spermine content was significantly lower than in anthers producing pollen. According to Chibi *et al.* (1994), during the development of the anthers of tobacco, the putrescine converts into spermidine and then into spermine (Bagni and Tassoni, 2001), given that the content of spermine increased when that of putrescine decreased. The results of the present study suggest that the biosynthesis of spermine occurred only in the cultivars with pollen production, whereas in Niitaka the putrescine content was decreased, possibly because this polyamine only was transformed into spermidine (Bagni and Tassoni, 2001), but without evolving into spermine.

Content of polyamines during the germination of the pollen

Both cultivars evaluated in this phase, Choujuurou and Housui, showed statistically different ($p \leq 0.05$) contents of putrescine, spermidine and spermine in different incubation times of the pollen (data not shown); however, the evolution pattern of the polyamines was similar in both crops. Putrescine decreased rapidly to 30 min from the start of the process, whereas spermidine decreased significantly to 4 h, and in spermine there was an increase both at 30 min and at 3 h (Figure 2). The percentage of pollen germination was not statistically different ($p \leq 0.05$) for both cultivars, which seems to indicate that the patterns of polyamines observed, despite being statistically different with respect to content (data not shown), are similar with respect to kinetic and suggest an initial biosynthesis of spermine, a factor which is indispensable for the germination of pollen in species such as tomato (Song *et al.*, 2001).

Contrary to the present report, Chibi *et al.* (1994) observed an increase in the content of putrescine, spermidine and spermine 60 min after the start of the germination of tobacco pollen; but it is similar to the results of Bagni *et al.* (1981), who observed a reduction of putrescine during the germination of apple pollen (*Malus domestica* Borkh.) in liquid medium, a reduction which they attributed to a secretion mechanism of this polyamine. To this respect, Del Duca *et al.* (1997) suggested that in addition to the probable dilution in

un mecanismo de secreción de esta poliamina. Al respecto, Del Duca *et al.* (1997) sugirieron que además de la probable dilución en el medio, la putrescina podría ligarse a proteínas de peso alto y salir del reservorio de poliaminas.

Por tanto, la disminución en el contenido de putrescina observada en este trabajo podría ser explicada por dos mecanismos. Uno es la biosíntesis de espermina desde la putrescina, con la espermidina como producto intermedio (Bagni y Tassoni, 2001). El otro sería la secreción de putrescina al medio, lo que explicaría su disminución en el polen (Bagni *et al.*, 1981).

Según Song *et al.* (2001, 2002), la biosíntesis de espermidina y espermina es necesaria para la germinación del polen de tomate. Parece ser, entonces, que el incremento en el contenido de espermina en el polen durante su germinación en los cvs. Housui y Choujuuroou está relacionada con su germinación normal. Estos resultados sugieren que la biosíntesis de espermina está presente durante la germinación del polen en pera japonesa.

CONCLUSIONES

El incremento del contenido de espermina durante el desarrollo de anteras con polen fértil y la germinación del grano de polen, sugiere, además de su biosíntesis, que este biorregulador vegetal tiene algunas funciones en el proceso de fructificación. Por el contrario, las anteras no funcionales siempre presentaron niveles bajos de espermina, pero no así de espermidina y putrescina. Durante los primeros 30 min de germinación *in vitro* del polen fértil, además del incremento de espermina, la putrescina disminuyó y la espermidina decreció o aumentó, según el cultivar.

LITERATURA CITADA

Bagni, N., and A. Tassoni. 2001. Biosynthesis, oxidation and conjugation of aliphatic polyamines in higher plants. *Amino acids* 20: 301-317.

Bagni, N., P. Adamo, D. Serafini-Fracassini, and V. R. Villanueva. 1981. RNA, proteins and polyamines during tube growth in germinating apple pollen. *Plant Physiol.* 68: 727-730.

Biasi, R., G. Falasca, A. Speranza, A. D. Stradis, V. Scoccianti, M. Franceschetti, N. Bagni, and M. M. Altamura. 2001. Biochemical and ultrastructural features related to male sterility in the dioecious species *Actinidia deliciosa*. *Plant Physiol. Biochem.* 39: 395-406.

Chibi, F., T. Angosto, D. Garrido, and A. Matilla. 1993. Requirement of polyamines for *in-vitro* maturation of the mid-binucleate pollen of *Nicotiana tabacum*. *J. Plant Physiol.* 142: 452-456.

Chibi, F., A. J. Matilla, T. Angosto, and D. Garrido. 1994. Changes in polyamine synthesis during anther development and pollen germination in tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Physiol. Plant.* 92: 61-68.

Childs, A. C., D. J. Metha, and E. W. Gerner. 2003. Polyamine-dependent gene expression. *Cell Mol. Life Sci.* 60: 1394-1406.

the medium, the putrescine could be linked to high weight proteins and could leave the pool of polyamines.

Therefore, the reduction in the content of putrescine observed in the present study could be explained by two mechanisms. One is the biosynthesis of spermine from the putrescine with the spermidine as an intermediate product (Bagni and Tassoni, 2001). The other would be the secretion of putrescine into the medium, which would explain its reduction in the pollen (Bagni *et al.*, 1981).

According to Song *et al.* (2001, 2002), the biosynthesis of spermidine and spermine is necessary for the germination of tomato pollen. It appears then, that the increase in the content of spermine in the pollen during its germination in the cvs. Housui and Choujuuroou is related to its normal germination. These results suggest that the biosynthesis of spermine is present during the germination of the pollen in Japanese pear.

CONCLUSIONS

The increase in the spermine content during the development of anthers with fertile pollen and the germination of the pollen grain, suggests that, along with its biosynthesis, this plant bioregulator has some functions in the fructification process. On the contrary, the non-functional anthers always presented low levels of spermine, but not of spermidine and putrescine. During the first 30 min of germination *in vitro* of the fertile pollen, in addition to the increase of spermine, the putrescine decreased and the spermidine decreased or increased, according to the cultivar.

End of the English version—



Del Duca, S., A. M. Bregoli, C. Berganini, and D. Serafini-Fracassini. 1997. Transglutaminase-catalyzed modification of cytoskeletal proteins by polyamines during germination of *Malus domestica* pollen. *Sex. Plant. Reprod.* 10: 89-95.

Franco-Mora, O., K. Tanabe, A. Itai, F. Tamura, and H. Itamura. 2005a. Relationship between endogenous free polyamine content and ethylene evolution during fruit growth and ripening of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai). *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 74: 221-227.

Franco-Mora, O., K. Tanabe, F. Tamura, and A. Itai. 2005b. Effects of putrescine application on fruit set in Housui Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai). *Sci. Hort.* 104: 265-273.

Galston, A. W., and R. Kaur-Sawhney. 1995. Polyamines as endogenous growth regulators. In: Davies P. J. (ed). *Plant Hormones. Physiology, Biochemistry and Molecular Biology.* Kluwer. Dordrecht, Germany. pp: 158-178.

Kajiura, I., and Y. Sato. 1990. Recent progress in Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) breeding, and descriptions of cultivars based on literature review (in Japanese). *Bul. Fruit Res. Stn. Extra* 1. 329 p.

- Masseron, A., B. Thibault, C. Decoene, C. Hilaire, y E. Dalle. 1992. El Nashi. La Pera Japonesa. Mateo, B. J. M. (trad.). Mundi-Prensa, Madrid. 132 p.
- Rastogi, R., and V. K. Sawhney. 1990. Polyamines and flower development in the male sterile stamenless-2 mutant of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) I. Level of polyamines and their biosynthesis in normal and mutant flowers. *Plant Physiol.* 93: 439-445.
- Shivanna, K. R., and J. Heslop-Harrison. 1981. Membrane state and pollen viability. *Ann. Bot.* 47: 759-770.
- Smith, M. A. and P. J. Davies. 1985. Separation and quantification of polyamines in plant tissue by high performance liquid chromatography of their dansyl derivatives. *Plant Physiol.* 78: 89-91.
- Song, J., K. Nada, and S. Tachibana. 2001. The early increase of S-adenosylmethionine decarboxylase activity is essential for the normal germination and tube growth in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) pollen. *Plant Sci.* 161: 507-515.
- Song, J., K. Nada, and S. Tachibana. 2002. Suppression of S-adenosylmethionine decarboxylase activity is a major cause for high-temperature inhibition of pollen germination and tube growth in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Plant Cell Physiol.* 43: 619-627.