

建立'愛文'芒果花粉體外發芽的新配方與篩選防治炭疽病的 低毒性農藥

居正中*、許仁宏**

摘要

本研究的目的是在建立'愛文'芒果體外花粉發芽的新方法與篩選低毒性防治芒果炭疽病的農藥。結果顯示培養基中添加聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)對'愛文'芒果花粉體外發芽具有極大的幫助，培養基配方以15 % sucrose、150 ppm boric acid、200 ppm calcium sulfate、100 ppm magnesium sulfate、100 ppm potassium nitrate、25 % PEG最好，發芽率可達80 %以上。以14種防治芒果炭疽病的農藥混合在'愛文'芒果體外花粉發芽的培養基中，發現50 % 撲克拉錳167 ppm與43 % 嘉賜貝芬1000 ppm對芒果花粉體外發芽不具毒性，花粉發芽率與對照相同。而31.6 % 貝芬撲克拉333 ppm則稍具毒性，發芽率僅為對照的88 %。80 % 免得爛2000 ppm、50 % 三氟敏250 ppm、62.5 % 賽普護汰寧500 ppm、50 % 克收欣500 ppm、23 % 亞托敏500 ppm、24.9 % 待克利667 ppm、53 % 腐絕快得寧833 ppm、42 % 腓硫醯833 ppm、80 % 鋅錳乃浦2500 ppm、62.25 % 鋅錳邁克尼1667 ppm與70 % 甲基鋅乃浦2500 ppm對'愛文'芒果體外花粉發芽都具高毒性，發芽率只有0 ~ 15 %。

關鍵字：芒果、花粉發芽、農藥;

*研究助理，美和科技大學生物科技系

**教授，美和科技大學生物科技系(通訊作者)

前言

影響影響芒果著果的因素很多，包含遺傳、環境、栽培管理的方法與授粉昆蟲的有無等。正常的芒果花穗雖然有幾百到幾千朵花，但是著果數目卻只有個位數，有時候甚至完全沒有著果。台灣芒果的正常花期在冬季，因為氣溫較低，整株芒果的開花期往往持續 1~2 個月以上，因此無法避免對炭疽病、白粉病、黑斑病與葉蟬等病蟲害的防治。Abbott 等人(1991)發現殺菌劑對甜瓜花粉發芽與花粉管生長具有毒害作用。Köpcke 等人(2002)發現除了殺菌劑以外，展著劑與 EDTA 對蘋果花粉發芽都有毒害作用。Yi 等人(2003a, b, c)在進行一系列的研究後，發現農藥不但對巴旦杏的花粉發芽有負面的影響，對花柱表面，甚至花粉管體內的生長都具有毒害作用。因此，調查目前推薦農藥對花粉發芽和授粉授精的影響，篩選出對芒果授粉與著果較不具毒性的農藥有其重要性。本試驗調查目前植物保護手冊中所推薦的農藥，對花粉發芽的影響，並篩選出對芒果授粉與著果較不具毒性的農藥。另外，花粉體外發芽不但可以用來篩選低毒性的農藥，也可以用來監測環境的汙染，如農藥(Salgare and Phunguskar, 2001)和殺草劑(Salgare, 2000a, b)，所以本研究的結果是多用途的。

探討芒果花粉體外發芽條件的報告並不多，沈與黃(1979)發現芒果花粉體外發芽以 1%瓊脂和 22 %蔗糖在 25°C 下就可以發芽，發芽率'愛文'為 41.4 %、'吉祿'63.6 %、'本地'只有 32 %。採用 Brewbaker 和 Kwack (1963)的花粉體外發芽配方反而造成芒果花粉發芽率下降(沈與黃，1979)。Shü 等人(1999)在檢測農藥對'海頓'芒果品種的發粉發芽時，發芽率最高只有 22 %。Sukhvibul 等人(1999)在研究溫度對'Nam Dok Mai'，'Kensington'，'Sensation' 和 '愛文'等四個芒果品種的發粉發芽時，雖然沒有針對芒果花粉體外發芽條件做探討，但是發現在 10°C 下平均花粉發芽率只有 53.9 %。溫度在 15 到 25°C 間，發芽率增加為 76.2-77.4 %，溫度提高到 30°C 時，花粉發芽率再降為 68.2 %。Khan 和 Perveen (2009)探討低溫儲存對'Chaunsa'、'Dasheri'和 'Langra'三個芒果品種的發粉發芽率的影響時，發現'Langra' 的發粉發芽率最好，可以達到 74 %。本研究探討'愛文'芒果花粉體外發芽的最適當配方。

材料方法

一、體外花粉發芽

(一)、採樣與花粉體外發芽

本試驗所使用的'愛文'芒果花粉，取自於屏東縣枋山鄉劉姓果農的 30 年生'愛文'芒果植株。於芒果開花期，選擇氣候良好的晴天早上 8~9 點採取花穗，置於夾鍊袋中帶回實驗室，花穗以加水三角瓶瓶插，上方以 40 瓦特電燈泡電照射至花藥開裂。以微量吸管吸取 2 μ L 培養基於載玻片上，夾取花藥已開裂的小花，

直接沾觸培養基表面，使花粉粒散布於培養基中。將載玻片置入含濕潤濾紙的培養皿內，28°C 培養 2 小時，取出鏡檢，以花粉管長度超過花粉粒兩倍者為發芽，計算發芽率，重複 4 次，試驗所得的數據以套裝軟體“統計分析系統 (Statistical Analysis System, SAS, 1988)”進行統計分析，並以鄧肯氏多變域測驗法 (Duncan's multiple range test) 檢定各變數平均值間的差異顯著性。

(二)、培養基的篩選

1. 培養基本配方 (Shü 等人, 1999)

成份	濃度
Sucrose	22 %
Boric acid	100 mg/L
Calcium sulfate	300 mg/L
Magnesium sulfate	200 mg/L
Potassium nitrate	100 mg/L
PEG	25 %
pH 值	5.66

2. 培養基中添加不同濃度的 PEG

以培養基本配方為主，分別添加 0、5、10、15、20、25、30 % PEG。

3. 培養基中添加不同濃度的糖與 PEG

以培養基本配方為主，分為含 25 % PEG 與不含 PEG 兩組，蔗糖濃度為 0、5、10、15、20、25、30、35 %。

4. 硼酸的濃度

以培養基本配方為主，硼酸的濃度分別為 0、50、100、150、200、250 ppm，另含蔗糖 15 % 及 PEG 25 %。

5. 鈣的濃度

以培養基本配方為主，鈣的濃度分別為 0、100、200、300、400、500 ppm，另含蔗糖 15 % 及 PEG 25 %。

6. 鎂的濃度

以培養基本配方為主，鎂的濃度分別為 0、100、200、300、400、500 ppm，另含蔗糖 15 % 及 PEG 25 %。

7. 鉀的濃度

以培養基本配方為主，鉀的濃度分別為 0、50、100、150、200、250 ppm，

另含蔗糖 15 % 及 PEG 25 %。

8. 培養基的酸鹼度

培養基本配方以 HCl 與 NaOH 調整 pH 值為 3、4、5、6、7、8。

9. 糖與 PEG 的濃度

以培養基本配方為主，糖的濃度為 10、15、20、25 %，PEG 濃度 15、20、25、30 %。

10. 體外培養時間

以培養基本配方進行花粉體外發芽，培養後 30、60、90、120 分取出計數發芽率。

(三)、篩選對芒果花粉體外發芽具低毒性的農藥

以篩選出的培養基配方混入 14 種防治芒果炭疽病的農藥(表 1)，觀察農藥對‘愛文’芒果花粉體外發芽的影響。

結果與討論

建立良好的花粉體外發芽的方法是進行花粉發芽相關研究，如花粉儲存與測定花粉活力等的先決條件(Heslop-Harrison, 1979)。因此，本試驗以建立良好的花粉體外發芽的方法為首要目標。結果如下：

一、‘愛文’芒果花粉體外發芽的最適當配方的篩選

1. 聚乙二醇濃度: 培養基中添加不同濃度的聚乙二醇，隨著聚乙二醇濃度的增加，芒果花粉的發芽率原則上也隨著增加(表 2)。不添加聚乙二醇時，發芽率只有 19 %，聚乙二醇濃度 25 % 時達到最高的 83 %。但是當聚乙二醇濃度過高時，對花粉的發芽有不利的影響，如表 2 中聚乙二醇濃度 30 % 時，花粉的發芽率下降成只有 53 %。
2. 糖濃度: Randhawa 和 Damodaran 在 1961 年就發現蔗糖對芒果花粉體外發芽的重要性，10 % 蔗糖可以讓‘Chaunsa’芒果花粉有 28.2 % 的發芽率。表 3 顯示在不添加聚乙二醇培養基中添加糖對發芽率的影響，隨著糖濃度的增加，芒果花粉的發芽率也隨著增加。以蔗糖濃度 30 % 時芒果花粉的發芽率最高，達 31 %，蔗糖濃度 20 %~25 %，發芽率次高，約為 26 %。蔗糖濃度 35 % 與 15 %，發芽率約分別為 18 % 和 19 %，但是統計上沒有差異。蔗糖濃度低於 15 %，發芽率在 1 % 以下。

3. 聚乙二醇與糖濃度組合: 培養基中添加 PEG 能調節培養基的滲透壓與影響膜的透性, 同時具有改善花粉體外發芽的發芽率與增進花粉管伸長的作用(李等, 1989)。糖與 PEG 為互補協同的作用, 在低濃度糖的條件下, 可藉由提高 PEG 的濃度來提高發芽率。表 3 顯示當聚乙二醇濃度為 25 %, 蔗糖濃度 5 %到 20 %之間, 花粉的發芽率都在 90 %或更高。但是當糖濃度增加到 25 %以上時, 芒果花粉的發芽率逐漸下降。糖濃度 35 %時達只剩 56 %。(表 3)。
4. 硼酸濃度: 在培養基中添加不同濃度的硼酸, 隨著硼酸濃度的增加, 芒果花粉的發芽率也隨著增加, 硼酸濃度在 150~250 ppm 間發芽率都達到 70 %或以上(表 4)。
5. 鈣的濃度: 鈣濃度會影響芒果的花粉發芽率, 以添加 200 ppm 鈣的發芽率最適當。鈣濃度低於 200 ppm, 芒果的花粉發芽率較差; 但鈣濃度超過 200 ppm, 並不會再提升芒果花粉的發芽率 (表 5)。
6. 鎂的濃度: 添加鎂也會增加芒果的花粉發芽率, 以添加 100 ppm 鎂的發芽率最適當, 達到 81 %。鎂濃度超過 400 ppm, 反而會降低芒果花粉的發芽率, 變成低於 51 %(表 6)。
7. 鉀的濃度: 添加鉀不會增加芒果的花粉發芽率, 隨著鉀濃度的增加, 芒果花粉的發芽率不受影響, 各處理間無顯著差異(表 7)。
8. 培養基的酸鹼度: pH 值對芒果的花粉發芽率的影響大, pH 值 3 時芒果花粉的發芽率為 0, 芒果花粉最適發芽的範圍在 pH 值 4-6 之間(表 8)。pH 值超過 7, 會降低芒果花粉的發芽率。
9. 體外培養時間: 芒果花粉體外發芽率, 隨著培養時間的增加而增加, 在培養兩小後達到最高的 92 %(表 9)。

(二)、篩選對芒果授粉具低毒性的農藥

愛文芒果花粉, 在混合了農藥的培養基中, 共計 14 種進行體外花粉發芽, 觀察其發芽率, 其中以 50 % 撲克拉錳與 43 % 嘉賜貝芬對花粉發芽無影響, 31.6 % 貝芬撲克拉次之(表 10)。

綜合以上的結果, '愛文'芒果花粉體外發芽的最適當培養基配方以 15 % sucrose、100 ppm boric acid、200 ppm magnesium sulfate、100 ppm potassium nitrate、300 ppm calcium sulfate、25 % PEG 最好, 發芽率可達 80 %以上。

在篩選對芒果花粉體外發芽具低毒性的農藥方面, 以 50 % 撲克拉錳與 43 % 嘉賜貝芬對花粉發芽無影響, 是最理想的防治芒果炭疽病的農藥。31.6 % 貝芬撲克拉雖然對'愛文'芒果體外花粉發芽稍有毒性(花粉發芽率約下降 12 %), 但是在降低抗藥性考量下, 還是可以和撲克拉錳與嘉賜貝芬做適當的輪替使用。

本研究除了篩選出對芒果花粉發芽較不具毒性的農藥外, 因為花粉體外發芽也可以用來監測環境的污染, 如農藥(Salgare and Phunguskar, 2001)和殺草劑

(Salgare, 2000a, b), 所以本研究具有多種用途的貢獻。

誌 謝

本研究承蒙行政院農委會農糧署的經費支持 [計畫編號 95-農科-1.3.2-糧-Z1(1)], 謹此誌謝。

參考文獻

- 李紅曦 許圳塗 李金龍 1989. PEG 對百香果花粉體外發芽之影響 *中國園藝* 325(2) : 121-130.
- 李國譚 1992. '愛文' 檸檬果小花開放習性及花粉形態與活力之研究 pp. 53.
- 沈再木、黃弼臣. 1979. 檸檬果花粉發芽之研究. *中國園藝* 25(4):120-128.
- Abbott, J.D., B.D. Bruton, and C.L. Patterson. 1991. *Fungicidal inhibition of pollen germination and germ-tube elongation in muskmelon. HortScience* 26(5):529-530.
- Brewbaker, J. L. & B. H. Kwack. 1963. *The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. Am. J. Bot.* 50(9):747 – 858.
- Haslop-Harrison, J. 1979. *Aspects of structure, cytochemistry and germination of the pollen of rye (Secale cereale L.). Annales of Botany* 44 (Suppl.) 1-47.
- Khan, S. A. and Perveen, A. 2009. *Pollen germination capacity of three mango cultivars (Mangifera indica L., Anacardiaceae) from Pakistan. Pakistan J. Bot.*41(3):1009-1012.
- Köpcke, D., Baur,P. and Schönherr, J. 2002. *Inhibition of growth of apple pollen tubes by EDTA, surfactants and fungicides. Ann. Appl. Biol.* 140:81-86.
- Randhawa, G.S., Damodaran, V.K. 1961. *Studies on floral biology and sex ratio in mango var. Chaunsa, Dasherri and Krishanbhog. Indian J, Horticulture* 18:51-64.
- Salgare, S. A. 2000. *Monitoring of herbicide (Atrataf 50W) toxicity by using pollen as indicators - a critical review - I. J. Phytological Res.* 13(2):205-210.
- Salgare, S. A. 2000. *Monitoring of herbicide (sodium arsenite) toxicity by using pollen as indicators-pollen of Petunia axillaris - a critical review. J. Ecotoxicology & Environmental Monitoring*10(3/4):163-171.
- Salgare SA, Phunguskar KP. 2001. *Monitoring of pesticide (Dimethoate) toxicity by using pollen as indicators – pollen of Catharanthus roseus – a critical review. Himalayan J. Env. Zoo.* 15(2) (2001), 147-150.
- Shü, Z.-H., C.C. Chiou and C.L. Lee. 1999. *Toxicity of pesticides to pollen*

- germination of 'Haden' mango. J. Agric. Assoc. China 188:11-19.*
- Sukhvibul, N., Whiley, A.W., Vithanage, V., Smith, M.K., Doogan, V.J. and Hetherington, S.E. 2000. *Effect of temperature on pollen germination and pollen tube growth of four cultivars of mango (Mangifera indica L.). J. Hort. Sci. and Biotech. 75(2): 214-222.*
- Yi, W., S.E. Law and H.Y. Wetzstein. 2003a. *An in vitro study of fungicide effects on pollen germination and tube growth in almond. HortScience 38:1068-1088*
- Yi, W., S.E. Law and H.Y. Wetzstein. 2003b. *Fungicide sprays can injure the stigmatic surface during receptivity in almond flowers. Ann. Bot. 91:335-341.*
- Yi, W., S.E. Law and H.Y. Wetzstein. 2003c. *Pollen tube growth in styles of apple and almond flowers after spraying with pesticides. J. Hort. Sci Biotechnol. 73(6):842-846.*

表1. 用來篩選對芒果花粉體外發芽具低毒性的農藥

農藥中名	英名	ppm
23 % 亞托敏	Azoxystrobin	500
31.6 % 貝芬撲克拉	Carbendazim + Prochloraz	333
62.5 % 賽普護汰寧	Cyprodinil + Fludioxonil	500
24.9 % 待克利	Difenoconazole	667
42.2 % 睛硫醜	Dithianon	833
43 % 嘉賜貝芬	Kasugamycin + Carbendazim	1000
50 % 克收欣	Kresoxim-methyl	500
80 % 鋅錳乃浦	Mancozeb	2500
80 % 免得爛	Metiram	2000
62.25 % 鋅錳邁克尼	Myclobutanil + Mancozeb	1667
50 % 撲克拉錳	Prochloraz	167
70 % 甲基鋅乃浦	Propineb	2500
53 % 腐絕快得寧	Thiabendazole + Oxine-copper	833
50 % 三氟敏	Trifloxystrobin	250

表 2. 培養基中添加不同濃度的 PEG 對芒果花粉發芽的影響

Table 2. Effects of different concentrations of PEG on *in vitro* pollen germination rates of 'Irwin' mangos.

PEG (%)	發芽率 (%)
0	19 e ^z
5	23 e
10	17 e
15	31 d
20	64 b
25	83 a
30	53 c

^zmean separation within columns by Duncan's multiple range test ($P < 0.001$). Means with the same letter are not significantly different.

表 3. 培養基中添加不同濃度的蔗糖與 PEG 對芒果花粉發芽的影響

Table 3. Effects of different concentrations of sucrose and PEG on *in vitro* pollen germination rates of 'Irwin' mangos.

Sucrose (%)	發芽率(%)	
	0 % PEG	25 % PEG
0	0 d ^z	84 bc ^z
5	0 d	90 ab
10	1 d	90 ab
15	19 c	93 a
20	25 b	90 ab
25	27 b	80 cd
30	31 a	73 d
35	18 c	56 e
	***	***

^zmean separation within columns by Duncan's multiple range test ($P<0.001$). Means with the same letter are not significantly different.

表 4. 培養基中添加不同濃度的硼酸對芒果花粉發芽的影響

Table 4. Effects of different concentrations of boron on *in vitro* pollen germination rates of 'Irwin' mangos.

B (ppm)	發芽率 (%)
0	58 b ^z
50	45 c
100	58 b
150	73 a
200	72 a
250	70 a

^zmean separation within columns by Duncan's multiple range test ($P<0.001$). Means with the same letter are not significantly different.

表 5. 培養基中添加不同濃度的鈣對芒果花粉發芽的影響

Table 5. Effects of different concentrations of calcium on *in vitro* pollen germination rates of 'Irwin' mangos.

Ca (ppm)	發芽率 (%)
0	58 b ^z
100	61 b
200	71 a
300	64 ab
400	58 b
500	67 ab
	*

^zmean separation within columns by Duncan's multiple range test ($P < 0.001$). Means with the same letter are not significantly different.

表 6. 培養基中添加不同濃度的鎂對芒果花粉發芽的影響

Table 6. Effects of different concentrations of magnesium on *in vitro* pollen germination rates of 'Irwin' mangos.

Mg (ppm)	發芽率 (%)
0	58 b ^z
100	81 a
200	74 a
300	73 a
400	55 b
500	51 b

^zmean separation within columns by Duncan's multiple range test ($P < 0.001$). Means with the same letter are not significantly different.

表 7. 培養基中添加不同濃度的鉀對芒果花粉發芽的影響

Table 7. Effects of different concentrations of potassium on *in vitro* pollen germination rates of 'Irwin' mangos.

K (ppm)	發芽率 (%)
0	59 a ^z
50	59 a
100	54 a
150	61 a
200	44 a
250	49 a
	ns

^zmean separation within columns by Duncan's multiple range test. Means with the same letter are not significantly different.

表 8. pH 值對芒果花粉發芽的影響

Table 8. Effects of different pH on *in vitro* pollen germination rates of 'Irwin' mangos.

pH 值	發芽率 (%)
3	0 d ^z
4	88 ab
5	89 a
6	93 a
7	73 c
8	83 b

^zmean separation within columns by Duncan's multiple range test ($P < 0.001$). Means with the same letter are not significantly different.

表 9. 不同培養時間對芒果花粉發芽的影響

Table 9. Effects of incubation time on *in vitro* pollen germination rates of 'Irwin' mangos.

時間(分)	發芽率 (%)
30	2.6 d ^z
60	27.8 c
90	51.5 b
120	91.7 a

^zmean separation within columns by Duncan's multiple range test ($P < 0.001$). Means with the same letter are not significantly different.

表 10. 不同農藥對芒果花粉發芽的影響

Table 10. Effects of different fungicides for anthracnose disease on *in vitro* pollen germination rates of 'Irwin' mangos.

處理	發芽率 (%)
23 % 亞托敏	0 e ^z
31.6 % 貝芬撲克拉	77 b
62.5 % 賽普護汰寧	9 d
24.9 % 待克利	15 c
42 % 腈硫醌	0 e
43 % 嘉賜貝芬	90 a
50 % 克收欣	0 e
80 % 鋅錳乃浦	0 e
80 % 免得爛	0 e
62.25 % 鋅錳邁克尼	0 e
50 % 撲克拉錳	87 a
70 % 甲基鋅乃浦	0 e
53 % 腐絕快得寧	0 e
50 % 三氟敏	0 e
對照	88 a

^zmean separation within columns by Duncan's multiple range test ($P < 0.001$). Means with the same letter are not significantly different.

Establishing a Novel Formula for In Vitro Pollen Germination and Screening for Low Toxicity Pesticides for Anthracnose Disease Control for 'Irwin' Mangos

Cheng-chung Chu* , Zen-hong Shü**

Summary

The present research was aimed to develop a novel formula for *in vitro* pollen germination as well as to screen for low toxicity pesticides for anthracnose disease for 'Irwin' mangos. The results showed PEG was very helpful in increasing *in vitro* pollen germination of 'Irwin' mangos. The best formula for *in vitro* pollen germination of 'Irwin' mangos was 15 % sucrose, 100 ppm boric acid, 200 ppm magnesium sulfate, 100 ppm potassium nitrate, 300 ppm calcium sulfate and 25 % PEG. The pollen germination rate using this formula could reach 80 % or even higher. Fourteen pesticides used to prevent mango anthracnose disease were screened for low toxicity to 'Irwin' mango pollens by incorporating the pesticides into the pollen germination media for 'Irwin' mangos. The results showed that 50 % Prochloraz at 167 ppm and Kasugamycin + Carbendazim at 1000 ppm were non-toxic to 'Irwin' mango pollens. Carbendazim + Prochloraz at 333 ppm had little toxic effects on pollen germination with germination rates decreasing by only 12 %. The rest of the pesticides, 23 % Azoxystrobin at 500 ppm, 62.5 % Cyprodinil + Fludioxonil at 500 ppm, 24.9 % Difenoconazole at 667 ppm, 42.2 % Dithianon at 833 ppm, 50 % Kresoxim-methyl at 500 ppm, 80 % Mancozeb at 2500 ppm, 80 % Metiram at 2000 ppm, 62.25 % Myclobutanil + Mancozeb at 1667 ppm, 70 % Propineb at 2500 ppm, 53 % Thiabendazole + Oxine-copper at 833 ppm and 50 % Trifloxystrobin at 250 ppm all had highly toxic effects to the pollen germination of 'Irwin' mangos. When incorporated with these pesticides, germination rates ranged from only 0 % to 15 %.

Key words : mango, pollen germination, pesticide screening;

* Department of Biological Science and Technology, Meiho University .

** Professor, Department of Biological Science and Technology, Meiho University (Corresponding author)

