

# 殺菌劑對胡瓜花粉活力影響之初探

沈盟倪<sup>1</sup> 蔣永正<sup>1\*</sup>

## 摘要

沈盟倪、蔣永正。2018。殺菌劑對胡瓜花粉活力影響之初探。臺灣農藥科學 4: 69-82。

本研究以胡瓜花粉離體培養方式，檢測殺菌劑菲克利 (hexaconazol) 對花粉萌發及花粉管伸長活性之影響，作為偵測殺菌劑生物指標 (bioindicator) 之參考。為降低花粉管交錯纏繞比例藉以提升檢測之準確度，首先建立花粉活力測試之最適條件。取  $100 \pm 50$  粒之胡瓜花粉粒，置於 100  $\mu$ L 含有 15% 蔗糖之 BK (Brewbaker and Kwack) 培養液內，再均勻分散在凹穴載玻片上，於 25°C 下培養 1 h 後，調查花粉萌發及花粉管伸長情形。將菲克利純品或成品混入培養基中，調查對胡瓜花粉活性之影響。結果顯示不論純品或成品，對花粉管伸長及花粉萌發率都具有顯著抑制作用，且成品之抑制程度遠較純品為高。純品引起之胡瓜花粉管長度與花粉萌發率達 50% 之抑制濃度，依序分別為 9.0 及 3.6 ppm，成品則為 2.0 及 0.4 ppm，其中花粉管長度對菲克利之反應亦較花粉萌發性狀敏感。另由花粉脫氫酵素活性經氯化三苯基四氮唑 (2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride; TTC) 染色反應結果顯示，藉由酵素相對活性之量測值可推測花粉萌發率及花粉管長度，脫氫酵素活性若低於 40% 以下，則可能會完全抑制花粉的萌發。

**關鍵詞：**胡瓜、花粉、花粉萌發、花粉管、菲克利、TTC 染色法

---

接受日期：2018 年 8 月 20 日

\* 通訊作者。E-mail: cyj@tactri.gov.tw

<sup>1</sup> 臺中市 行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所

## 緒言

臺灣農地利用因複種指數高，且耕作環境高溫多濕，以致病蟲害的發生普遍，對農作生產造成極大的衝擊。為能及時快速壓制害物的發生密度，目前多倚賴高效便利的化學防治藥劑。但農藥的使用須掌握精準的施用劑量與適當的生育期，否則可能有藥害發生的風險。一般藥害的徵狀主要與藥劑對植物的毒性 (phytotoxicity) 有關，不同植物器官的反應及敏感程度亦有明顯差異；對高等植物而言，花粉在有性生殖中扮演著重要的角色，當花藥裂開釋放出花粉粒，一旦黏附到柱頭上立即會被誘導萌發出花粉管，同時花粉管伸長經由花柱到達子房，與胚珠內卵細胞結合完成受精過程。正常狀況下，植物細胞確有一套調控花粉管朝向胚囊的定向伸長機制，目的即確保有性繁殖中精子對卵傳遞作用的延續<sup>(14)</sup>。從花粉粒萌發到授粉受精作用的發生，均與作物的產量與品質息息相關。Higashiyama et al. 特別開發了一種可同時培養胚珠及花粉管之培養基，目的即希望能確立離體花粉管之萌發活性，作為植物遭受逆境後恢復生長可能性之評估指標<sup>(11)</sup>。

有關農藥施用對花粉活性的影響，近年來也陸續有相關的研究報導<sup>(20)</sup>，因為在作物的全生育期中，降低開花結實期遭受菌蟲過度危害的風險，確為穩定農作收益的關鍵時期，因此開花期施藥在植物保護

作業中是難以避免的措施。Kargar and Imani 針對免賴得 (benomyl) 等八種殺菌劑，進行桃及油桃不同品種之離體花粉活性測試，結果顯示測試藥劑對花粉萌發率及花粉管伸長長度均有不同程度的抑制作用，除藥劑類別外，處理濃度亦為重要影響因子<sup>(13)</sup>。另外以混合殺菌劑賽普護汰寧 (Cyprodinil + Fludioxonil) 噴施番茄，發現隨施用劑量增加，具活性之花粉細胞數明顯減少，主要因為藥劑造成細胞形態及構造的異常，因而無法完成正常的伸長作用，但藥劑對花粉活性的影響與花粉細胞發育的成熟度也有密切相關<sup>(23)</sup>。Mesejo et al. 以硫酸銅分別噴施柑桔授粉前後之植株，發現對花粉細胞萌發及花粉管伸長均有明顯的抑制效果，但授粉前處理產生之無子比例高達 96%，較之授粉後的 55~81% 明顯為高<sup>(16)</sup>。

本研究主要以液體培養基進行花粉離體培養，並以蔗糖當作花粉萌發所需碳源及維持滲透壓的平衡。以胡瓜花粉粒為測試材料，首先篩選花粉離體萌發之最適培養基組成，及考量相關培養條件與技術，並確立花粉粒活性指標，以建構花粉離體萌發活力之標準評估流程，同時檢測殺菌劑菲克利對花粉萌發及花粉管伸長活性之影響，供為農藥施用時期與劑量等方法訂定之依據。

## 材料與方法

### 一、供試植材

本研究以溫室栽培之彩綠種胡瓜 (*Cucumis sativus* L. 'Cai Lu') 花朵為材料，進行殺菌劑對花粉活力影響之相關測試。選擇 10~12 節位葉片完全展開之植株，於上午八至九時間取 5~7 節位盛開之花朵，放置於密封袋中，摘除花冠後，以解剖針沾取少量液態培養基，自花藥表面刮取下花粉，再將花粉混入培養液中均勻混和備用。有關花朵取樣最佳時間，依 Kaefer et al. 針對玉米花粉粒之活力調查研究，亦顯示出一天當中之上午九時左右，採集之花粉粒可獲得最佳的結果<sup>(12)</sup>。

## 二、供試藥劑

選擇胡瓜白粉病防治藥劑菲克利 (hexaconazol) 之分析級純品試藥 (analytical grade; Sigma-Aldrich) 及商品化成品 [5% 水懸劑 (SC); 台灣日產化工股份有限公司] 作為本研究測試藥劑，其中純品試藥以 2.25% 甲醇溶液配置成不同濃度，成品則以純水稀釋成不同劑量後備用。

## 三、培養基配置

本研究以 Brewbaker and Kwack<sup>(8)</sup>所發表之 BK 培養基作為花粉細胞之基礎培養基，除探討蔗糖濃度 [10% (w/v)、15% (w/v)] 及是否添加 10% PEG4000 外，其餘組成分為 0.01% (w/v) boric acid、0.03% (w/v)  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、0.02% (w/v)

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  及 0.01% (w/v)  $\text{KNO}_3$ ，同時調整至 pH7.0。

## 四、花粉活力檢測

### (一) 花粉萌發率及花粉管伸長長度

取適量含有花粉粒細胞之培養液滴於載玻片凹穴 (15×0.8 mm；直徑×深度) 上，並確保每凹穴約含 50~150 粒之花粉粒。所有處理需於 1 小時內操作完成，以維持花粉活力。之後再將載玻片置放於搭配有數位相機 (Nikon Cooxplx P5100) 之光學顯微鏡 (Olympus SZ61) 上，並於 45 倍放大倍率下觀察與紀錄，後續利用 UTHSCSA Image Tool 軟體 (Developed by Wilcox et. al. at the University of Texas Health Science Center, San Antonio (UTHSCSA)) 進行花粉管長度之量測。花粉萌發則以花粉管伸長之長度超過花粉粒直徑視為萌發標準。

### (二) 氯化三苯基四唑 (2,3,5- Triphenyltetrazolium chloride; TTC) 染色法

本研究依 Cook and Stanley 發表之 TTC 染色法經部分修正後採用<sup>(10)</sup>。取適量花粉粒細胞混入 60% 蔗糖中，再與等體積之菲克利供試藥液均勻混和後，靜置於 25°C 恆溫箱中遮光處理 4 h。取出後於 25°C 下離心 (10,000 g) 3 min，去除上清液，加入 400  $\mu\text{L}$  含有 1% TTC 之 15%

蔗糖 BK 培養基中，均勻震盪後，置於 37 °C 恆溫箱中 30 min 後，取上清液於 485 nm 波長下量測吸光值 ( $A_{485}$ )。另將沉澱物置於 55 °C 烘箱中，經 12 h 後秤取乾重，作為花粉活性估算用。

$$\text{相對花粉活性(\%)} = \frac{A_{485(\text{處理組})} / \text{乾重}_{(\text{處理組}; \text{g})}}{A_{485(\text{對照組})} / \text{乾重}_{(\text{對照組}; \text{g})}} \times 100\%$$

## 五、殺菌劑對花粉活力影響

將測試藥劑菲克利之純品及成品分別配置成 0~50 ppm 系列不同濃度之藥液，與含有花粉粒細胞之培養液以等體積均勻混合後，取 100  $\mu\text{L}$  滴於載玻片凹穴上，蓋上蓋玻片，放置於鋪有濕潤濾紙之培養皿內，並於 25 °C 恆溫箱中 4 h，取出調查花粉萌發率及花粉管長度。另依 TTC 染色法操作步驟進行吸光值量測，分析殺菌劑處理對花粉活力之影響。

## 六、統計分析

本試驗採完全逢機設計，各處理皆為三重複。處理時將同一朵花之花粉粒平均分配至處理組及對照組，每一重複則為兩次抽樣選出之花粉粒作為調查樣品。各項調查資料需計算各處理值之標準機差 (SE) 及進行變方分析，調查資料以平均值及標準機差 (Mean  $\pm$  SE) 表示，若有顯著差異，須進行 Fisher's protected LSD test 表示處理間差異。

## 結果與討論

### 一、胡瓜離體花粉活力檢測條件建立

#### (一) 花粉粒數對花粉萌發影響

花粉管萌發率與花粉管伸長長度測量為評估花粉活力指標之一，前者以花粉管長度超過花粉粒直徑作為萌發標準，後者則以測量從花粉粒到花粉管伸長之頂端距離。兩者調查方式均需以花粉管長度作為研判依據，故花粉粒間需有適當距離以配合花粉管之自然伸長，避免因聚集未均勻分散，而影響花粉之萌發。

李等指出以培養基進行花粉離體培養作為花粉活力評估之測試體系，須先建立適宜花粉萌發之培養基濃度及溫度等條件，以及可精準量測萌發結果之培養時間長短<sup>(2,3)</sup>。一般隨著培養時間的加長，胡瓜花粉管發生交錯纏繞之比例會逐漸提高<sup>(3)</sup>，進而影響萌發率及花粉管長度調查之準確度。故本研究分別將 100 $\pm$ 50、300 $\pm$ 50、500 $\pm$ 50 粒之胡瓜花粉粒，以 100  $\mu\text{L}$  體積之培養液稀釋後，均勻分散在凹穴載玻片上，於一小時後觀察花粉管伸長情形 (表一及圖一)，作為花粉粒測試最適粒數決定之依據。各處理之花粉粒約於兩分鐘後開始萌發，花粉管向花粉粒外延伸出去。其中每凹穴 100 $\pm$ 50 粒花粉粒處理中，花粉萌發率為 90.7%，花粉管伸長長度為 639.7  $\mu\text{m}$ ，比起於每凹穴 300 $\pm$ 50 粒之花粉萌發率 78.0% 及花粉管長度 214.1  $\mu\text{m}$  處

理來的高。而在每凹穴 500±50 粒花粉粒處理部分，則由於花粉粒間距離過於緊密，雖然可以觀察到花粉萌發，但花粉管彼此間密集交錯，干擾到花粉管長度的測量（圖一）。由上述結果可知，在一定空間內，花粉粒數目愈多，花粉粒彼此之間距離越緊密，影響花粉管之伸長生長，若每凹穴培養花粉粒數目控制在 100±50 粒之間，可使花粉管伸長良好，且容易測量

花粉管長度，故後續試驗皆以每凹穴 100±50 粒胡瓜花粉粒數目進行觀察。

## (二) 溫度對胡瓜花粉粒萌發影響

Boavida and McCormick 證實溫度為提高花粉萌發率的決定因子<sup>(7)</sup>，Tian et al. 也觀察到胡瓜花粉萌發率會隨溫度下降而減少<sup>(22)</sup>。故本研究分別針對 25°C、20°C 及

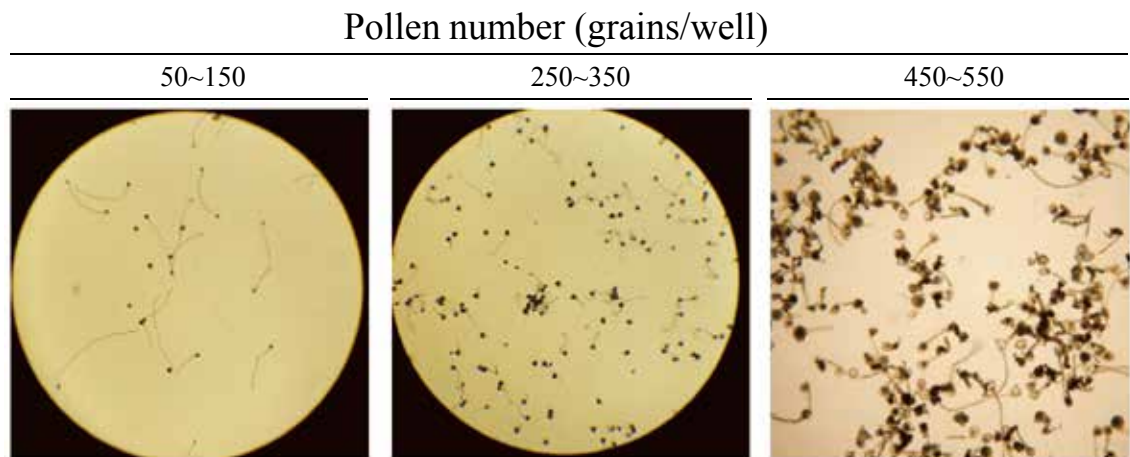
表一、單位凹穴中花粉粒數量對胡瓜花粉活力之影響

**Table 1.** Effect of pollen grain number on the viability of cucumber pollen in a fixed well

Pollen viability	Number of pollen grains per well		
	50~150	250~350	450~550
Pollen germination (%)	90.7±2.4 a <sup>1)</sup>	78.0±0.4 b	--- <sup>2)</sup>
Pollen tube elongation (µm)	639.6±103.3 a	214.1±53.2 b	--- <sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> Mean values followed by the same letter were not significantly different at  $P = 0.05$  according to Fisher's protected LSD test.

<sup>2)</sup> Not measured due to interference by aggregated pollen tubes.



圖一、單位凹穴中不同花粉粒數量下之胡瓜花粉萌發及花粉管伸長。

**Fig. 1.** Pollen germination and pollen tube elongation in a fixed well exhibiting different numbers of pollen grains.

15°C 三種溫度條件進行測試，並依試驗結果選出胡瓜花粉萌發培養之最適溫度。經四小時培養後，結果顯示 (表二及圖二) 花粉萌發率在 25°C 和 20°C 分別為 84.9% 及 89.0%，並無顯著差異，但在 15°C 培養下，花粉萌發率則下降至 66.8%，顯示溫度降低會明顯抑制花粉粒之萌發。此外，在花粉管伸長生長方面，則以 25°C 培養下可得最長花粉管長度 807  $\mu\text{m}$ ，溫度 20°C 及 15°C 皆會抑制花粉管伸長。李等探討胡瓜花粉活力最適萌發溫度，發現 25°C 培養下萌發率最佳，超過 30°C 則明顯降低<sup>(2,3)</sup>。一般花粉

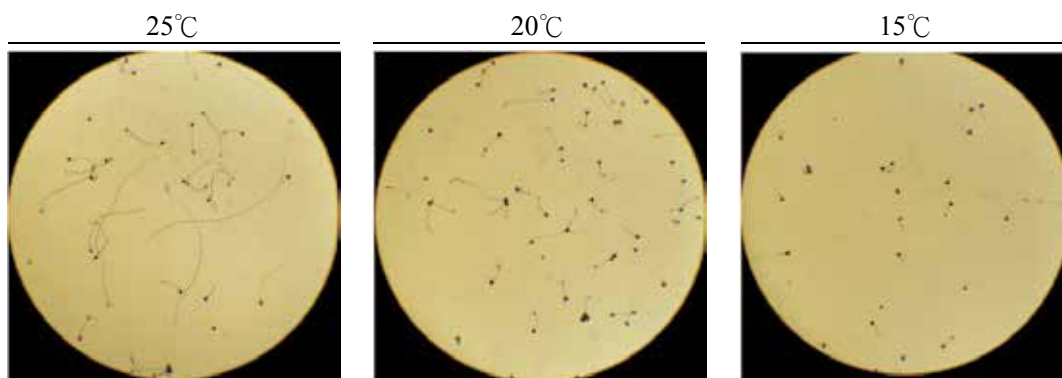
活力皆會在離體後開始下降，故以當日採集之活力最高。Burke et al. 探討棉花離體花粉細胞之萌發系統，發現在 28°C 左右花粉萌發率及花粉管快速延伸之表現最佳，若高於 37°C 則花粉萌發率降低，高於 32°C 出現花粉管伸長抑制現象<sup>(9)</sup>。綜合本試驗花粉萌發和花粉管伸長結果與前人研究報導，在進行胡瓜花粉採樣時必須避開中午高溫，以早上八至九時間最為適當，且以帶花冠方式剪取帶回實驗室為佳<sup>(2,3)</sup>，花粉取樣離體處理過程皆須在 30°C 以下，而離體花粉萌發條件則設定為 25°C。

表二、不同培養溫度對胡瓜花粉萌發之影響

Table 2. Effects of different temperatures on the viability of cucumber pollen *in vitro*

Pollen viability	Temperature (°C)		
	25	20	15
Pollen germination (%)	84.9±3.1 a <sup>1)</sup>	89.0±2.7 a	66.8±8.1 b
Pollen tube elongation ( $\mu\text{m}$ )	807.3±125.6 a	318.3±20.8 b	155.4±21.8 c

<sup>1)</sup> Mean values followed by the same letter were not significantly different at  $P = 0.05$  according to Fisher's protected LSD test.



圖二、不同培養溫度下之胡瓜花粉萌發及花粉管伸長。

Fig. 2. Pollen germination and pollen tube elongation under different incubation temperatures.

### (三) 蔗糖濃度及 PEG<sub>4000</sub> 對胡瓜花粉萌發時發生爆裂現象之影響

Liliana and Borut 觀察到胡瓜花粉粒在萌發培養時，會發生爆裂情形，即澱粉顆粒向花粉粒細胞外滲漏，而使花粉粒產生不規則形狀<sup>(15)</sup>。同時指出提高蔗糖濃度至 15% 以及調整液體培養 pH7.0 可以降低胡瓜花粉萌發之爆裂比率<sup>(15)</sup>。本研究以 Brewbaker and Kwack 所發表之 BK 培養基作為花粉基礎培養基<sup>(8)</sup>，配製 10% 及

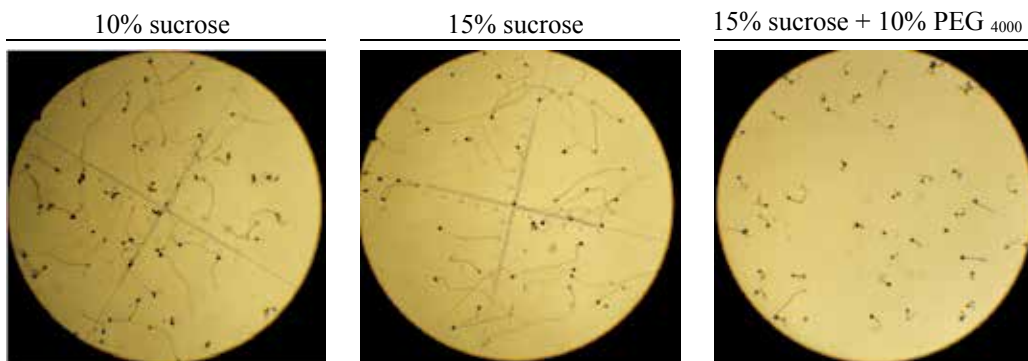
15% 兩種蔗糖濃度以及 10% PEG<sub>4000</sub> 添加的差別，並調整 pH 值至 7.0。培養四小時後觀察胡瓜花粉萌發之爆裂比率，結果顯示 (表三及圖三)，蔗糖濃度從 10% 提高至 15%，可有效降低花粉萌發之爆裂比率自 26% 減少到 2.6%，降幅比率高達 10 倍，花粉顯示提高蔗糖濃度可減少花粉萌發產生爆裂的現象。然而以 15% 蔗糖濃度另外添加 10% PEG<sub>4000</sub> 後，反而增加花粉萌發之爆裂比率。但 Wang et al. 以水稻花粉為研究材料，添加 PEG<sub>4000</sub> 則可有效降低花粉萌發之爆裂情形<sup>(24)</sup>。宋等也證實

表三、培養基中不同濃度蔗糖及 PEG<sub>4000</sub> 對胡瓜花粉爆裂之影響

**Table 3.** Effects of different sucrose and PEG<sub>4000</sub> concentrations on the bursting of cucumber pollen *in vitro*

Concentration of sucrose and PEG <sub>4000</sub>	Bursting of pollen grains (%)
10% sucrose	26.0±5.4 b <sup>1)</sup>
15% sucrose	2.6±4 c
15% sucrose + 10% PEG <sub>4000</sub>	48.6±0.7 a

<sup>1)</sup> Mean values followed by the same letter were not significantly different at  $P = 0.05$  according to Fisher's protected LSD test.



圖三、不同濃度蔗糖及 PEG<sub>4000</sub> 培養基中之胡瓜花粉爆裂。

**Fig. 3.** Bursting of germinated pollen grains in medium with different concentrations of sucrose and PEG<sub>4000</sub>.

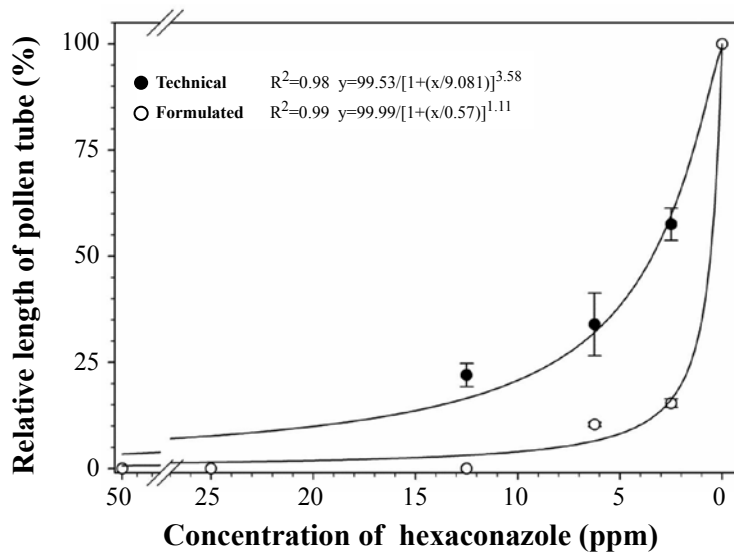
PEG 對胡蘿蔔花粉離體萌發具有促進作用，其中 PEG<sub>6000</sub> 的最佳濃度為 100 g/L、PEG<sub>4000</sub> 和 PEG<sub>10000</sub> 則為 150 g/L<sup>(4)</sup>。綜上所述，有關 PEG 對花粉萌發及發生爆裂現象的生理作用，在作物品種間之差異頗為顯著。PEG 與花粉萌發或花粉管頂端發生爆裂現象的關連性，可能與細胞滲透壓的改變有關，但濃度若適當確可有效降低爆裂比率。

侯等為檢測小麥成熟花粉活性，建立代表性之小麥花粉離體萌發最佳培養體系。發現 28℃ 下，在含有 20% 蔗糖及 10% PEG<sub>4000</sub> 之培養基中培養 30 min 後，以鏡檢觀察其萌發率高達 90% 以上<sup>(5)</sup>。本研究觀察到胡瓜花粉管伸長後，花粉管頂端會有破裂情形，破裂後即停止生長，至於不同處理間花粉管伸長產生破裂的現象並沒有太大差別。另外，試驗中也觀察到胡瓜花粉管最長長度可達 3528.9 μm。故後續試驗培養胡瓜離體花粉之液體培養液，調整蔗糖濃度為 15%，且不添加 PEG<sub>4000</sub>。Asma 在杏樹花粉細胞之發芽率測試中，也得到以含有 15% 蔗糖濃度的培養基具有最高發芽率的相近結果<sup>(6)</sup>。另以胡瓜為試驗材料，則發現提高 boric acid 濃度至 100 mg/L 可增加胡瓜花粉之萌發率<sup>(2,3)</sup>，與本研究中花粉細胞之基礎培養基中所含之 0.01% boric acid (w/v) 相近。

## 二、殺菌劑菲克利對花粉活力影響

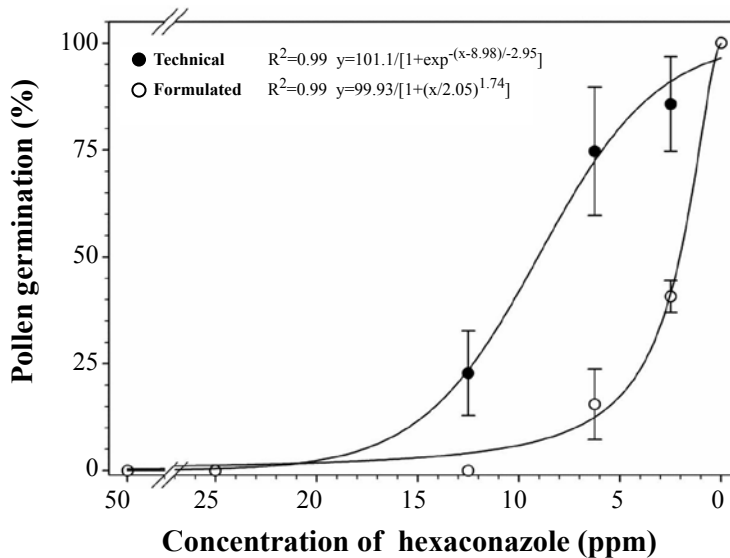
### (一) 花粉管伸長及花粉萌發

菲克利為防治胡瓜白粉病之核准使用之殺菌劑，5% 水懸劑之使用方式為稀釋 2,000 倍，於發病初期均勻噴施於葉片表面。胡瓜花粉在含有推薦濃度 (25 ppm) 之菲克利培養基中，離體培養四小時後，結果顯示不論純品或成品，都會完全抑制花粉管伸長及花粉萌發率 (圖四及圖五)。其中花粉管長度在 2.5 ppm (推薦濃度之 1/10 倍) 劑量時，純品藥劑抑制率為 40%，但成品抑制幅度高達 80%，顯示成品之抑制程度遠較純品為高。此外，在花粉萌發率部分，純品藥劑在 12.5 ppm (推薦濃度之 1/2 倍) 下，萌發率達 70% 抑制，然成品在 2.5 ppm (推薦濃度之 1/10 倍) 劑量下，抑制率即達到 60%。不論花粉管長度或花粉萌發率，純品藥劑需達推薦濃度 (25 ppm) 才能完全抑制花粉活性，成品藥劑則只需 12.5 ppm (推薦濃度之 1/2 倍) 劑量下即可完全抑制。Öztürk Çalı<sup>(19)</sup> 於溫室番茄使用殺菌劑福賽得 (Fosetyl-aluminium) 防治露菌病，並調查花粉形態及活性的影響，以推薦或 2 倍推薦量施用下，均會引起花粉形態構造的改變，且與對照有明顯差異。以殺蟲劑佈飛賽滅寧混合劑處理露天栽培之番茄植株亦發生相近的結果<sup>(17, 18)</sup>。活性的降低程度隨劑量提高而增加，甚至達完全抑制現象<sup>(25)</sup>，但在作物種類間的表現並不一致<sup>(20)</sup>。藥劑處理導致花粉細胞出現皺縮及變形現象，則可能造成花粉活性降低及產量銳減結果。



圖四、菲克利純品及成品藥劑對胡瓜花粉管伸長之影響。

Fig. 4. Effects of technical and formulated hexaconazole on pollen tube elongation of cucumber.



圖五、菲克利純品及成品農藥對胡瓜花粉萌發之影響。

Fig. 5. Effects of technical and formulated hexaconazole on pollen germination rate of cucumber.

另估算純品及成品菲克利，引起胡瓜花粉管長度與花粉萌發率達 50% 之抑制濃度列於表四。結果顯示純品菲克利造成 50% 花粉萌發率與花粉管長度之抑制濃度分別為 9.0 及 3.6 ppm，成品菲克利則依序為 2.0 及 0.4 ppm，除成品對胡瓜花粉活力抑制效果較為明顯外，花粉管長度對菲克利之反應亦較花粉萌發性狀敏感 (表四)。綜合花粉管伸長及花粉萌發率結果，可知菲克利對胡瓜花粉活力有明顯抑制效果，成品則較純品之抑制作用為高，推測成品中之其他成分，對花粉管伸長及花粉萌發等活力亦具有抑制潛力，在不同廠牌間之表現應有相當程度之差異。

## (二) 花粉脫氫酵素活性 (TTC 染色法) 之花粉活力檢測

本研究以不同濃度之菲克利純品對花粉脫氫酵素活性量測結果顯示 (表五及圖六)，對照組之相對花粉脫氫酵素活性為 178.6 ( $A_{485}/g$ )，推薦濃度 (25 ppm) 處理下，花粉相對脫氫酵素活性降至對照組之 38%，處理濃度 12.5 ppm (1/2 倍) 下則降至 76%。此結果與花粉管伸長及花粉萌發率比較，在推薦濃度下可完全抑制花粉萌發，但仍可觀察到 TTC 還原反應的產生，故可藉由相對花粉脫氫酵素活性測量值來推測花粉萌發率及花粉管長度，脫氫

表四、菲克利純品及成品農藥對胡瓜花粉活力之抑制影響

Table 4. Effects of technical and formulated hexaconazole on pollen viability of cucumber

Type of hexaconazole	Hexaconazole concentration causing 50% inhibition ( $IC_{50}$ ; ppm) <sup>1)</sup>	
	Germination	Pollen tube elongation
Technical hexaconazole	9.0	3.6
Formulated hexaconazole	2.0	0.4

<sup>1)</sup>  $IC_{50}$  values indicate the concentration of hexaconazole required to reduce 50% pollen viability.

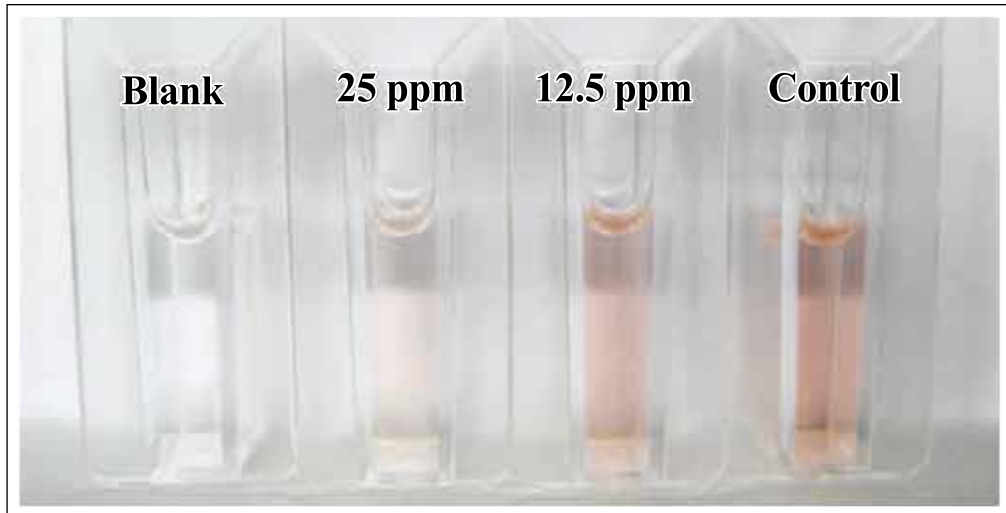
表五、TTC 染色法測定不同濃度菲克利處理之胡瓜花粉脫氫酵素活性變化

Table 5. Changes in the dehydrogenase activity of cucumber pollen treated with different concentrations of hexaconazole, detecting by TTC staining method

Concentration of hexaconazole (ppm)	activity ( $A_{485}/g$ )	Relative activity
0 <sup>1)</sup>	178.6	100 a <sup>2)</sup>
12.5	135.7	76±8 b
25	67.9	38±16 c

<sup>1)</sup> Control.

<sup>2)</sup> Mean values followed by the same letter were not significantly different at  $P = 0.05$  according to Fisher's protected LSD test.



圖六、菲克利處理後胡瓜花粉活力檢測。

Fig. 6. Dehydrogenase activity of cucumber pollen treated with two concentrations of hexaconazole, detecting by TTC staining method.

酵素活性若低於 40% 左右，則可能完全抑制花粉萌發。Souza et al. 試驗證實<sup>(21)</sup>，於確立 TTC 染色法進行之適當溫、濕度與反應時間等條件下，可精準快速的評估出黑小麥休眠種子之活性。綜合以上結果，除可得知菲克利純品具有抑制花粉活性潛力外，此利用 TTC 還原反應測量花粉脫氫酵素活性方法也可應用在快速檢測藥劑對花粉活性之程度。

但王等比較碘－碘化鉀染色法、TTC 染色法、醋酸洋紅染色法(aceto carmine dyeing method)及螢光素二醋酸酯法(fluorescein diacetate method)對滇重樓(*Paris polyphylla* var. *yunnanensis*)花粉活力之檢測效果<sup>(1)</sup>。結果顯示醋酸洋紅及螢光素二醋酸酯的染色率較高，分別為 91.30% 和 90.55%，且數據頗為一致，碘

－碘化鉀染色法的染色率雖高達 94.80%，但包含退化的花粉和失去活力的花粉，TTC 染色法的染色率僅為 27.51%。對測試植物滇重樓花粉的生活力，醋酸洋紅染色法和螢光素二醋酸酯染色法的染色率較高，且能準確地區分出滇重樓花粉的活力。以染色法評估花粉活力，確實存在植物種類間的反應差異，若先確認與萌發率之相關性應可降低誤判的機率。

## 引用文獻

1. 王定康、孫桂芳、郭志明、王荔芳、岑曉江。2007。滇重樓的花粉活力測定方法比較。安徽農業科學 35: 11451-11453。

2. 李靜、胡建斌、李建吾、郭豔。2008。運用正交設計優化黃瓜花粉離體萌發條件。貴州農業科學 3(6): 139-140。
3. 李曉麗、嚴立英、馮志紅、賈銀霞。2008。黃瓜花粉生活力的研究。北方園藝 3: 24-26。
4. 宋紅霞、吳旭豔、武喆、張光星。2011。PEG 對胡蘿蔔花粉離體萌發的影響。長江蔬菜 6: 22-24。
5. 侯立江、宋瑜龍、牛娜、馬守才、宋亞珍、王強、張改生、王軍衛。2015。小麥花粉離體萌發培養體系的篩選。中國農學通報 31(21): 111-114。
6. Asma, B. M. 2008. Determination of pollen viability, germination ratios and morphology of eight apricot genotypes. Afr. J. Biotechnol. 7: 4269-4273.
7. Boavida, L. C., and McCormick, S. 2007. Temperature as a determinant factor for increased and reproducible *in vitro* pollen germination in *Arabidopsis thaliana*. Plant J. 52: 570-582.
8. Brewbaker, J. L., and Kwack, B. H. 1963. The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. Am. J. Bot. 50: 859-865.
9. Burke, J. J., Velten, J., and Oliver, M. J. 2004. *In vitro* analysis of cotton pollen germination. Agron. J. 96: 359-368.
10. Cook, S. A., and Stanley, R. G. 1960. Tetrazolium chloride as an indicator of pine pollen germinability. Silvae Genetica 9: 134-136.
11. Higashiyama, T., Kuroiwa, H., Kawano, S., and Kuroiwa, T. 1998. Guidance *in vitro* of the pollen tube to the naked embryo sac of *Torenia fournieri*. Plant Cell 10: 2019-2031.
12. Kaefer, K. A. C., Chiapetti, R., Fogaça, L., Muller, A. L., Calixto, G. B., and Chaves, E. I. D. 2016. Viability of maize pollen grains *in vitro* collected at different times of the day. Afr. J. Agric. Res. 11: 1040-1047.
13. Kargar, M. H., and Imani, A. 2011. Effects of fungicides on pollen germination peach and nectarine *in vitro*. Afr. J. Plant Sci. 5: 643-647.
14. Krichevsky, A., Kozlovsky, S. V., Tian, G. W., Chen, M. H., Zaltsman, A., and Citovsky, V. 2007. How pollen tube grow. Dev. Biol. 303: 405-420.
15. Vižintin, L., and Bohanec, B. 2004. *In vitro* manipulation of cucumber (*Cucumis sativus* L.) pollen and microspores: isolation procedures, viability tests, germination, maturation. Acta Biol. Cracov. Ser. Bot. 46: 177-183.
16. Mesejo, C., Martínez-Fuentes, A., Reig, C., Rivas, F., and Agustí, M. 2006. The inhibitory effect of CuSO<sub>4</sub> on Citrus pollen germination and pollen tube growth and its application for the production of seedless fruit. Plant Sci. 170: 37-43.

17. Meshram, R. S., and Chaturvedi, A. 2015. Effect of insecticide application on the pollen production and pollen viability of hybrid tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). IJIPLS 5(3): 103-110.
18. Meshram, R., and Chaturvedi, A. 2017. Effect of insecticide on *in vitro* pollen germination of *Lycopersicon esculentum* (Mill.) of F1 hybrid variety Laxmi. IJANS 6(4): 1-10.
19. Öztürk Çalı, İ. 2008. The effects of fosetyl-Al application on morphology and viability of *Lycopersicon esculentum* Mill. pollen. Plant Soil Environ. 54: 336-340.
20. Padilla, F., Soria, N., Oleas, A., Rueda, D., Manjunatha, B., Kundapur, R. R., Maddela, N. R., and Rajeswari, B. 2017. The effects of pesticides on morphology, viability, and germination of Blackberry (*Rubus glaucus* Benth.) and Tree tomato (*Solanum betaceum* Cav.) pollen grains. 3 Biotech. 7: 154.
21. Souza, C. R., Ohlson, O. C., Gavazza, M. I. A., and Panobianco, M. 2010. Tetrazolium test for evaluating triticale seed viability. Rev. Bras. Sementes 32: 163-169.
22. Tian, F., Fan, Z. C., and Sheng, J. 2007. Studies on pollen viability of cucumber under low temperature. Acta Agric. Jiangxi 19(3): 57-59
23. Tort, N., Öztürk, İ., and Güvensen, A. 2005. Effects of some fungicides on pollen morphology and anatomy of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Pak. J. Bot. 37: 23-30.
24. Wang, S. H., Chen F., and Zhou, K. D. 2000. *In vitro* pollen germination of rice (*Oryza sativa* L.). Acta Agron. Sin. 26: 609-611.
25. Zarrabi, A., and Imani, A. 2011. Effects of fungicides on *in-vitro* pollen germination, tube growth and morphology of almond (*Prunus dulcis*). Afr. J. Agric. Res. 6: 5645-5649.

# Preliminary Study on the Effect of Fungicide on Pollen Viability

Meng-Ni Shen<sup>1</sup>, Yeong-Jene Chiang<sup>1\*</sup>

## Abstract

Shen, M. N., and Chiang, Y. J. 2018. Preliminary study on the effect of fungicide on pollen viability. *Taiwan Pestic. Sci.* 4: 69-82.

In this study, the viability of cucumber pollen was used as a bioindicator to detect the phytotoxic effect of the fungicide hexaconazole on pollen germination, pollen tube elongation, and dehydrogenase activity. In order to assess the phytotoxic effect, we performed a pollen viability assay, in which 50~150 cucumber pollen grains were incubated at 25°C for one hour with 100 µL BK culture medium that contained 15% sucrose and technical or commercial formulation of hexaconazole. Results showed that both the technical and formulated hexaconazole were able to completely suppress pollen tube elongation and pollen germination; however, the degree of inhibition resulting from the formulated hexaconazole was much higher than that of the technical hexaconazole. Inhibitory concentrations of technical hexaconazole to reduce pollen tube length and pollen germination rate by 50% were 9.0 and 3.6 ppm, respectively, whereas the concentrations of formulated hexaconazole required to achieve the same inhibition were 2.0 and 0.4 ppm, respectively. Indeed, experimental results of a dehydrogenase activity test (performed using a TTC assay) demonstrated that both pollen grain germination and pollen tube elongation were completely inhibited when dehydrogenase activity was decreased to less than 40%. Finally, we found that cucumber pollen viability was significantly inhibited by hexaconazole, and that pollen tube elongation was more sensitive to hexaconazole than was pollen grain germination.

**Key words:** cucumber, pollen, pollen germination, pollen tube, hexaconazole, TTC staining method.

---

Accepted: August 20, 2018.

\* Corresponding author, E-mail: cyj@tactri.gov.tw

<sup>1</sup> Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Council of Agriculture, Taichung