เทคนิคสำหรับการแยกและการทดสอบความงอกของเรณูกล้วยไม้สกุลหวายบางพันธุ์

The technique for pollinia separation and pollen germination test for certain *Dendrobium* cultivars

ศิรัชตนันท์ โรจนวิจิตร[1], ปิยนุช ศรชัย[1], ดวงกมล สัมฤทธินันท์[2], หนึ่งฤทัย เดชสังกรานนท์[2],
บุบผา คงสมัย[3] และ เสริมศิริ จันทร์เปรม[1,4*]
Sirattanan Rodjanawijid[1], Piyanuch Sornchai[1], Duangkamol Sumrittinun[2], Neungrutai Dechsangkranon[2],
Buppa Kongsamai[3] and Sermsiri Chanprame[1,4*]

Abstract

A suitable medium for *Dendrobium* orchid pollen germination was determined. The cultivars used were *Dendrobium* orchid dwarf type (pink), Earsakul and Bom17. The flower of 3 - 5 days after full bloom was used for pollen germination. The pollinias were incubated on 11 different media formulas and agar medium with or without sucrose, in dark condition for 72 hours prior to test for viability and germination. The results shown that all 3 cultivars showed 100% viability in 11 media formulars, but giving much lower percentage of pollen tube growth. The pollinia germination of dwarf type gave the highest result of 50.41% on sugar-free agar medium. For Earsakul and Bom 17, pollen germinations were as low as 2.2 and 6.53%, respectively. For the pollinia separation technique, using 0.5% hemicellulase for 15 minutes gave the best enzyme digestion. For mechanical method, hand squeeze technique superior to the use of vortex.

Keywords : *Dendrobium*, pollinia digestion, pollen viability, pollen germination

---

[1] ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และ ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900
Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, and Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok 10900, Thailand

[2] สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140
Program in Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

[3] ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140
Department of Agronomy, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

[4] ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140
Department of Horticulture, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

รับเรื่อง : กรกฎาคม 2558
รับตีพิมพ์ : กรกฎาคม 2558

* Corresponding author : agrsrc@ku.ac.th, agrsrc@gmail.com

บทคัดย่อ

การทดลองเพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการงอกของละอองเรณูกล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium*) จำนวน 3 พันธุ์ คือ หวายแคระ เอียสกุล และบอม17 โดยใช้ดอกที่บานเป็นเวลา 3-5 วันมาศึกษาโดยนำก้อนเรณู (pollinia) มาเพาะทดสอบความมีชีวิตโดยการย้อมสี acetocarmine และการเพาะทดสอบความงอกบนอาหารสังเคราะห์ 11 สูตร (สูตร Brewbaker and Kwack (1963) และสูตรอาหารวุ้นที่เติมหรือไม่เติมซูโครส) และนำไปไว้ในที่มืดเป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า กล้วยไม้ทั้ง 3 พันธุ์มีความมีชีวิตของละอองเรณู 100 เปอร์เซ็นต์ ในทุกสูตรอาหาร แต่มีการงอกของละอองเรณูต่ำลงมาก โดยพบว่าเรณูของพันธุ์หวายแคระที่เพาะในอาหารวุ้นที่ไม่เติมซูโครสมีการงอกของละอองเรณูสูงที่สุดคือ 50.41 เปอร์เซ็นต์ สำหรับพันธุ์เอียสกุลและบอม17 มีการงอกของละอองเรณูต่ำมาก 2.2-6.53 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับเท่านั้น สำหรับการแยกกลุ่มของเรณูของกล้วยไม้พบว่าวิธีการที่ดีที่สุด คือ การแช่กลุ่มเรณูในเอนไซม์ hemicellulase ความเข้มข้น 0.5% เป็นเวลา 15 นาที ส่วนการแยกโดยใช้วิธีกลที่ดีที่สุดคือการขยี้ด้วยมือ ซึ่งให้ผลดีกว่าการใช้ Vortex

คำสำคัญ : กล้วยไม้สกุลหวาย การย่อยกลุ่มเรณู ความมีชีวิตของเรณู การงอกของเรณู

คำนำ

ปัจจุบันกล้วยไม้เป็นพืชที่ได้รับความสนใจในแวดวงการเกษตรเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากเป็นไม้ดอกที่มีความสวยงาม และเป็นพืชเศรษฐกิจที่สร้างรายได้จากการส่งออกให้แก่ประเทศไทยเป็นจำนวนมาก จึงส่งผลให้มีผู้ที่ศึกษาเกี่ยวกับการผสมพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้เพิ่มมากขึ้น เพื่อรักษาพันธุ์กล้วยไม้หรือเพื่อการพัฒนาพันธุ์กล้วยไม้ใหม่ ๆ ให้มีคุณภาพดีกว่าเดิม แต่การผสมพันธุ์กล้วยไม้นั้นยังมีโอกาสในการผสมติดน้อย ซึ่งมีปัจจัยที่เข้ามาเกี่ยวข้องหลายปัจจัย ปัจจัยหลักได้แก่ ลักษณะทางพันธุกรรมที่สามารถเข้ากันได้ของคู่ผสม ความมีชีวิตและความสามารถในการงอกของละอองเรณู นอกจากนี้ความสมบูรณ์พันธุ์ของพันธุ์พ่อและแม่ ซึ่งสภาพแวดล้อมเข้ามามีส่วนเกี่ยวข้องในประเด็นนี้อย่างมาก

การตรวจสอบความมีชีวิตของละอองเรณู (pollen viability) จัดเป็นขั้นตอนสำคัญที่ช่วยให้การผสมพันธุ์มีประสิทธิภาพมากขึ้น การตรวจสอบความมีชีวิตของละอองเรณูมีหลายวิธี เช่น การย้อมสี (dye staining) การตรวจสอบการงอกของละอองเรณู (pollen germination) และการทดสอบผสม (crossing) การทดสอบโดยการย้อมสีนั้นเป็นวิธีที่ง่าย และเห็นผลได้รวดเร็ว แต่ตรวจสอบได้เพียงว่าละอองเรณูมีชีวิตอยู่หรือไม่เท่านั้น สำหรับวิธีการตรวจสอบการงอกของละอองเรณูนั้นใช้เวลาในการทดสอบ 3 ถึง 4 วัน แต่มีความแม่นยำมากกว่าการย้อมสี

อย่างไรก็ตาม การทดสอบกับละอองเรณูกล้วยไม้ทั้งวิธีการย้อมสีและการตรวจสอบการงอกของละอองเรณูนั้นยังคงมีปัญหา เนื่องจากละอองเรณูของกล้วยไม้มีลักษณะอัดตัวกันเป็นก้อนแข็งที่เรียกว่า pollinia ทำให้การตรวจสอบการติดสีและเปอร์เซ็นต์การงอกทำได้เฉพาะเรณูที่อยู่ด้านนอกเท่านั้น จึงจำเป็นต้องหาวิธีการเพื่อให้สามารถแยกก้อนเรณูออกมาเป็นเรณูเดี่ยว ๆ และนอกจากนี้ในการทดสอบการงอกของละอองเรณูยังจำเป็นต้องหาสูตรอาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสมซึ่งพืชแต่ละชนิดจะแตกต่างกัน

ในการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการตรวจสอบการงอกของหลอดละอองเรณูในกล้วยไม้นั้น Stort and de L. Galdino (1984) ได้

ทดสอบการงอกของละอองเรณูกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Laelia* พบว่า ละอองเรณูของกล้วยไม้งอกได้ดีในสูตรอาหารที่ใช้วุ้นปริมาณ 1.5 กรัม ซูโครสปริมาณ 1 กรัม และน้ำปริมาตร 100 มิลลิลิตร และ Ketsa and Wisuttiamonkul (2013) ได้รายงานว่า stigma fluid เป็นส่วนสำคัญสำหรับการงอกของละอองเรณูกล้วยไม้สกุลหวาย ซึ่งสอดคล้องกับการรายงาน Lack and Diaz (1990) ที่พบว่า stigma fluid เป็นตัวกระตุ้นให้ละอองเรณูเกิดการงอก และกระตุ้นให้หลอดละอองเรณูเจริญเติบโต จึงเป็นที่มาสำหรับการศึกษาครั้งนี้ ซึ่งเป็นการศึกษาความสามารถในการงอกของละอองเรณูกล้วยไม้สกุลหวายโดยใช้ stigma fluid ร่วมกับสูตรอาหารต่าง ๆ ที่เหมาะสม

สำหรับวิธีการย่อยก้อนเรณู (pollinia) ให้ได้เป็นละอองเรณู (pollen) นั้นโดยทั่วไปใช้หลักการเดียวกับการแยกโปรโตพลาสต์ ซึ่งมี 2 วิธีการหลัก คือ 1) การแยกโดยวิธีกล โดยการตัด หั่น บดเบา ๆ พร้อมทั้งเขย่าหรือลดแรงดันออสโมติก (osmotic pressure) ของสารละลายแช่เนื้อเยื่อ เพื่อให้ผนังเซลล์แตกง่ายขึ้น วิธีนี้เหมาะสำหรับใช้กับเซลล์ขนาดใหญ่ แต่มีข้อเสียคือได้โปรโตพลาสต์น้อยและเซลล์เสียหายค่อนข้างมาก และ 2) การแยกโดยใช้เอนไซม์ โดยการใช้สารกลุ่ม hydrolytic enzyme ย่อยทำลายผนังเซลล์ วิธีนี้มีข้อดีคือสามารถให้ผลผลิตโปรโตพลาสต์ได้จำนวนมาก เอนไซม์ที่นิยมใช้ย่อยผนังเซลล์เช่น pectinase cellulase และ hemicellulase และการเลือกใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์นั้นขึ้นอยู่กับระยะเวลาที่ต้องการให้เกิดการย่อยผนังเซลล์ ถ้าความเข้มข้นสูงระยะเวลาที่ใช้ในการย่อยก็จะสั้นลง (Davey *et al*., 2005)

จากประเด็นดังกล่าวนี้ จึงเป็นที่มาของการศึกษาในครั้งนี้ ที่มีจุดประสงค์เพื่อหาวิธีการที่เหมาะสมสำหรับตรวจสอบการมีชีวิต และการงอกของเรณูกล้วยไม้สกุลหวาย โดยศึกษาอายุดอกที่เหมาะสม สูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับกระตุ้นการงอกของเรณู รวมทั้งวิธีการแยกก้อนเรณูให้เป็นเรณูเดี่ยวเพื่อให้สามารถตรวจสอบการมีชีวิตและการงอกได้แม่นยำมากขึ้น

อุปกรณ์และวิธีการ

การศึกษาลักษณะเรณูกล้วยไม้ที่เหมาะสมสำหรับนำมาตรวจสอบความมีชีวิต

ช่อดอกกล้วยไม้สกุลหวายนั้นในหนึ่งช่อดอกประกอบด้วยดอกตูมและดอกบานในระยะที่แตกต่างกัน โดยจะพบความบริบูรณ์ของดอกจากตำแหน่งล่างสุดไปบนสุด ดังนั้น ดอกกล้วยไม้แต่ละดอกในช่อเดียวกันจึงมีความบริบูรณ์ของเกสรเพศผู้มีความเหมาะสมในการผสมพันธุ์ได้ต่างกัน งานวิจัยส่วนนี้จึงตรวจสอบลักษณะทางกายภาพของก้อนเรณูในระยะการบานของดอกที่แตกต่างกัน ตั้งแต่ดอกตูมระยะสุดท้าย ดอกที่บานวันแรก และดอกที่บานมาแล้ว 3 5 7 และ 15 วันโดยศึกษาในกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์การค้า 3 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์หวายแคระดอกสีชมพู พันธุ์เอียสกุล และ พันธุ์บอม17 โดยตรวจสอบจำนวนก้อนเรณูในแต่ละดอก สีของก้อนเรณู และลักษณะทางกายภาพอื่น ๆ รวมทั้งตรวจสอบความมีชีวิตของก้อนเรณูโดยวิธีการย้อมสี acetocarmine ความเข้มข้น 1% แล้วตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า และคัดเลือกตัวอย่างจากวันที่เหมาะสมนำไปตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope รุ่น JSM-54LOLV: JAPAN)

การศึกษาสูตรอาหารสำหรับการชักนำการงอกของละอองเรณู

นำก้อนเรณูจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์การค้าทั้ง 3 พันธุ์ ที่ดอกบานมาแล้ว 3 วัน มาทดสอบความงอกของละอองเรณูทันทีหลังจากเก็บจากต้น โดยทดสอบอาหารที่ใช้ในการทดสอบความงอกของเรณู 11 สูตร (Table 1) คือ อาหารวุ้น (0.7%) ที่ไม่เติมน้ำตาลซูโครส อาหารสูตร Brewbaker and Kwack (1963) (เติมวุ้น 0.7%) ที่เติมน้ำตาลซูโครส

ต่างกัน 6 ระดับคือ 0 2 5 10 15 และ 20% (น้ำหนัก/ปริมาตร) และ อาหารวุ้น (0.7%) ที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นต่างกัน 4 ระดับคือ 2 5 10 และ 15% (น้ำหนัก/ปริมาตร) โดยก่อนเพาะได้นำกลุ่มเรณูคลุกลงใน stigma fluid ของแต่ละพันธุ์ แล้วจึงนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ที่เตรียมไว้ โดยแต่ละพันธุ์ทดสอบสูตรอาหารละ 5 ซ้ำ ซ้ำละ 4 ก้อนเรณู จากนั้นนำไปเก็บในสภาพมืดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วจึงนำมาตรวจสอบความมีชีวิต และการงอกของเรณูตามวิธีการดังนี้

การตรวจสอบความมีชีวิตของละอองเรณูด้วยวิธีการย้อมสี

นำเรณูกล้วยไม้ทั้ง 3 พันธุ์ที่เพาะในอาหารสูตรสังเคราะห์ที่แตกต่างกันเป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง นำมาย้อมด้วยสี acetocarmine ความเข้มข้น 1% ซึ่งทำโดยหยดน้ำกลั่นลงบนสไลด์ 1 หยด แล้วเขี่ยกลุ่มเรณูลงบนหยดน้ำ ปิดทับด้วย cover slip แล้วขยี้ (squeeze) เบา ๆ ด้วยมือ จากนั้นหยด สีย้อม acetocarmine 2 ไมโครลิตร ลงบนสไลด์ และใช้ไมโครปิเปตต์ดูดละอองเรณูที่ย้อมสีแล้วมาใส่บน Haemacytometer ปิดด้วย cover slip และตรวจนับละอองเรณูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า โดยสุ่มนับจำนวนเรณูเดี่ยว ๆ ในช่องตารางของ hemacytometer ที่มีขนาดเล็กที่สุดทั้งหมด 3 ช่อง ละอองเรณูที่มีชีวิตจะย้อมติดสีแดงสม่ำเสมอ ส่วนละอองเรณูที่ย้อมไม่ติดสีแดงหรือติดสีไม่สม่ำเสมอจัดเป็นละอองเรณูที่ไม่มีชีวิต และนำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตเทียบกับจำนวนละอองเรณูที่สุ่มนับทั้งหมด

การตรวจสอบการงอกของละอองเรณู

ตรวจดูการงอกของละอองเรณูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า โดยละอองเรณูที่งอกคือ ละอองเรณูที่มีการงอกของหลอดละอองเรณูยาวมากกว่าหรือเท่ากับเส้นผ่านศูนย์กลางของละอองเรณูนั้น ๆ โดยสุ่มนับจำนวนละอองเรณูที่แยกเป็นละอองเรณูเดี่ยว ๆ ในแต่ละ microscopic field จำนวนทรีทเมนต์ละ 3 field และคำนวณเปอร์เซ็นต์ความงอกของละอองเรณู เทียบกับจำนวนละอองเรณูที่สุ่มนับทั้งหมด

การศึกษาวิธีการแยกก้อนเรณูให้เป็นละอองเรณูเดี่ยว

นำก้อนเรณูจากดอกกล้วยไม้ทั้ง 3 พันธุ์ ที่บานแล้วเป็นเวลา 3 วัน มาใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ หลอดละ 1 ก้อน โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 กลุ่มทรีทเมนต์หลัก คือ การแยกเรณูโดยใช้สารเคมีและโดยวิธีกล ทำการทดลอง 5 ซ้ำ ซ้ำละ 4 กลุ่มเรณู

การแยกโดยใช้สารเคมีแบ่งเป็น 5 ทรีทเมนต์ คือ ย่อยด้วยเอนไซม์ 4 ชนิด คือ cellulase ความเข้มข้น 1% hemicellulase ความเข้มข้น 0.5% macerozyme ความเข้มข้น 1% และ pectinase ความเข้มข้น 0.2% แบ่งเวลาในการแช่ก้อนเรณู เป็น 4 ระยะ คือ การจุ่มยก (quick dip) และแช่นาน 5 10 และ 15 นาที แล้วล้างเอนไซม์ออกด้วยน้ำและ ทรีทเมนต์ที่ 5 ใช้สารละลาย formaldehye (37%) : acetic acid : alcohol (FAA) อัตราส่วน 1:1:9 โดยสุ่มกลุ่มเรณูแช่ในหลอดที่มีสารละลาย FAA หลอดละ 1 ก้อน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นผึ่งให้แห้งบนสไลด์ เติมน้ำกลั่น 8 ไมโครลิตร ขยี้ด้วยแท่งเหล็กและย้อมด้วยสี acetocarmine 2 ไมโครลิตร วางลงบน hemacytometer และปิดด้วย cover slip นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ตามกรรมวิธีที่ดัดแปลงจาก Luangsuwalai *et al*. (2008)

สำหรับการแยกโดยวิธีกลแบ่งเป็น 5 ทรีทเมนต์โดยการเขย่าด้วย Vortex (Vortex-Genie® 2, Scientific Industries) เป็นเวลา 10 นาที ที่ระดับความเร็ว 2 4 6 8 และ แยกโดยการขยี้ (squeezed) ด้วยมือ ทรีทเมนต์ที่แยกโดยใช้ Vortex ทำโดยเติมน้ำกลั่น 300 ไมโครลิตร ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นด้วยเครื่อง Vortex ที่ระดับความเร็วรอบต่าง ๆ หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงแบบ quick spin เพื่อตกตะกอน แล้วดูด

สารละลายส่วนบนออกให้เหลือเพียง 50 ไมโครลิตร จากนั้นกวนตะกอนที่เหลือแล้วดูดของเหลวที่มีละอองเรณูปนอยู่หยดลงบน hemacytometer และปิดด้วย cover slip นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า สำหรับการแยกโดยการขยี้นั้นทำโดยหยดน้ำกลั่น 5 ไมโครลิตร บนก้อนเรณูแล้วปิดทับด้วย cover slip และขยี้ด้วยมือเบา ๆ แล้วตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ บันทึกข้อมูลโดยนับจำนวนเรณูเดี่ยว ๆ ในช่องตารางขนาดเล็กที่สุดของ hemacytometer ทั้งหมด 3 ช่อง และคำนวณเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตและเปอร์เซ็นต์การงอกของละอองเรณูเทียบกับจำนวนละอองเรณูเดี่ยวทั้งหมด

การทดสอบวิธีการที่เหมาะสมสำหรับตรวจสอบการงอกของละอองเรณู

จากการศึกษาเอนไซม์ที่ดีที่สุดในการแยกก้อนเรณูให้ได้เป็นละอองเรณูเดี่ยว ๆ คือ วิธีการแยกโดยใช้เอนไซม์ hemicellulase ความเข้มข้น 0.5% ส่วนวิธีการแยกโดยใช้วิธีกลที่ดีที่สุด คือ การขยี้เบา ๆ ด้วยมือ ดังนั้นจึงได้เลือกวิธีการดังกล่าวมาทำการศึกษาต่อ เพื่อทดสอบวิธีการที่เหมาะสมสำหรับตรวจสอบการงอกของละอองเรณูหลังจากผ่านการแยกละอองเกสร โดยกำหนดทรีทเมนต์ในการทดสอบทั้งหมด 5 ทรีทเมนต์ คือ

1) นำก้อนเรณูคลุกใน stigma fluid และจุ่มในเอนไซม์ hemicellulase ความเข้มข้น 0.5% โดยวิธีจุ่มยก

2) นำก้อนเรณูจุ่มในเอนไซม์ hemicellulase ความเข้มข้น 0.5% โดยวิธีจุ่มยก และนำมาคลุกใน stigma fluid

3) นำก้อนเรณูไปขยี้ให้กระจายด้วยมือเบาๆ และนำมาคลุกใน stigma fluid

4) นำก้อนเรณูจุ่มในเอนไซม์ hemicellulase ความเข้มข้น 0.5% โดยวิธีจุ่มยก และนำมาคลุกใน stigma fluid แล้วขยี้ให้กลุ่มเรณูกระจายตัวด้วยมือเบา ๆ

5) นำก้อนเรณูจุ่มในน้ำเปล่า (control) ทั้งนี้การจุ่มยกในการทดลองนี้ไม่ล้างเอนไซม์ออก จากนั้นนำก้อนเรณูไปเพาะให้งอกบนอาหารวุ้นความเข้มข้น 0.7% ที่ไม่เติมน้ำตาล วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 4 ซ้ำ ซ้ำละ 4 ก้อนเรณู ทดสอบในกล้วยไม้หวายแคระ

ผลและวิจารณ์

อายุการบานของดอกกล้วยไม้ที่เหมาะสม

จากการศึกษาลักษณะทางกายภาพของเรณูกล้วยไม้ทั้ง 3 พันธุ์ (Figure 1) พบว่า ในระยะดอกตูมมีสีเหลืองอ่อน ลักษณะเรณูอวบน้ำ ไม่มีเชื้อราปกคลุม ตรวจพบก้อนเรณู 4 ก้อน เป็นก้อนเรณูที่เกาะติดกันแน่น และติดกับอับเรณูโดยมีเยื่อบาง ๆ คลุมอยู่ จึงทำให้การนำก้อนเรณูออกจากอับเรณูทำได้ยาก อย่างไรก็ตามจากการตรวจสอบความมีชีวิตพบว่า ก้อนเรณูมีชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการศึกษาในดอกบานวันแรกพบว่า ก้อนเรณูยังคงมีจำนวน 4 ก้อน แต่มีสีเหลืองเข้มขึ้น ลักษณะอวบน้ำลดน้อยลง และมีชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ แต่ยังคง มีเยื่อเมือกบาง ๆ ทำให้แกะออกจากอับเรณูยากเช่นกัน

สำหรับก้อนเรณูของดอกบานวันที่ 3 และ 5 พบว่า ก้อนเรณูยังคงมี 4 ก้อน ลักษณะเรียวรี สีเหลืองเข้มขึ้น และมีชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีเยื่อเมือกทำให้แกะออกจากอับเรณูได้ง่าย เหมาะสำหรับใช้ในการผสมพันธุ์ ส่วนในดอกบานวันที่ 7 ยังมีเรณู 4 ก้อน แต่ในวันที่ 15 นั้น บางดอกก้อนเรณูหลุดหายไปบางส่วน มีสีเหลืองเข้มมากที่สุด ลักษณะเรียวรี เริ่มมีเชื้อราเกาะบริเวณก้อนเรณูซึ่งทำให้เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตลดลง ซึ่งดอกบานวันที่ 15 มีเชื้อราเกาะเรณูมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ และความมีชีวิตลดลงเหลือเพียง 50 เปอร์เซ็นต์

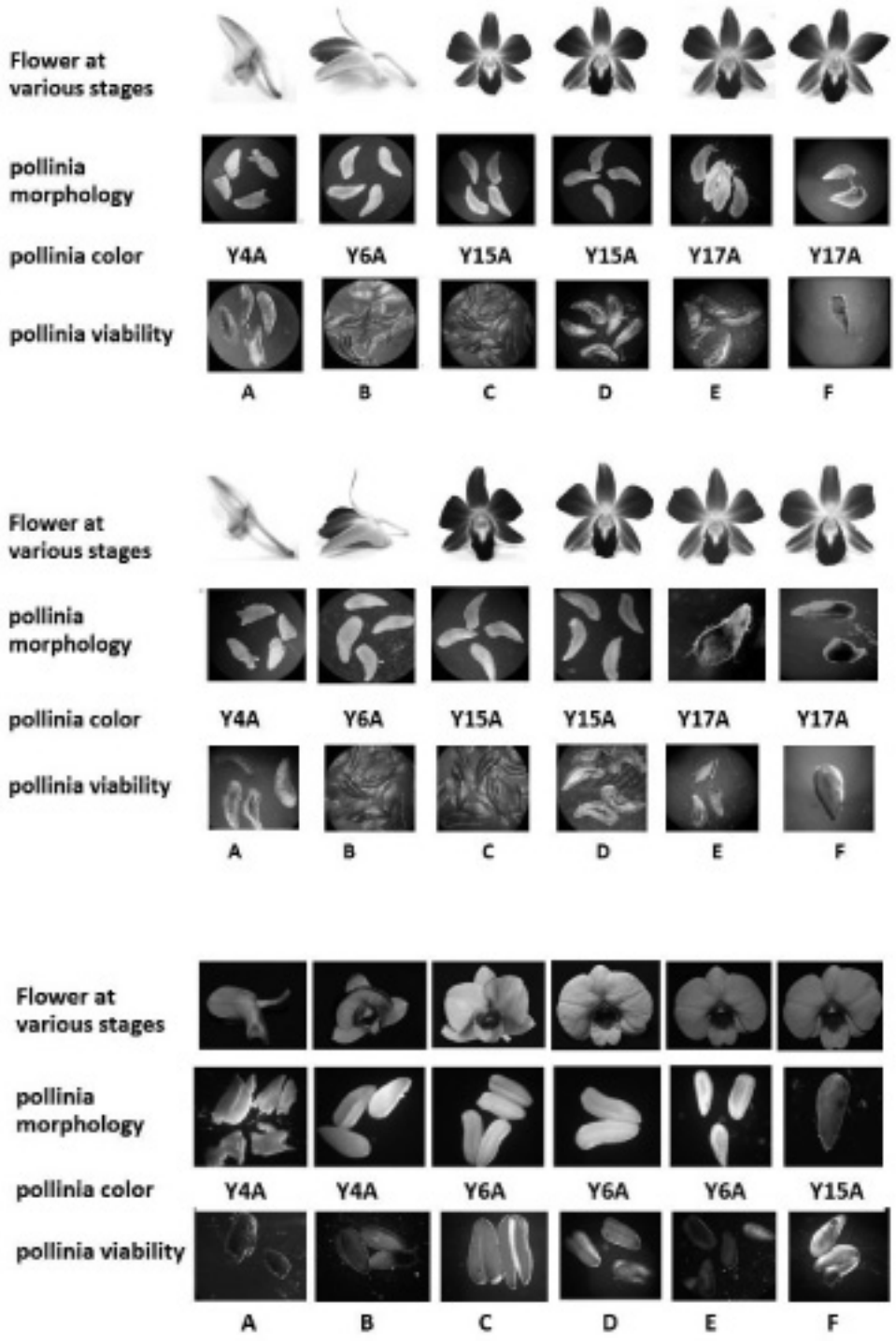

Figure 1 Pollinia of *Dendrobium* Sonia 'Earsakul' (Top) 'BOM 17' (Middle) and dwarf type *Dendrobium* (Bottom) at various stages: bud (A), 1st day bloom (B), 3rd day (C), 5th day (D), 7th day (E) and 15th day (F). The color of pollinia was verified by the Royal Horticultural Society color chart. The pollinia viability was determined by 1% acetocarmine staining.

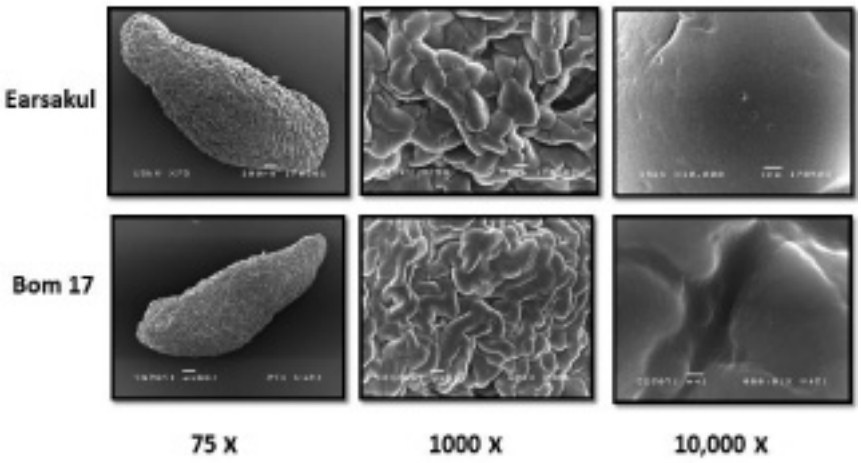

Figure 2 Pollinia of *Dendrobium* Sonia 'Earsakul' and 'BOM17' at the 3rd day of blooming stage magnified by scanning electron microscope

เมื่อตรวจสอบลักษณะของเรณูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (Figure 2) ซึ่งทำในกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุล และพันธุ์บอม17 ด้วยกำลังขยาย 75 เท่า พบว่า ก้อนเรณูกล้วยไม้มีลักษณะเป็นเรณูประกอบ หรือที่เรียกว่า compound pollen ขนาดยาวประมาณ 200 ไมโครเมตร โดย 1 ก้อนเรณูจะประกอบไปด้วยละอองเรณูขนาดประมาณ 1.2 ไมโครเมตร อัดแน่นหลายร้อยละอองเรณู ซึ่งแต่ละละอองเรณูไม่มีรูปทรงที่แน่ชัด พื้นผิวของละอองเรณูเรียบคล้ายก้อนขี้ผึ้ง เมื่อกดทำให้เสียรูปทรงได้

สูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการงอกของละอองเรณู

จากการตรวจสอบความมีชีวิตของละอองเรณูในกล้วยไม้สกุลหวาย 3 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์หวายแคระ พันธุ์เอียสกุล และพันธุ์บอม17 โดยวิธีการย้อมด้วยสี acetocarmine ความเข้มข้น 1% พบว่า กล้วยไม้ทั้ง 3 พันธุ์มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตเท่ากับ 100% (Table 1)

สำหรับการตรวจสอบการงอกของละอองเรณูโดยการเพาะบนอาหารสังเคราะห์ทั้งหมด 11 สูตร (Table 1 and Figure 3) พบว่า ละอองเรณูกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์หวายแคระงอกได้ดีที่สุด โดยการเพาะในสูตรอาหารวุ้นที่ไม่เติมน้ำตาลซูโครสมีเปอร์เซ็นต์ความงอกสูงสุดคือ 50.41% รองลงมาคืออาหารอาหารวุ้นที่เติมน้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้น 2% มีเปอร์เซ็นต์ความงอกเท่ากับ 24.54% ส่วนการเพาะบนอาหารสังเคราะห์สูตร Brewbaker and Kwack (1963) และอาหารวุ้นที่เติมน้ำตาลซูโครสมีความงอกน้อยมากอยู่ในช่วง 0.25% – 5.03% เท่านั้น นอกจากนี้ยังพบว่า อาหารสังเคราะห์สูตร BK ที่เติมน้ำตาลซูโครส 20% ละอองเรณูมีรูปร่างคงเดิมเหมือนเมื่อเริ่มเพาะและไม่พบการงอกของหลอดละอองเรณู (Figure 3A) ส่วนในกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอียสกุล และ พันธุ์บอม17 พบว่า การเพาะในอาหารทุกสูตร ละอองเรณูมีการงอกน้อยมาก อยู่ในช่วงประมาณ 0.46% – 6.5% เท่านั้น นอกจากนี้ยังพบการแตก และการฟีบเล็กลงจากปกติของละอองเรณูเกิดขึ้นค่อนข้างมากอีกด้วย (Figure 3 A and B)

จากการทดสอบความมีชีวิตของละอองเรณูโดยการย้อมสีด้วย acetocarmine และพบว่า มี

เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูงมากคิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อนำละอองเรณูมาทดสอบความงอกบนอาหารสังเคราะห์สูตรต่าง ๆ พบว่าเปอร์เซ็นต์การงอกน้อยกว่านั้น เนื่องจากการทดสอบความมีชีวิตของละอองเรณูโดยการย้อมสี เป็นเพียงการทำปฏิกิริยากันระหว่างสารเคมีที่เป็นสีย้อมกับไซโตพลาสซึมของละอองเรณู ซึ่งมี peroxidase enzyme ที่สามารถทำปฏิกิริยากับสีย้อมได้ดีจึงติดสีย้อมได้ อีกทั้งภายในละอองเรณูยังคงมีองค์ประกอบทางเคมีสูงเพียงพอที่จะให้ผลบวกกับสีย้อม แต่การงอกหลอดละอองเรณูจำเป็นต้องมีองค์ประกอบอื่นที่สมบูรณ์มากกว่า จึงทำให้การทดสอบความมีชีวิตของละอองเรณูไม่สามารถบ่งบอกถึงความมีชีวิตของละอองเรณูได้ถูกต้องแม่นยำนัก นอกจากนี้การงอกของละอองเรณูบนอาหารสังเคราะห์ยังขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ ได้แก่ อายุของละอองเรณู องค์ประกอบและปริมาณอาหารที่เพาะเลี้ยง พันธุกรรม อุณหภูมิ และความชื้นสัมพัทธ์ เป็นต้น (Shivanna, 2003)

อย่างไรก็ตาม ละอองเรณูที่เพาะบนอาหารวุ้นที่ไม่เติมน้ำตาลซูโครสแต่สามารถงอกได้ดีนั้น อาจเนื่องจากการนำก้อนเรณูคลุกลงใน stigma fluid ก่อนเพาะ สารอาหารจาก stigma fluid ที่อยู่บนยอดเกสรตัวเมียช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของละอองเรณู โดยใน stigma fluid มีน้ำตาลซูโครสเป็นส่วนประกอบหลัก (Shivanna, 2003) แต่สำหรับพันธุ์เอียสกุล และพันธุ์บอม17 นั้น การใช้ stigma fluid ร่วมกับการเพาะในอาหารสูตรต่างๆ ทุกสูตรที่ทดสอบไม่สามารถกระตุ้นให้ละอองเรณูงอกได้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากปัญหาทางพันธุกรรม เนื่องจากเมื่อพิจารณาความแตกต่างของพันธุ์กล้วยไม้ที่มีผลต่อการงอกของละอองเรณูนั้น ในภาพรวมพบว่า พันธุ์หวายแคระมีการงอกดี ซึ่งสอดคล้องกับการสังเกตตามธรรมชาติว่าพันธุ์ในกลุ่มนี้ติดฝักได้ดี ส่วนพันธุ์บอม17 และพันธุ์เอียสกุลนั้นเป็นพันธุ์ที่มีกำเนิดมาจากการกลายพันธุ์ที่มีที่มาจากสายพันธุกรรมหลักเดียวกัน และข้อมูลจากการสอบถามจากผู้ปลูกเลี้ยงกล้วยไม้พบว่าทั้งสองพันธุ์มีการติดฝักน้อยมาก แม้ว่าจะมีการผสมด้วยมือก็ตาม รวมทั้งผลจากงานวิจัยของ Sornchai *et al*. (2016) ซึ่งได้ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอของกล้วยไม้ด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ พบว่า กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์แท้ คือ *Dendrobium bigibbum* var *compactum* ซึ่งเป็นกล้วยไม้พันธุ์แท้มีจีโนม 2 ชุด มีปริมาณดีเอ็นเอ 1.85 พิโคกรัม/2C ส่วนพันธุ์บอม17 และพันธุ์เอียสกุล มีปริมาณดีเอ็นเอ 2.15 และ 3.59 พิโคกรัม/2C แสดงว่าทั้งสองพันธุ์มีจีโนมมากกว่า 2 ชุด จึงอาจส่งผลให้การงอกของเรณูลดลง

สำหรับการเหี่ยวหรือแตกของละอองเรณูนั้นเป็นผลมาจากค่า water potential ในอาหาร ซึ่งถ้ามีค่าใกล้เคียงกับในไซโตพลาสซึมของละอองเรณูจะทำให้การเคลื่อนที่ของน้ำเข้าสู่เซลล์ละอองเรณูเป็นไปได้ยาก หรือถ้าในอาหารมี water potential ต่ำกว่าอาจทำให้น้ำในละอองเรณูเคลื่อนที่ออกสู่อาหาร จึงทำให้ละอองเรณูเหี่ยวฟีบ และยังมีผลทำให้การงอกและขยายหลอดละอองเรณูเป็นไปได้ยากเนื่องจากละอองเรณูไม่สามารถดูดน้ำเข้าไปได้ ส่วนการแตกของละอองเรณูเกิดขึ้นเนื่องจากในอาหารสังเคราะห์มีค่า water potential สูงกว่าในละอองเรณูหรือมีค่าแรงดันออสโมติกของน้ำสูงกว่าในละอองเรณูมาก จึงมีการเคลื่อนที่ของน้ำเข้าสู่ละอองเรณูในปริมาณมากเกินไปจนกระทั่งเกิดการแตกของละอองเกสรขึ้น ซึ่งส่งผลให้มีเปอร์เซ็นต์การงอกที่ต่ำลงไปด้วย (Shivanna and Rangaswamy, 1992) ซึ่งพบได้จากการที่ละอองเรณูพันธุ์หวายแคระไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงเมื่อเพาะในอาหารที่มีระดับน้ำตาลซูโครส 20% และในพันธุ์บอม17 เพาะบนอาหารสูตร Brewbaker and Kwack (1963) ที่เติมน้ำตาลซูโครส 20% ที่มีลักษณะเหี่ยวฟีบ ส่วนใน พันธุ์เอียสกุล มีละอองเรณูแตกเมื่อเพาะบนอาหารวุ้นที่เติมน้ำตาลซูโครส 15%

Table 1 Pollen viability of 3 *Dendrobium* cultivars determined by 1% acetocarmine staining and pollen germination at 72 hr germinated in various pollen germination media in the dark condition

Pollen germination media	Pollinia viabilty / pollen germination		
	Dwarf type	'Earsakul'	'BOM 17'
Brewbaker and Kwack + 0.7% agar	100 / 0.49	100 / 0.94	100 / 0.52
Brewbaker and Kwack + 0.7% agar + 2% sucrose	100 / 5.03	100 / 0.46	100 / 1.97
Brewbaker and Kwack + 0.7% agar + 5% sucrose	100 / 4.75	100 / 1.07	100 / 0.92
Brewbaker and Kwack + 0.7% agar + 10% sucrose	100 / 3.95	100 / 0.52	100 / 2.71
Brewbaker and Kwack + 0.7% agar + 15% sucrose	100 / 0.39	100 / 0.68	100 / 0.71
Brewbaker and Kwack + 0.7% agar + 20% sucrose	100 / 0.00	100 / 0.62	100 / 0.60
Water+ 0.7% agar	100 / 50.41	100 / 1.01	100 / 1.18
Water+ 0.7% agar + 2% sucrose	100 / 24.54	100 / 2.20	100 / 0.49
Water+ 0.7% agar + 5% sucrose	100 / 4.62	100 / 1.53	100 / 2.81
Water+ 0.7% agar + 10% sucrose	100 / 0.39	100 / 1.08	100 / 6.53
Water+ 0.7% agar + 15% sucrose	100 / 0.25	100 / 0.69	100 / 0.59

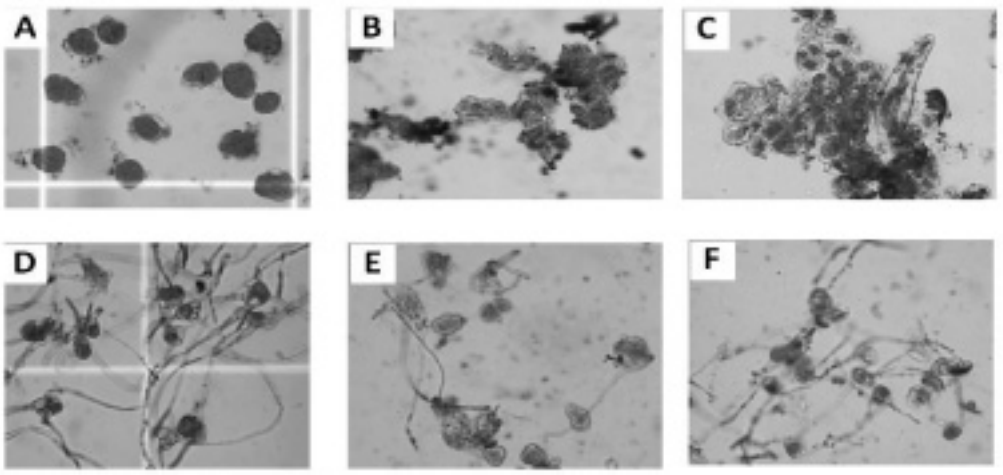

Figure 3 The viable pollens of dwarf type *Dendrobium* stained by 1% acetocarmine (A). The damaged pollens of *Den.* Sonia 'Earsakul' on agar medium containing 15% sucrose (B). The plasmo lyzed pollens of *Den.* Sonia 'BOM 17' observed on Brewbaker and Kwack (1963) medium containing 20% sucrose (C). The germination of pollen observed at 72 hr on synthetic medium; dwarf type *Dendrobium* (D) *Den.* Sonia 'Earsakul' (E) *Den.* Sonia 'BOM 17' (F).

การศึกษาวิธีการย่อยกลุ่มเรณูที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบการงอกของละอองเรณู

การศึกษาการแยกกลุ่มเรณูของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์หวายแคระให้ได้เป็นละอองเรณูเดี่ยวๆ โดยการใช้สารเคมี พบว่า วิธีการที่สามารถแยกให้ได้ละอองเรณูเดี่ยวๆ ได้ดีที่สุด คือ การแช่ในเอนไซม์ hemicellulase ความเข้มข้น 0.5% นาน 15 นาที โดยละอองเรณูที่ได้มีความความสมบูรณ์มาก รองลงมาได้แก่ การใช้เอนไซม์ macerozyme ความเข้มข้น 1% และ cellulase ความเข้มข้น 1% ส่วนการใช้ pectinase ความเข้มข้น 0.2% และ FAA นั้นแยกได้น้อยมาก และสำหรับช่วงเวลาที่ใช้ในการแช่กลุ่มเรณูในเอนไซม์ hemicellulase ความเข้มข้น 0.5% ที่สามารถแยกละอองเรณูเดี่ยว ๆ ได้ดีที่สุด คือ 15 นาที รองลงมาได้แก่ 10 นาที 5 นาที ตามลำดับ (Figure 4) ส่วนการแยกกลุ่มเรณูโดยวิธีกล พบว่า วิธีการที่สามารถแยกให้ได้ละอองเรณูเดี่ยวๆได้ดีที่สุดคือ การขยี้ด้วยมือ (Figure 5) และการศึกษาความมีชีวิตของละอองเรณูโดยวิธีการย้อมด้วย acetocarmine ละอองเรณูเดี่ยว ๆ ที่มีลักษณะสมบูรณ์ ที่ได้จากการแยกก้อนเรณูโดยวิธีต่าง ๆ มีความมีชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์

ในการใช้เอนไซม์ในการย่อยนั้นยังมีปัจจัยอื่นที่เกี่ยวข้องด้วย ได้แก่ ความเข้มข้นของเอนไซม์ อุณหภูมิ pH ของสารละลาย และแสง นอกจากนี้ระยะเวลาที่ใช้ในการแช่กลุ่มเรณูในเอนไซม์ก็มีผลต่อการแยกละอองเรณูด้วยเช่นกัน ซึ่งหากใช้เวลาในการแช่นานก็จะสามารถย่อยกลุ่มเรณูให้เป็นละอองเรณูเดี่ยว ๆ ได้ปริมาณมากขึ้น ซึ่งเห็นได้ชัดเจนจากการแช่กลุ่มเรณูในเอนไซม์นานขึ้นพบว่า เรณูถูกย่อยออกมาได้มากขึ้น อย่างไรก็ตามหากใช้เวลานานเกินไปก็จะส่งผลให้ผนังเซลล์ถูกย่อยจนหมดเหลือเพียงเยื่อหุ้มเซลล์บางๆที่เรียกว่าโปรโตพลาสต์ แต่สำหรับการย่อยกลุ่มเรณูอาจส่งผลเชิงลบต่อการงอกของหลอดเรณูได้

สำหรับการแยกก้อนเรณูโดยใช้สารละลาย FAA (อัตราส่วน 1:1:9) พบความเสียหายของละอองเรณู และมีออร์แกแนลล์บางส่วนของละอองเรณูหลุดออกมา ทั้งนี้เนื่องจากสารละลายชนิดนี้มีแอลกอฮอล์และกรดแอซีติกเป็นส่วนประกอบ ทำให้เซลล์เหี่ยวเนื่องจากเสียน้ำ นิวเคลียสตกตะกอน ออร์กาแนลล์ถูกทำลาย และเนื้อเยื่อแข็งตัว เมื่อนำมาขยี้จึงทำให้ให้เซลล์แตกได้

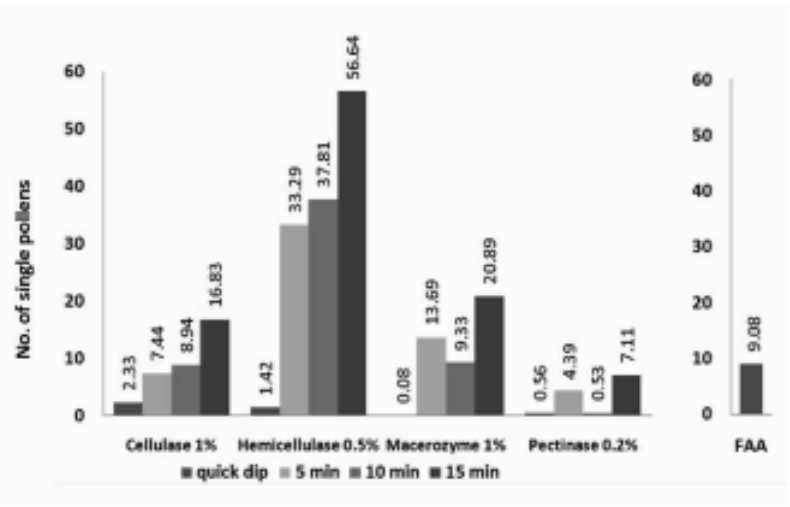

Figure 4 The number of single pollens of dwarf type *Dendrobium* resulted from various protocols of pollinia digestion

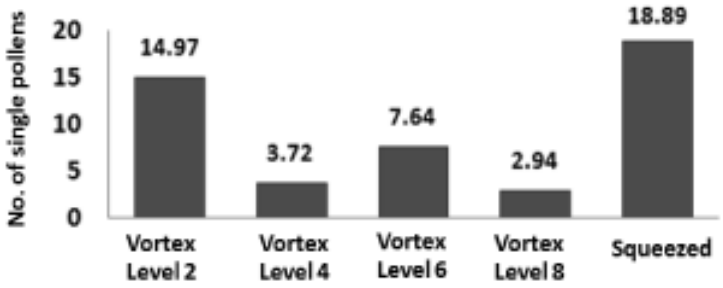

Figure 5 The number of single pollens of dwarf type *Dendrobium* resulted from various mechanical pollen separation techniques

จากการที่พบว่า วิธีการแยกเรณูที่ดีที่สุดคือ การย่อยก้อนเรณูด้วย เอนไซม์ hemicellulase ความเข้มข้น 0.5% เป็นเวลา 15 นาที หรือใช้วิธีการขยี้ด้วยมือ และจากวิธีการเพาะให้งอกที่กล่าวมาแล้วข้างต้น จึงได้ทดสอบวิธีการที่เหมาะสมสำหรับเพาะและตรวจสอบการงอกของเรณู โดยเปรียบเทียบการใช้ hemicellulase และการขยี้ ซึ่งจัดทรีทเมนต์ทั้งสิ้น 5 วิธีการ ตาม (Table 2) โดยในการทดลองนี้เลือกใช้วิธีจุ่มยกโดยไม่ล้างเอนไซม์ออกแทนการแช่เป็นเวลา 15 นาที ดังนั้นเอนไซม์จะยังเคลือบอยู่ที่ผิวกลุ่มเรณูขณะเพาะให้งอก หลังจากนั้นนำกลุ่มเรณูมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร พบว่า การนำกลุ่มเรณูมาคลุกใน stigma fluid แล้วแยกโดยใช้เอนไซม์ hemicellulase ความเข้มข้น 0.5% และ การแยกกลุ่มเรณูโดยใช้เอนไซม์ hemicellulase ความเข้มข้น 0.5% แล้วนำมาคลุกใน stigma fluid นั้น ทั้งสองวิธีการทำให้เรณูแยกออกมาได้ดีมี และมีการงอกของหลอดเรณูสูงคือ 76.17 และ 73.99 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนวิธีการอื่น ๆ ไม่พบการงอกของหลอดเรณู (Table 2)

Table 2 The germination of dwarf type *Dendrobium* pollens after separated by various procedure followed by germinated on agar medium (0.7% agar) for 72 hr in the dark condition

Procedure for pollen separation	Germination (%)
Coated with stigma fluid then quick dip in 0.5% hemicellulase	76.17
Quick dip in 0.5% hemicellulase then coated with stigma fluid	73.99
Hand squeeze then coated with stigma fluid	0.00
Quick dip in 0.5% hemicellulase then coated with stigma fluid followed by hand squeeze	0.00
Quick dip sterile indistilled water	0.00

สรุป

วิธีการที่เหมาะสมในการตรวจสอบความมีชีวิตและการงอกของละอองเรณูกล้วยไม้ซึ่งเป็นเรณูแบบ compound ที่ละอองเรณูอัดตัวกันแน่นซึ่งเรียกว่า pollinia นั้น ควรเลือกก้อนเรณูจากดอกที่บานแล้วเป็นเวลา 3 – 5 วัน แล้วแยกละอองเรณูโดยนำกลุ่มเรณูมาคลุกใน stigma fluid แล้วนำไปจุ่มในเอนไซม์ hemicellulase ความเข้มข้น 0.5% หรือทำสลับขั้นตอนกัน จากนั้นนำมาเพาะให้งอกบนอาหารวุ้นความเข้มข้น 0.7% ที่ไม่เติมน้ำตาล เป็นเวลา 72 ชั่วโมงในที่มืด แล้วตรวจสอบความมีชีวิตโดยการย้อมสี acetocarmine หรือตรวจสอบการการงอกของละอองเรณูภายใต้กล้องจุลทรรศน์

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและการวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ และได้รับงบประมาณบางส่วนจากโครงการสนับสนุนปัญหาพิเศษระดับปริญญาตรี สาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารอ้างอิง

Brewbaker, J.L. and P.M. Kwack. 1963. The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. Amer. J. Bot. 56: 859 – 865.

Devey, M.R., P. Anthony, J.B. Power and K.C. Lowe. 2005. Plant protoplast : status and biotechnological perspectives. Biotechnol. Adv. 23: 131 – 171.

Ketsa, S. and A.Wisutiamonkul. 2013. Role of stigma fluid in ovary growth and senescence of pollinate *Dendrobium* flowers. Eur. J. Envir. Sci. 3(1): 43 – 47.

Lack, A.J. and Diaz, A. 1990. The pollination of *Arum maculatum* L. – a historical review and new observations. Watsonia 18: 333 – 342.

Luangsuwalai, K., S. Ketsa, A. Wisutiamonkul and W.G. van Doorn. 2008. Lack of visible post - pollination effects in pollen grains of two *Dendrobium* cultivars: relationship with pollinia ACC, pollen germination, and pollen tube growth. Func. Plant Bio. 35: 152 – 158.

Shivanna, K.R. 2003. Pollen biology and biotechnology. Science Publishers, Inc. Enfield, NH, USA.

Shivanna, K.R. and N.S. Rangaswamy. 1992. Pollen biology : A laboratory manual. Springer - Verlag New York, Berlin, Heidelberg, Germany.

Sornchai, P., W. Khampong and S. Chanprame. 2016. The nuclear DNA content and pollen viability of 25 *Dendrobium* cultivars. Agr. Sci. J. 47(2): 227 – 240.

Stort, M.N.S. and G.de L.Galdino, 1984. Self- and cross-pollination in some species of the geneus *Laelia* Lindl. (Orchidaceae). Brazilian J. Genet. 7: 671 – 676