

การเลี้ยงเนื้อเยื่ออ่อนในสภาพปลอดเชื้อ :I. อิทธิพลของสาร เร่งการเจริญเติบโตต่อการเจริญและพัฒนาของเนื้อเยื่อ

Sugarcane Tissue Culture : I.Influences of Growth

Regulators on Tissue Growth and Development

ไพบุลย์ กวินเลิศวัฒนา¹ - บุญเรือง โพธิ์เจริญ² - ทนง พรประดับเกียรติ³ - และอุทัย จารณศรี⁴

Paiboolya Gravinlertvatana, Boonthuang Bhocharoen, Tanong Pornpradapkiat
and Uthai Jaranasri

ABSTRACT

Shoot tips, lateral buds and young leaves which were cultured on media containing Murashige and Skoog (MS) and macro and microelements, 1 or 3 ppm 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 10% (v/v) young coconut water (CW) produced calli and shoots. Medium containing 3 ppm 2,4-D tended to induce larger size of callus and more shoots than medium containing , 1 ppm 2,4-D, while medium containing no 2,4-D did not or slightly promote callus formation. A 6-furfurylamino purine (kinetin) at 0.1 ppm supplemented in the medium, instead of CW 10% (v/v), promoted callus and shoot formation but at a lesser extent than CW. Similarly, the effect of 3-Indoleacetic acid at 1 ppm could not replace the effect of 2,4-D at 1 ppm whether CW or Kinetin was included or not. Meanwhile, sucrose at 30 gm per liter in the medium promoted better root formation and growth than sugar at 20 gm per liter.

-
1. อาจารย์ภาควิชาพืชสวน, คณะเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กทม.
 2. วิทยาเขตเกษตรปทุมธานี ปทุมธานี
 3. นิสิตปริญญาโท ภาควิชาพืชสวน, คณะเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กทม.
 4. บริษัทบางกอกฟลาวเวอร์เซ็นเตอร์, หนองแขม, กทม.

บทคัดย่อ

การทดลองเลี้ยงตายอด, ตาข้างและใบอ่อน อ้อยในสภาพปลอดเชื้อเพื่อชักนำให้เนื้อเยื่อเกิดแคลลัสและยอดโดยใช้อาหารแข็งประกอบด้วยธาตุอาหารหลัก (macroelements) และธาตุอาหารรอง (microelements) ของ Murashige และ Skoog (MS), 1 หรือ 3 ppm 2,4-D และ 10% (ปริมาตร/ปริมาตร) น้ำมะพร้าวอ่อน (CW) ผลการทดลอง ปรากฏว่า ความเข้มข้นของ 2,4-D 3 ppm มีแนวโน้มที่จะชักนำให้เนื้อเยื่อเกิดแคลลัสและยอดได้ดีกว่า ความเข้มข้น 1 ppm ส่วนอาหารที่ไม่มี 2,4-D ผสมอยู่ จะชักนำให้เนื้อเยื่อเกิดแคลลัส และยอดได้น้อยหรือไม่เกิดเลย ส่วน 6-furfurylamino purine (kinetin) ในระดับความเข้มข้น-

0.1 ppm ไม่สามารถใช้ทดแทนน้ำมะพร้าวอ่อน (10%) ได้ในทำนองเดียวกัน ความเข้มข้น 1 ppm ของ 3-Indoleacetic acid (IAA) ไม่สามารถใช้แทน 2,4-D ในระดับความเข้มข้น 1 ppm ได้ ไม่ว่าจะมีน้ำมะพร้าวอ่อน หรือ Kinetin ผสมอยู่ด้วย นอกจากนี้ อาหารที่มีน้ำตาล 30 กรัมต่อลิตรจะช่วยให้ต้นอ้อยออกรากดีและแข็งแรงกว่าอาหารที่มีน้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร

เนื้อเยื่อส่วนที่เจริญเป็นแคลลัสและยอดได้ดี ได้แก่ ตายอดและใบอ่อนซึ่งขึ้นอยู่กับพันธุ์อ้อย เนื้อเยื่ออ้อยพันธุ์ F140 จะเจริญได้ดีกว่าเนื้อเยื่ออ้อยพันธุ์ F156 และ Q83

คำนำ

อ้อยเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญโดยการทำเป็นน้ำตาล ปัจจุบันน้ำตาลเป็นสินค้าทั้งภายในและภายนอกประเทศ ซึ่งจัดเป็นสินค้าที่หารายได้จากการส่งออกเป็นอันดับสามรองจากข้าว และมันสำปะหลัง อุตสาหกรรมน้ำตาลได้ขยายการผลิตเพิ่มขึ้นมากกว่าปีก่อน ๆ แต่ปริมาณน้ำตาลที่ผลิตเพิ่มมากขึ้นนี้ได้จากการขยายเนื้อที่ในการปลูกอ้อยมากกว่าการเพิ่มผลผลิตต่อไร่ ปริมาณผลผลิตและคุณภาพยังอยู่ในเกณฑ์ที่ดี สาเหตุหนึ่งก็เนื่องมาจากยังขาดพันธุ์ที่ให้ผลผลิตและคุณภาพสูง รวมทั้งปัญหาเกี่ยวกับโรคและแมลงที่ทำให้คุณภาพและผลผลิตลดลง ดังนั้นการพัฒนาอุตสาหกรรมน้ำตาล วิธีหนึ่งคือ การปรับปรุงพันธุ์อ้อยให้

มีคุณภาพ และผลผลิตสูงมีความต้านทานต่อโรคและแมลง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออ้อยเป็นวิธีหนึ่งที่ใช้เป็นวิธีการปรับปรุงพันธุ์อ้อย Muir, Hilderbrandt and Riker (1954) ได้ทำการเลี้ยงเนื้อเยื่ออ้อยพันธุ์ H50-7209 เป็นเซลล์เดี่ยว (Single cell) และเมื่อนำเซลล์เดี่ยวมาเลี้ยงให้เกิดเป็นแคลลัส, แคลลัสแต่ละกลุ่มจะมีลักษณะต่าง ๆ กัน และเมื่อตรวจสอบพบว่า แคลลัสเหล่านี้มีจำนวน chromosome ต่างกัน ดันที่ได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อครั้งนี้บางต้นมีความต้านทานต่อโรค Mosaic นอกจากนี้ Reinert and Bajaj (1977) ได้รายงานว่า ดันอ้อยที่ได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อของพันธุ์ Pinda ซึ่งเคยอ่อนแอต่อโรค Fiji ต้านทานต่อโรคนี้ได้ ให้ผลผลิตสูงขึ้น และเปอร์เซ็นต์น้ำตาลสูง

ขึ้นด้วย จึงเห็นได้ว่าต้นอ้อย ที่ได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อนี้อาจจะมีลักษณะเปลี่ยนแปลงไปจากเดิมได้ การคัดเลือกพันธุ์ เพื่อให้ได้ต้นที่ดี จึงมีแนวโน้มที่จะเป็นไปได้ ซึ่งควรจะได้นามศึกษาในประเทศไทยต่อไป

อย่างไรก็ดี การเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อให้บรรลุความสำเร็จนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการเช่นอาหารที่เลี้ยงเนื้อเยื่อ (Skoog and Miller, 1957; Murashige and Skoog, 1962; Murashige, 1974). อัตราส่วนของ auxin ต่อ cytokinin (Skoog and Miller, 1957) ปริมาณน้ำตาลในอาหาร (Hilderbrandt and Riker, 1953) ภาพแวดล้อม (Murashige, 1974) ชนิดของเนื้อเยื่อ (Nickell, 1964; Murashige, 1974; Reinert and Bajaj, 1977) พันธุ์พืช (Murashige, 1974) และอื่น ๆ ฉะนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจศึกษาปัจจัยเกี่ยวข้องกับการเลี้ยงเนื้อเยื่ออ้อยในประเทศไทย เพื่อเป็นพื้นฐานในการศึกษาขั้นต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การทดลองที่ 1 : ลอกกาบใบของยอดอ้อยพันธุ์ F140, F156 และ Q83 ที่มีตาข้าง ติดอยู่ 4-5 ตาออกให้เหลือใบอ่อนหุ้มตายอดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.3 ซม. ตัดเอาตาข้างออกแยกไว้ส่วนหนึ่งใช้มัดติดใบอ่อนบริเวณใกล้ ๆ ตายอดออกเป็นท่อน ๆ ยาวท่อนละ 0.5 ซม. ตัดเอาตายอดออกมา หลังจากนั้นนำเนื้อเยื่อทั้งหมดโดยแยกออกเป็นชนิดของเนื้อเยื่อ คือ ตาข้าง, ใบอ่อน และตายอด แช่ในน้ำยาฆ่าเชื้อโรคที่มีส่วนผสมของโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaOCl) 0.525% นาน 15 นาที ล้างน้ำยาฆ่าเชื้อโรคออกจากชิ้นเนื้อเยื่อโดยใช้ปากคีบ (forcep) ที่ลนไฟฆ่าเชื้อโรคแล้ววางลงบนอาหารแข็งประกอบด้วย สูตรอาหาร MS (Murashige and Skoog, 1962) มี 0.1 หรือ 3 ppm 2,4-D และ 10% (ปริมาตร/ปริมาตร) น้ำมะพร้าวอ่อนผสมอยู่อาหารนี้มี pH เท่ากับ 5.8 + 0.1 ซึ่งปรับโดยใช้ 1 N KOH หรือ 1 N HCL และได้ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อโรคที่ 121 ซ° (หรือเท่ากับ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) เป็นเวลา 15 นาที แล้วทิ้งไว้ให้เย็นก่อนที่จะนำมาใช้ ขวดที่เลี้ยงเนื้อเยื่อนำ

ไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 27-30 ซ° โดยให้แสงประมาณ 120 แรงเทียน (foot candle) ด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์ (fluorescence)

การทดลองที่ 2 : การทดลองเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 แต่อาหารที่ใช้ประกอบด้วยสูตรอาหารของ MS, มี 1 ppm 2,4-D หรือ 1 ppm IAA และ 10% (ปริมาตร/ปริมาตร) น้ำมะพร้าวอ่อนหรือ 0.1 ppm kinetin ผสมอยู่

การทดลองที่ 3 : ตัดต้นอ้อยพันธุ์ F140 ที่ได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง ซึ่งประกอบด้วยสูตรอาหาร MS 3 ppm 2,4-D และ 10% (ปริมาตร/ปริมาตร) น้ำมะพร้าวอ่อนมาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS, 10% (ปริมาตร/ปริมาตร) น้ำมะพร้าวอ่อนและ/หรือ 0.5 ppm kinetin และน้ำตาลทราย 20 หรือ 30 กรัม ตอลิตรเป็นองค์ประกอบ

ผล

สูตรอาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัสและยอดได้ดี (การทดลองที่ 1) นั้นได้แก่สูตรอาหารที่มีส่วนผสมของ 2,4-D เข้มข้น 3 ppm เนื้อเยื่อทุกชนิดของ F 140 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่เจริญได้ดีที่สุดในจำนวน 3 พันธุ์ที่ทำการทดลอง มีการเจริญเติบโตใกล้เคียงกันเมื่อเลี้ยงบนอาหารชนิดเดียวกัน แต่เมื่อความเข้มข้นของ 2,4-D ในอาหารเพิ่มขึ้นเป็น 3 ppm เนื้อเยื่ออ้อยพันธุ์ F140 จะเจริญเป็นแคลลัสและยอดได้ดีกว่าที่ 1 ppm 2,4-D ส่วน F 156 นั้นเนื้อเยื่อที่เลี้ยงบนอาหารที่มี 1 ppm 2,4-D จะเจริญเป็นแคลลัส ใบอ่อนมีการเจริญได้ไม่ดีเท่าตายอดและตาข้าง ขณะเดียวกัน Q 83 ซึ่งเป็นพันธุ์อ้อยที่มีการเจริญเติบโตบนอาหารน้อยที่สุดจะมีแคลลัสและ/หรือยอดเกิดขึ้นบนชิ้นส่วนน้อยกว่าพันธุ์อื่น ๆ ไม่ว่าจะเป็นเลี้ยงบนอาหารชนิดใด (ตารางที่ 1) เมื่อใช้ kinetin 0.1 ppm แทนน้ำมะพร้าว 10% หรือใช้ IAA แทน 2,4-D 1 ppm (การทดลองที่ 2) โดยมีน้ำมะพร้าว หรือ kinetin ผสมอยู่ทำให้การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อช้ากว่า

การใช้ 1 ppm 2,4-D และ 10% น้ำมะพร้าวผสมลงในอาหาร (ตารางที่ 2)

ปริมาณน้ำตาล 30 กรัมต่อลิตรในอาหาร (การทดลองที่ 3) จะช่วยให้รากเกิดขึ้นจากต้นอ้อยได้ดีกว่าน้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร กล่าวคือ น้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร จะทำให้ต้นอ้อยออกรากดี (good) ถึง 45 % ขณะเดียวกันทำให้มีต้นอ้อยออกรากไม่ดี (poor) เพียง 7.5% เมื่อเทียบกับน้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร ซึ่งทำให้ต้นอ้อยออกรากดีเพียง 12.5% และออกรากไม่ดีถึง 17.5% ส่วนการเพิ่ม 0.5 ppm kinetin ลงในอาหารทำให้ต้นอ้อยออกรากไม่ดี ไม่ว่าใส่น้ำตาลลงในอาหาร 20 หรือ 30 กรัมต่อลิตร ต้นอ้อยที่เลี้ยงบนอาหารที่มี Kinetin จะมีรากน้อยและสั้นเกือบทั้งหมด (ตารางที่ 3)

วิจารณ์

เนื้อเยื่ออ้อยของแต่ละพันธุ์มีการตอบสนองต่ออาหารแตกต่างกัน (การทดลองที่ 1) อาจเนื่องมาจากลักษณะทางพันธุกรรมเพราะแต่ละพันธุ์นั้นมีองค์ประกอบทางพันธุกรรมต่างกัน อาหารที่มีส่วนผสมของ 2,4-D ผสมอยู่จะชักนำให้เนื้อเยื่อเกิดแคลลัส และที่ความเข้มข้นมากขึ้นคือ 3 ppm จะชักนำให้เกิดแคลลัสดีขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับผลงานอื่น ๆ (Leopold, 1967) ที่พบว่า auxin เป็นสารช่วยการเกิดแคลลัส และราก ซึ่ง 2,4-D ก็จัดเป็น auxin สารหนึ่ง ส่วนการที่ 2,4-D ซึ่งผสมอยู่ในอาหารชักนำให้เกิดยอดด้วยนั้นอาจเนื่องมาจากเกิดอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่าง 2,4-D ซึ่งเป็น auxin และสารที่มี activity คล้าย ๆ cytokinin ในน้ำมะพร้าว (Cutter and Wilson, 1954) ได้ Skoog and Miller (1957) เคยอธิบายไว้ว่าการเกิดรากหรือยอดของเนื้อเยื่อนั้น ขึ้นอยู่กับอัตราส่วนระหว่าง auxin และ cytokinin หากอัตราส่วนของ auxin สูง, เนื้อเยื่อจะเจริญเป็นแคลลัสและราก หากอัตราส่วนของ auxin ต่ำ, เนื้อเยื่อจะเจริญเป็นยอด ฉะนั้นการที่เนื้อเยื่ออ้อยที่เลี้ยงบนอาหารที่มี 2,4-D และน้ำมะพร้าวผสมอยู่ เกิดทั้งแคลลัสและยอดจึงสนับสนุนทฤษฎีดังกล่าว

การใช้ 0.1 ppm kinetin แทนน้ำมะพร้าวในอาหาร (การทดลองที่ 2) ไม่ได้ผลนั้นอาจเนื่องมาจากความเข้มข้นของ kinetin ไม่เหมาะสมกับความเข้มข้นของ 2,4-D ที่ใช้จึงทำให้อัตราส่วนที่จะชักนำให้เกิด แคลลัส และ/หรือยอดไม่ดีหรืออาจจะเป็นได้ว่าในน้ำมะพร้าวนั้นมีสารที่มี cytokinin-activity อยู่หลายชนิด (Cutter and Wilson, 1954) ซึ่งไม่สามารถทดแทนได้ด้วย kinetin เพียงอย่างเดียว ในทำนองเดียวกับ IAA ซึ่งใช้แทน 2,4-D ในอาหาร ความต้องการของเนื้อเยื่ออ้อยต่อ auxin อาจจะเฉพาะเจาะจงต่อ 2,4-D แทนที่จะเป็น IAA ซึ่งอาจจะมีผลสืบเนื่องมาจาก metabolism ของ auxin ในเนื้อเยื่อของอ้อย (Leopold, 1967)

การออกรากของต้นอ้อย (การทดลองที่ 3) ในอาหารที่มีน้ำตาล 30 กรัมต่อลิตรดีกว่าในอาหารที่มีน้ำตาล 20 กรัมต่อลิตรนั้นสนับสนุนผลงานของ Hilderbrandt and Riker (1953) อย่างไรก็ดี บทบาทของน้ำตาลต่อ organogenesis ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด น้ำตาลอาจจะไปเพิ่มพลังงานให้แก่ต้นอ้อยเพื่อให้เกิดรากและ/หรือ น้ำตาลไปทำให้ osmotic pressure ในอาหารสูงขึ้นซึ่งมีผลทำให้ต้นอ้อยเกิดรากได้ (Skoog and Miller, 1957; Murashige, 1974)

ตารางที่ 1 ผลของ 2,4-D ต่อการเกิดแคลลัส (callus) และยอด (shoot) บนเนื้อเยื่อชนิดต่าง ๆ ของอ้อย 3 พันธุ์

สูตรอาหาร	ชนิดของเนื้อเยื่อ	พันธุ์อ้อย					
		F 140		F 156		Q 83	
		แคลลัส ^{1/}	ยอด ^{2/}	แคลลัส ^{1/}	ยอด ^{2/}	แคลลัส ^{1/}	ยอด ^{2/}
MS	ตายอด	-	+	+	+	-	+
	ตาข้าง	-	-	-	+	-	-
	ใบอ่อน	-	-	-	-	-	-
MS + 1ppm2,4-D	ตายอด	+	++	+	++	+	-
	ตาข้าง	+	+	+	++	+	++
	ใบอ่อน	++	+++	-	-	-	-
MS + 3ppm2,4-D	ตายอด	++	+++	+	+	+	-
	ตาข้าง	++	++	++	+	+	-
	ใบอ่อน	++	++	++	-	+	-

1 - ไม่เกิดแคลลัส, + เกิดแคลลัสน้อย, ++ เกิดแคลลัสมาก

2 - ไม่เกิดยอด, + 1-5 ยอด, ++ 6-10 ยอด, +++ มากกว่า 10 ยอด

ตารางที่ 2 ผลของ 2,4-D, IAA, kinetin และน้ำมะพร้าวอ่อนต่อการเกิดแคลลัส (callus) และยอด (shoot) บนเนื้อเยื่อชนิดต่าง ๆ ของอ้อย 3 พันธุ์

สูตรอาหาร	ชนิดของเนื้อเยื่อ	พันธุ์อ้อย					
		F 140		F 156		Q 83	
		แคลลัส ^{1/}	ยอด ^{2/}	แคลลัส ^{1/}	ยอด ^{2/}	แคลลัส ^{1/}	ยอด ^{2/}
MS+10%(v/v)CW	ตายอด	-	+	+	+	-	+
	ตาข้าง	-	-	-	-	-	-
	ใบอ่อน	-	-	-	-	-	-
MS+3ppm2,4-D+ 10% (v/v)CW	ตายอด	++	+++	+	+	-	-
	ตาข้าง	++	++	++	+	-	-
	ใบอ่อน	++	++	++	-	-	-
Ms+3ppm2,4-D+ 0.1 ppm kinetin	ตายอด	+	-	+	-	+	+
	ตาข้าง	+	-	+	-	+	-
	ใบอ่อน	+	+	+	+	+	-
MS+1ppm IAA+ 10 %(v/v)CW	ตายอด	-	+	-	-	-	-
	ตาข้าง	-	-	-	-	-	-
	ใบอ่อน	-	+	+	+	-	-
MS+1ppm IAA+ 0.1ppm kinetin	ตายอด	-	+	-	+	-	-
	ตาข้าง	-	-	-	-	-	-
	ใบอ่อน	-	-	-	-	-	-

1 - ไม่เกิดแคลลัส, + เกิดแคลลัสน้อย, ++ เกิดแคลลัสมาก

2 - ไม่เกิดยอด, + 1-5 ยอด, ++ 6-10 ยอด, +++ มากกว่า 10 ยอด

ตารางที่ 3 ผลของปริมาณน้ำตาลและ kinetin ต่อการเกิดรากและการเจริญของต้นอ้อยพันธุ์ F 140

สูตรอาหาร	การเกิดราก ¹	% ของต้นอ้อยที่เกิดราก	ความสูงของต้น(ซ.ม.)
MS+20 กรัม/ลิตร น้ำตาล	good	12.5	5.0-6.2
	fair	70.0	3.2-5.5
	poor	17.5	2.2-3.5
MS+30 กรัม/ลิตร น้ำตาล	good	55.0	3.8-6.5
	fair	37.5	4.0-5.5
	poor	7.5	2.0-3.6
MS+20 กรัม/ลิตร น้ำตาล + 0.5 ppm kinetin	good	-	-
	fair	2.5	6.2
	poor	97.5	2.2-15.5
MS+30 กรัม/ลิตร น้ำตาล + 0.5 ppm kinetin	good	-	-
	fair	15.0	5.0-10.8
	poor	85.0	4.5-22.0

1 good = 5-10 รากและยาว 3-5 ซ.ม.

fair = 3-5 รากและยาว 2-3 ซ.ม.

poor = 1-2 รากและยาว 0.1-2 ซ.ม.

เอกสารอ้างอิง

- Cutter, V.M.J. and K.S. Wilson. 1954. Effect of coconut endosperm and other growth stimulants upon the development *in vitro* of embryo of *Cocos nucifera*. *Bot. Gaz.* 115:234-240
- Hilderbrandt, A.C. and A.J.Riker. 1953. Influence of concentration of sugars and polysaccharides on callus tissue growth *in vitro*. *Amer.J.Bot.* 40:67-76.
- Leopold, A.C.1967. *Auxin and plant growth*. Berkeley:University of California. Press. 354 p.
- Muir, W.H.,A.C.Hilderbrandt and A.J. Riker. 1954. Plant tissue culture produced from single isolated cell. *Science*. 199: 877-878.
- Murashige, T. and F.Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue culture. *A.Rev. Plant Physiol.* 25:135-166.
- Nickell, L.G.1964. Tissue and cell culture of sugarcane. Another research tool. *Hawaiian Planter's record.* 57: 223-229.
- Reinert, J.and Y.P.S.Bajaj. 1977. *Plant cell, tissue and organculture*. Springer-Verlag. New York. 803 p.
- Ross, M.K., T.A.Thorpe and J.W. Costerton. 1973. Ultrastructural aspects of shoot formation in tobacco callus tissues. *Amer.J.Bot.* 60(8): 788-795.
- Skoog, F.and C.O.Miller. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured *in vitro*. *Symp. Soc. Exp.Biol.* 11:118-131.
-