บทที่ 4

บทวิจารณ์

ตอนที่ 1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโป๊ยเซียน

1.1 การชักนำแคลลัส

1.1.1 การชักนำแคลลัสจากลำต้นโป๊ยเซียนในอาหารสูตร MS ที่มี 2,4-D 2iP และ Kinetin ในระดับความเข้มข้นต่างๆ

ในการชักนำให้ลำต้นของโป๊ยเซียนพันธุ์สร้อยรัชนีสร้างแคลลัสโดยการเพาะเลี้ยงลำต้นบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4 - D 2iP และ Kinetin ความเข้มข้น 0.0 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จากผลการทดลอง พบว่า ชิ้นส่วนของลำต้น สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ในทุกสูตรอาหารที่มี 2,4 - D และ 2iP โดยเมื่อทำการเพาะเลี้ยงลำต้นได้ประมาณ 10 – 15 วัน สังเกตเห็นแคลลัสที่เกิดขึ้นตรงบริเวณรอบๆรอยตัดของลำต้น ลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้นเหมือนกับผลการทดลองของ Veisseire และคณะ (1994) กับMontoro และคณะ (1993) ที่พบว่าการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นของยางพารา (*Hevea brasiliensis*) แคลลัสที่เกิดขึ้นจะเป็นแบบ คอมแพค แคลลัสมีลักษณะเป็นก้อนแข็ง เซลล์เกาะตัวกันแน่น ซึ่งเป็นลักษณะของ adventive embryo จากแคลลัสมีความสามารถในการเจริญเป็นต้นได้ Ferreira และคณะ (1989) รายงานเช่นกันว่าแคลลัสที่เจริญมาจาก ลำต้นของ *Euphorbia characias* จะมีลักษณะแบบ คอมแพค สีเขียว เซลล์เกาะตัวกันแน่น แคลลัสที่มีสีเขียวเกิดขึ้นนี้เพราะมีคลอโรฟิลล์ และปริมาณของคลอโรฟิลล์ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ธาตุอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง และปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมของการเพาะเลี้ยงโดยเฉพาะปัจจัยแสง

จากการเพาะเลี้ยงลำต้นโป๊ยเซียนพันธุ์สร้อยรัชนีบนอาหารสูตรต่างๆ พบว่าอาหารแต่ละสูตรสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้แตกต่างกันโดยเกิดแคลลัสที่มีขนาดใหญ่ที่สุดบนอาหารสูตรที่มี 2, 4 - D 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (1.87 เซนติเมตร) ทั้งนี้อาจเนื่องจาก 2,4 - D จัดเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินที่เหมาะสมที่สุดต่อการชักนำให้เนื้อเยื่อพืชในวงศ์ Euphorbiaceae เจริญเป็นแคลลัสแต่ความเข้มข้นที่ใช้จะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อและชนิดของพืช (Sofiari *et al*., 1997) เช่น ในการเพาะเลี้ยงลำต้นของ *Euphorbia characias* บนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี 2,4 –D ระดับความเข้มข้น 0.0 - 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะสมต่อการ

ชักนำให้เกิดแคลลัส (Ferreira *et al*., 1989) ซึ่งจากผลการทดลองนี้พบว่าในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4 -D 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสที่มีขนาดใหญ่ที่สุด แคลลัสส่วนใหญ่เป็นแบบ คอมแพค สอดคล้องกับผลการทดลองของ Souissi และคณะ (1997) ที่พบว่าในการชักนำแคลลัสจากลำต้นของ *Euphorbia esula* นั้นการใช้ 2 ,4 - D ที่ระดับความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ในอัตราสูงสุดและแคลลัสมีขนาดใหญ่ที่สุด

ส่วนการชักนำแคลลัสจากลำต้นในอาหารที่มี 2iP พบว่าแคลลัสที่ได้จะมีลักษณะก้อนแข็ง สีเขียวอ่อน เซลล์เกาะตัวกันแน่น แต่ขนาดของแคลลัสจะเล็กกว่าในอาหารที่มี 2,4-D ทั้งนี้เนื่องจาก 2iP เป็นสารกลุ่มไซโทไคนิน ซึ่งมีบทบาทในการชักนำให้เกิดแคลลัสได้น้อยกว่ากลุ่มออกซิน (Kawiak *et al*., 2003) นอกจากนี้ในอาหารที่มี Kinetin และไม่มี Kinetin ลำต้นไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ โดยเนื้อเยื่อจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตายในที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Hadrami และ Auzac (1992) ที่รายงานว่า Kinetin ทำให้เกิดสารสีน้ำตาลและไม่เหมาะสมที่จะใช้ในการชักนำให้เกิดแคลลัสในยางพารา

1.1.2 การชักนำแคลลัสจากข้อโป๊ยเซียนในอาหารสูตร MS ที่มี 2,4-D 2iP และ Kinetin ในระดับความเข้มข้นต่างๆ

การชักนำแคลลัสจากข้อโดยการเพาะเลี้ยงลำต้นบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4 - D 2iP และ Kinetin ความเข้มข้น 0.0 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จากผลการทดลอง พบว่าสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ในทุกสูตรอาหารที่มี 2,4-D 2iP และ Kinetin โดยเมื่อทำการเพาะเลี้ยงข้อได้ 15 วัน สังเกตเห็นแคลลัสเกิดขึ้นตรงบริเวณรอบๆรอยตัดของข้อ ลักษณะของแคลลัสเป็นก้อนแข็งเซลล์เกาะตัวกันแน่น สีเขียว และบริเวณรอบๆแคลลัสเกิดปุยสีเขียวอ่อนที่มีลักษณะอ่อนนุ่ม โดยที่ความเข้มข้น 2,4-D 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสที่มีขนาดใหญ่ที่สุดคือ 1.95 เซนติเมตร ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Catapan และคณะ (2002) ที่พบว่าการใช้ 2,4-D สามารถชักนำให้ข้อของ *Phyllanthus urinaria* เกิดแคลลัสได้ดีที่สุดและมีขนาดใหญ่ที่สุด ส่วนในอาหารที่มี 2iP และ Kinetin แคลลัสที่ได้จะมีขนาดเล็กกว่า 2,4-D ทั้งนี้เนื่องจากว่า 2iP และ Kinetin เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโทไคนิน การกระตุ้นให้เกิดแคลลัสจะเกิดได้น้อยกว่า (Catapan *et al*., 2000) นอกจากนี้จากผลการทดลองยังพบว่าอัตราการเจริญเติบโตของแคลลัสลดลงเมื่อจำนวนครั้งของการย้ายเลี้ยงเพิ่มขึ้น ผลดังกล่าวเป็นไปในทำนองเดียวกันกับการชักนำให้เกิดเป็นแคลลัสจากข้อของยางพารา (Hadrami และ Auzac, 1992)

1.1.3 การชักนำแคลลัสจากใบโป๊ยเซียนในอาหารสูตร MS ที่มี 2,4-D 2iP และ Kinetin ในระดับความเข้มข้นต่างๆ

ในการชักนำให้ใบของโป๊ยเซียนพันธุ์สร้อยรัชนีสร้างแคลลัสโดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติม 2,4 - D 2iP และ Kinetin ความเข้มข้น 0.0 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร จากผลการทดลอง พบว่าในอาหารที่มีและไม่มี 2,4-D และ Kinetin ไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ เนื้อเยื่อจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตายในที่สุด ส่วนในอาหารที่มี 2iP 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสที่มีขนาดใหญ่ที่สุด คือ 1.16 เซนติเมตร โดยส่วนของโคนใบ (proximal end) จะเกิดการบวมขึ้นมาก่อนส่วนอื่นๆ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Captan และคณะ (2002) ที่รายงานว่าหากตัดส่วนโคนใบของต้นลูกใต้ใบออกไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้เลย และ Zaidi และคณะ (2000) ซึ่งรายงานว่าตำแหน่งโคนใบเป็นตำแหน่งที่สร้างแคลลัสได้ดีที่สุด รองลงมาคือ เส้นกลางใบ นอกจากนี้แคลลัสที่สร้างจากด้านโคนใบเป็นประเภท เมอริสเต็มโนดูลแคลลัส สามารถเพิ่มปริมาณได้เมื่อย้ายไปเลี้ยงในอาหารสูตรเพิ่มปริมาณ

ในการศึกษาการชักนำให้เกิดแคลลัสจาก ลำต้น ข้อ และใบของโป๊ยเซียนในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4 - D 2iP และ Kinetin ความเข้มข้น 0.0 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าชิ้นส่วนของพืชจะมีผลต่อการตอบสนองต่อการสร้างแคลลัสแตกต่างกัน โดยชิ้นส่วนของลำต้นสร้างและเพิ่มปริมาณแคลลัสได้ดีที่สุดในอาหารที่เติม 2,4-D 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

1.2 การชักนำแคลลัสให้เจริญเป็นยอด

ในการชักนำแคลลัสให้พัฒนาเป็นยอดโดยใช้แคลลัสที่มีลักษณะแบบ คอมแพค ซึ่งได้จากการเพาะเลี้ยง ลำต้น ข้อ และใบ บนอาหารสูตร MS ที่มี 2,4-D 2iP และ Kinetin ซึ่งให้แคลลัสที่มีขนาดที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางใหญ่ที่สุดจากการทดลองที่ 1.1.1 1.1.2 และ 1.1.3 ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี BA ความเข้มข้น 0.0 1.0 3.0 5.0 และ 7.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าในอาหารทุกสูตรที่มี BA สามารถชักนำให้แคลลัสโป๊ยเซียนเกิดเป็นยอดรวมได้หมด ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Perrin และคณะ (1997) ที่รายงานว่าการใช้ BA สามารถชักนำให้ยางพาราเกิดยอดได้มาก ทั้งนี้เนื่องจาก BA เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโทไคนิน ซึ่งมีคุณสมบัติส่งเสริมการเจริญและการพัฒนาของเนื้อเยื่อเจริญ (Meristematic region) และจากผลการทดลอง พบว่าแคลลัสที่มาจากข้อในอาหารสูตร MS ที่มี Kinetin 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอด

ได้มากที่สุด โดยพบว่าที่ความเข้มข้น BA 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้สูงสุดเท่ากับ 12.10 ยอดต่อแคลลัส ลักษณะยอดจะเป็นยอดเล็กๆ ไม่ยืดยาวมาก ใบมีสีเขียวเข้ม และมีขนาดเล็ก เนื่องจากแคลลัสมีการสะสมของ Kinetin อยู่ก่อนแล้ว เมื่อนำมาชักนำให้พัฒนาเป็นยอดในอาหารที่มี BA จึงสามารถสร้างยอดได้หลายๆยอดบนแคลลัสก้อนเดียวกันและแคลลัสมีการตอบสนองต่อ BA ทำให้มีประสิทธิภาพสูงในการสร้างยอด (Catapan *et al*., 2002) แต่ก็พบว่าที่ระดับความเข้มข้น BA 7.0 มิลลิกรัมต่อลิตร การสร้างยอดรวมลดลง ยอดที่ได้มีลักษณะผิดปกติ ทั้งนี้เพราะ BA ที่ระดับความเข้มข้นสูงเกินไปส่งผลให้ความสามารถในการสร้างยอดลดลงและยอดที่ได้จะมีลักษณะไม่สมบูรณ์ (Veisseire *et al*., 1994) นอกจากนี้จากผลการทดลองยังพบว่า แคลลัสที่มาจากใบในอาหารที่มี 2iP 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถชักนำให้เกิดยอดได้น้อยสุด และเพิ่มจำนวนได้ช้า ซึ่งสอดคล้องกับ Zaidi และคณะ (2000) ที่รายงานว่าชิ้นส่วนเริ่มต้นที่นำมาเลี้ยงและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เติมลงไปในอาหารมีผลต่อการชักนำให้เกิดเป็นยอดรวม

ส่วนแคลลัสที่มาจากในอาหารที่มี 2,4-D เมื่อนำมาชักนำให้เกิดยอดในอาหารที่มี BA พบว่ายอดที่ได้จะมีลักษณะยืดยาว ทั้งนี้เนื่องจากผลของ 2,4-D ที่สะสมในแคลลัสมีอยู่ก่อนแล้วช่วยส่งเสริมการยืดยาวของยอด นอกจากนี้ยังพบว่าแคลลัสที่มาจาก ข้อ และลำต้นในอาหารที่มี 2iP เมื่อนำมาย้ายเลี้ยงในอาหารที่มี BA จะแตกตาข้างมากเพราะ 2iP ช่วยส่งเสริมการแตกตาข้างได้ดี

อย่างไรก็ตามการชักนำยอดจากแคลลัสทั้ง 6 แหล่ง พบว่ามีการตอบสนองต่อ BA ที่คล้ายกัน โดยในอาหารสูตร MS ที่มี BA 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ดีที่สุด ลักษณะยอดที่ได้มีความสมบูรณ์ แข็งแรง

1.3 การชักนำยอดให้เจริญเป็นราก

ในการชักนำยอดให้เจริญเป็นราก ได้ใช้ยอดจากการทดลองตอนที่ 1.2 ซึ่งเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี BA 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดรวมมากที่สุด จากนั้นนำยอดจากความเข้มข้นดังกล่าวไปชักนำให้เจริญเป็นราก บนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี IAA IBA และ NAA ที่ระดับความเข้มข้น 0.0 1.0 3.0 และ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 30 วัน พบว่าอาหารสูตรที่ให้จำนวนรากมากที่สุด คือ อาหารสูตรที่เติม NAA 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร รากที่ชักนำได้มีลักษณะ ยาว สีน้ำตาล แตกแขนง และแข็งแรง ให้จำนวนรากได้สูงสุดคือ 15.80 รากต่อยอด ซึ่งดีกว่ารากที่ชักนำได้จากอาหารที่เติม IAA IBA และในอาหารที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ทั้งนี้เพราะออกซินจะช่วยในการเจริญของรากได้ดี โดยเฉพาะ NAA ให้ผลดีกว่าการใช้สารตัวอื่นๆ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Catapan และคณะ (2002) ที่พบว่าการใช้ NAA สามารถ

ชักนำรากในต้นลูกใต้ใบเกิดดีกว่า IBA และ IAA นอกจากนี้ Carron และ Enjalric (1982) ยังรายงานว่าการใช้ NAA สามารถชักนำให้ยอดของยางพาราเกิดรากได้ดีกว่า IBA นอกจากนี้ Sanya และคณะ (1998) ที่ทำการชักนำรากจากยอดของ *Polianthes tuberosa* L. พบว่าการเจริญเติบโตของรากเกิดได้ดีถ้าในอาหารมี NAA อย่างไรก็ตามถ้าอาหารต่างสูตรกันมีผลให้การเกิดรากแตกต่างกันไป และเนื้อเยื่อพืชต่างชนิดกันจะมีผลตอบสนองต่อการกระตุ้นให้เกิดรากจากออกซินต่างกัน ดังนั้นในการทดลองจึงเลือกใช้ NAA ในการชักนำรากโป๊ยเซียนเพราะชักนำรากได้มากที่สุด ลักษณะรากที่ได้นั้นแข็งแรง และยาว

1.4 การอนุบาลต้นโป๊ยเซียนหลังออกจากขวดเพาะเลี้ยง

เมื่อนำต้นโป๊ยเซียนออกจากขวดเพาะเลี้ยงมาล้างวุ้นออกให้หมดซึ่งต้องทำด้วยความระมัดระวังเพื่อป้องกันความเสียหายที่จะเกิดขึ้น หลังจากนั้นนำรากไปแช่ในน้ำ เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำต้นที่ได้ไปอนุบาลในเวอร์มิคูไลต์ เป็นเวลา 30 วัน โดยรดน้ำสัปดาห์ละ 1 ครั้ง จากนั้นนำต้นโป๊ยเซียนออกจากเวอร์มิคูไลต์ลงปลูกในดินที่เตรียมไว้แล้วในกระถาง จากนั้นนำไปพักไว้ในร่มรดน้ำวันเว้นวัน เมื่ออนุบาลจนครบ 60 วัน ต้นโป๊ยเซียนมีอัตรารอด 100 เปอร์เซ็นต์ ลำต้นสมบูรณ์แข็งแรง และมีดอกเกิดขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Stamp และ Henshaw (1987) ที่รายงานว่าการนำต้นมันสำปะหลังออกจากขวดเพาะเลี้ยงไปอนุบาลในเวอร์มิคุไลต์ เป็นเวลา 40 วัน ก่อนการนำไปลงในดิน สามารถทำให้ต้นมันสำปะหลังมีอัตรารอดเท่ากับ 82 เปอร์เซ็นต์ และสอดคล้องกับการทดลองของ Raemakers และคณะ (1993) ซึ่งรายงานว่าการอนุบาลต้นกล้าของมันสำปะหลังในเวอร์มิคูไลต์ ก่อนนำไปลงดิน สามารถช่วยเพิ่มอัตราการรอดได้ 40 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้เนื่องจากการอนุบาลต้นพืชในเวอร์มิคูไลต์ก่อนนำไปลงในดินนั้นเพื่อต้องการให้พืชมีการปรับตัว เพราะถ้าย้ายลงไปในดินโดยทันทีจะทำให้พืชปรับตัวไม่ทัน ทั้งนี้เนื่องจากความชื้นสัมพัทธ์ภายนอกต่ำกว่าความชื้นภายในเซลล์ ทำให้เซลล์เกิดการคายน้ำ ปริมาณน้ำในเซลล์จึงลดลง ทำให้พืชเหี่ยวเฉา และตายในที่สุด (Shimizu *et al*., 1997)

ตอนที่ 2 การแยกและเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์โป๊ยเซียน

2.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกโพรโทพลาสต์โป๊ยเซียน

2.1.1 ระดับออสโมลาริตี้

เมื่อต้องการแยกโพรโทพลาสต์จากเซลล์พืช สิ่งสำคัญที่ต้องคำนึงถึงคือระดับความดันภายนอกและภายในเซลล์หรือที่เรียกว่า ระดับออสโมลาริตี้ เนื่องจากโพรโทพลาสต์ที่ถูกแยกออกมาแล้วไม่มีผนังเซลล์ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์สัมผัสกับสิ่งแวดล้อมโดยตรงทำให้น้ำหรือสารต่างๆผ่านเข้าออกสู่โพรโทพลาสต์ได้ง่าย ซึ่งมีผลต่อแรงดันออสโมติกภายในโพรโทพลาสต์ ดังนั้นแรงดันออสโมซิสของสารละลายเอนไซม์ที่อยู่ล้อมรอบโพรโทพลาสต์จะต้องอยู่ในสภาพสมดุลมิฉะนั้นโพรโทพลาสต์จะเหี่ยวหรือแตก โดยทั่วไปการปรับแรงดันออสโมซิสของสารละลายเอนไซม์ทำได้โดยการเตรียมออสโมติคัม ออสโมติคัมที่นิยมใช้มากที่สุด คือ น้ำตาลแมนนิทอลและซอร์บิทอล เพราะน้ำตาล 2 ชนิดนี้ไม่มีผลต่อเมแทบอลิซึมของเซลล์ (Street, 1977) นอกจากนี้ยังมีน้ำตาลอย่างอื่น เช่น กลูโคส หรือ ซูโครส แต่ก็ไม่ดีเท่าที่ควร เพราะน้ำตาลกลูโคส หรือ ซูโครส นั้นเซลล์สามารถดูดไปใช้และมีผลต่อเมแทบอลิซึม ซึ่งจะส่งผลให้โพรโทพลาสต์เกิดความไม่คงที่ในระหว่างการเพาะเลี้ยง อีกทั้งน้ำตาลกลูโคส หรือ ซูโครส ทำให้เกิดสารสีน้ำตาล (browning) ซึ่งจะไปยับยั้งการแบ่งเซลล์ในระหว่างการเพาะเลี้ยงได้ (Xu และ Jia , 1996)

ในการศึกษาระดับออสโมลาริตี้ที่เหมาะสมสำหรับการแยกโพรโทพลาสต์โป๊ยเซียนได้เลือกใช้น้ำตาลแมนนิทอลเป็นสารออสโมติคัม เนื่องจากน้ำตาลแมนนิทอลเหมาะสำหรับการแยกโพรโทพลาสต์จากเซลล์มีโซฟิลล์ของใบ (Mills และ Hammurschlag, 1994) โดยใช้น้ำตาลแมนนิทอลที่ระดับออสโมลาริตี้ 0.4 0.5 0.6 และ 0.7 โมลาร์ พบว่าระดับความเข้มข้นของน้ำตาลแมนนิทอล 0.4 โมลาร์ ได้จำนวนโพรโทพลาสต์มากที่สุด โพรโทพลาสต์มีลักษณะกลมเต่ง และมีจำนวนโพรโทพลาสต์ที่แตกน้อย แสดงว่าที่ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลแมนนิทอล 0.4 โมลาร์ เป็นระดับออสโมลาริตี้ที่เหมาะสม ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองของเสาวรัตน์ (2539) ซึ่งรายงานว่าที่ระดับออสโมลาริตี้ 0.4 โมลาร์ของแมนนิทอลเหมาะสมที่สุดต่อการแยกโพรโทพลาสต์จากใบของหวายปอมปาดัวร์และให้จำนวนโพรโทพลาสต์ต่อใบกล้วยไม้มากที่สุด ประมาณ 1.98×10^6 โพรโทพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด ลักษณะรูปร่างของโพรโทพลาสต์กลม ไม่บิดเบี้ยว นอกจากนี้กฤษณา (2541) พบว่าระดับออสโมลาริตี้ที่เหมาะสมในการแยกโพรโทพลาสต์จากกาบใบของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 คือ แมนนิทอล 0.4 โมลาร์เช่นกัน

ในขณะที่ระดับออสโมลาริตี้ 0.5 0.6 และ 0.7 โมลาร์ ในทุกๆชั่วโมงที่วางย่อยเพื่อแยกโพรโทพาสต์ให้จำนวนโพรโทพลาสต์น้อย ลักษณะรูปร่างของโพรโทพลาสต์บิดเบี้ยว

ไม่กลม เนื่องจากความเข้มข้นของสารปรับระดับออสโมลาริตี้สูงเกินไปทำให้เกิดการสูญเสียน้ำออกนอกเซลล์จากกระบวนการพลาสโมไลซีส (plasmolysis) โดยน้ำภายในโพรโทพลาสต์จะเคลื่อนผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ออกสู่ภายนอก ทำให้โพรโทพลาสต์หดตัวลง จึงพบจำนวนโพรโทพลาสต์ลักษณะ กลม เต่ง สมบูรณ์น้อยกว่าที่ระดับออสโมลาริตี้ 0.4 โมลาร์ และมีจำนวนโพรโทพลาสต์น้อยกว่าที่ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลแมนนิทอล 0.4 โมลาร์ แต่แตกต่างจาก Xu และ Jia (1996) ที่พบว่าความเข้มข้นของแมนนิทอล 0.65 โมลาร์ เหมาะสมที่สุดต่อการแยกโพรโทพลาสต์จากแคลลัสของ *Artemisia sphaeerocephala* Krasch ซึ่งให้จำนวนโพรโทพลาสต์ได้สูงสุดถึง1.13 x 10^6 โพรโทพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด ในขณะที่ Cazaux และ Auzac (1995) พบว่าความเข้มข้นของแมนนิทอล 0.7 โมลาร์ เหมาะสมที่สุดต่อการแยกโพรโทพลาสต์จากลำต้นของยางพารา ทั้งนี้ความเข้มข้นที่ใช้ในการรักษาระดับออสโมลาริตี้ที่แตกต่างกันอาจเนื่องมาจากชนิดและแหล่งของเนื้อเยื่อที่นำมาแยกโพรโทพลาสต์

2.1.2 ชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์

ในการย่อยผนังเซลล์พืชนั้น ส่วนมากมักใช้เอนไซม์อยู่ 3 กลุ่ม ด้วยกัน คือ กลุ่มเซลลูเลส เช่น เซลลูเลส ไดรซีเลส และ เซลลูไลซิน (Cellulysin) กลุ่มเฮมิเซลลูเลส (Hemicellulase) เช่น เฮมิเซลลูเลส และโรไซม์ (Rhozyme) และกลุ่มเพคติเนส เช่น มาเซอโรไซม์ และ เพคโตไลเอส วาย 23 (Fitzsimons และ Weyers, 1985) ซึ่งชนิดของเอนไซม์ ความเข้มข้นและสัดส่วนที่ให้ผลของแต่ละเอนไซม์นั้นขึ้นอยู่กับ ชนิดของพืช และ เนื้อเยื่อที่นำมาแยกโพรโทพลาสต์ เอนไซม์ที่ใช้อาจจะเป็นชนิดเดียวหรือหลายชนิดรวมกันก็ได้

จากการทดลองพบว่าสารละลายเอนไซม์ที่มี เซลลูเลส โอโนซูกะ อาร์เทน 1 เปอร์เซ็นต์ ไดรซีเลส 0.5 เปอร์เซ็นต์ และ มาเซอโรไซม์ อาร์เทน 0.5 เปอร์เซ็นต์ ให้จำนวนโพรโทพลาสต์มากที่สุด คือ 6.85 x 10^5 โพรโทพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด ที่เวลา 4 ชั่วโมง สอดคล้องกับการทดลองของ Dorion และคณะ (1990) พบว่าการใช้เอนไซม์เซลลูเลส ร่วมกับไดรซีเลส และมาเซอโรไซม์ แยกโพรโทพลาสต์จากใบของ *Lycopersicon cheesmanii* สามารถให้จำนวนโพรโทพลาสต์มากที่สุดเช่นกัน และสอดคล้องกับการทดลองของ Xiu และคณะ (1995) ที่พบว่าการเติมไดรซีเลสร่วมกับเซลลูเลส และ มาเซอโรไซม์ ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการแยกโพรโทพลาสต์จากใบเลี้ยงของ *Sesbania bispinosa* ทำให้ได้จำนวนโพรโทพลาสต์มากขึ้น และจากผลการทดลองยังพบว่าในสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะ อาร์เทน 1 เปอร์เซ็นต์ ร่วมด้วย ไดรซีเลส 0.5 เปอร์เซ็นต์ ให้จำนวนโพรโทพลาสต์มากกว่าสารละลายเอนไซม์เซลลูเลส

โอโนซูกะ อาร์เทน 1 เปอร์เซ็นต์ ร่วมด้วย มาเซอโรไซม์ อาร์เทน 0.5 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้เนื่องจากไดรซีเลส เป็นเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลสที่มีกิจกรรมของเพคทิเนสด้วย การมีไดรซีเลสจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการแยกโพรโทพลาสต์ได้ดียิ่งขึ้น โดยใช้ร่วมกับเซลลูเลส และมาเซอโรไซม์ ในระดับความเข้มข้นต่ำๆ และใช้ได้ดีกับเซลล์ใบ (Koh *et al.* , 1988) ส่วนสารละลายเอนไซม์ที่มีเซลลูเลส โอโนซูกะ อาร์เทน 1 เปอร์เซ็นต์ พบว่าให้จำนวนโพรโทพลาสต์น้อยที่สุด ทั้งนี้เป็นเพราะเซลล์ของพืชจะมีการสร้างสารเพคทินมาพอกไว้ระหว่างเซลล์ทำให้เอนไซม์ทำงานได้ยากขึ้นเพราะทำให้การย่อยสารเพคทินเพื่อแยกเซลล์ให้หลุดออกจากกันนั้นต้องใช้เวลานานและทำให้ได้โพรโทพลาสต์จำนวนน้อย ดังนั้นการเติมเอนไซม์มาเซอโรไซม์ และไดรซีเลส ร่วมกับเซลลูเลสทำให้ได้จำนวนโพรโทพลาสต์เพิ่มขึ้นเป็นเพราะเกิดการทำงานของเอนไซม์ 2 ขั้นตอน คือ ตอนแรก มาเซอโรไซม์ และไดรซีเลสจะย่อยสารเพคทินทำให้เซลล์หลุดออกจากกัน จากนั้นขั้นตอนที่สองเอนไซม์เซลลูเลสและไดรซีเลสจะย่อยผนังเซลล์จนได้โพรโทพลาสต์หลุดออก(Theodoropolos และ Roubelakis, 1990)

นอกจากนี้จะเห็นว่าการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสอย่างเดียวนั้นย่อยโพรโท-พลาสต์ได้จำนวนน้อย ที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะความเข้มข้นที่ต่ำเกินไป แต่อย่างไรก็ดี Li และคณะ (1993) พบว่าการใช้สารละลายเอนไซม์เซลลูเลสอย่างเดียวในความเข้มข้นที่สูงเกินไปก็ไม่ดีเช่นกัน เพราะจะทำให้โครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์โพรโทพลาสต์เสียหายได้

2.1.3 การเก็บใบไว้ในที่มืดก่อนย่อย

ในการแยกโพรโทพลาสต์ให้ได้จำนวนมากนั้น พบว่าสภาวะของพืชทดลองก่อนการแยกโพรโพลาสต์จะมีผลต่อการแยกโพรโทพลาสต์เช่นกันซึ่งในการทดลองนี้ได้นำต้นโป๊ยเซียนที่เพาะเลี้ยงในขวดเพาะเลี้ยงวางไว้ในตู้มืด 24 ชั่วโมง ก่อนนำมาแยกโพรโทพลาสต์ พบว่าใบที่เก็บไว้ในที่มืดจะให้โพรโทพลาสต์จำนวนมากกว่าใบที่ไม่ได้เก็บไว้ในที่มืด โดยใบที่เก็บไว้ในที่มืดให้จำนวนโพรโทพลาสต์สูงสุด คือ 6.69×10^5 โพรโทพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด ที่เวลา 4 ชั่วโมง ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Theodoropoulos และ Roubelakis (1990) ที่พบว่าการเก็บใบของ *Vitis vinifera* L. ไว้ในที่มืดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ให้จำนวนโพรโทพลาสต์มากกว่าใบที่ไม่ได้เก็บไว้ในที่มืด ทั้งนี้เนื่องจากการเก็บพืชไว้ในที่มืดก่อนนำมาแยกโพรโทพลาสต์ที่มีผลต่อแรงดันออสโมติก (osmotic pressure) ภายในเซลล์ คือทำให้น้ำออกจากเซลล์ เป็นผลให้โพรโทพลาสต์หดตัวเล็กน้อย เยื่อหุ้มเซลล์ที่อยู่เกือบชิดหรือชิดกับผนังเซลล์เริ่มแยกออกจากผนังเซลล์ เมื่อนำมาแยกด้วยเอนไซม์จึงทำให้เอนไซม์แทรกเข้าไปย่อยได้ง่ายขึ้น ซึ่ง Sandberg และ Crozier (1985) พบ

ว่ายิ่งพืชได้รับแสงที่มีความเข้มมาก จะทำให้พืชมีน้ำตาลสะสมในเซลล์มากขึ้น มีผลให้น้ำเข้าสู่เซลล์ โพรโทพลาสต์จะขยายตัว เมื่อนำมาแยกด้วยเอนไซม์ทำให้เอนไซม์แทรกเข้าไปย่อยยากขึ้น

2.1.4 ระยะเวลาการอินคิวเบทต่อความมีชีวิตของโพรโทพลาสต์

ในการแยกโพรโทพลาสต์ ระยะเวลาการอินคิวเบทก็เป็นปัจจัยสำคัญ ซึ่งจะเห็นได้จากผลการทดลองที่พบว่า เวลา 4 ชั่วโมง ให้จำนวนโพรโทพลาสต์มากที่สุด คือ 6.51 x 10^5 โพรโทพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด แต่เมื่อพิจารณาความมีชีวิตพบว่า การอินคิวเบทที่เวลาดังกล่าวให้ค่าเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตต่ำที่สุด คือ 71.73 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เวลาอินคิวเบท 3 ชั่วโมง ให้จำนวนโพรโทพลาสต์มากรองลงมา คือ 4.62 x 10^5 โพรโทพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด แต่ให้ความมีชีวิตสูงสุด คือ 84.14 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่ระยะเวลา 2 ชั่วโมง แยกโพรโทพลาสต์ได้จำนวนน้อยที่สุด คือ 3.11 x 10^5 โพรโทพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด เนื่องจากเป็นระยะเวลาที่น้อยเกินไปจึงทำให้โพรโทพลาสต์ที่ได้มีจำนวนน้อย แต่เมื่อพิจารณาความมีชีวิตพบว่าที่เวลา 2 ชั่วโมง ความมีชีวิตยังมากกว่าที่เวลา 4 ชั่วโมง คือ 75.09 เปอร์เซ็นต์ ถึงแม้ว่าที่ระยะเวลา 4 ชั่วโมง จะแยกโพรโทพลาสต์ได้จำนวนมาก แต่เนื่องจากเป็นระยะเวลาที่นานเกินไป ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ของโพรโทพลาสต์ที่แยกออกมาได้มีโอกาสถูกย่อยสลายจากเอนไซม์เซลลูเลสและมาเซอโรไซม์ได้นานขึ้น จึงทำให้โพร-โทพลาสต์แตกสลายเพิ่มขึ้น (Theodoropoulos และ Angelakis,1990) การทดสอบความมีชีวิตของโพรโทพลาสต์ทำได้โดยการนำโพรโทพลาสต์ไปย้อมด้วยสีฟลูออเรสซีนไดอะซีเตต โมเลกุลของสีจะผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าไปในโพรโทพลาสต์ ถ้าเป็นโพรโทพลาสต์ที่มีชีวิตจะมีเอนไซม์เอสเทอเรส (esterase) ไปตัดโมเลกุลของฟลูออเรสซีนไดอะซีเตต ทำให้เกิดสีฟลูออเรสซีน (fluorescein) ทำให้โพรโทพลาสต์เกิดการเรืองแสงสีเหลืองเขียว เมื่อดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ระบบฟลูออเรสเซนซ์ (Dixon, 1985) ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์จากใบโป๊ยเซียนจึงเลือกใช้ระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการแยกโพรโทพลาสต์ที่เวลา 3 ชั่วโมง เพราะที่เวลาดังกล่าวสามารถให้ความมีชีวิตของโพรโทพลาสต์สูงสุด เมื่อโพรโทพลาสต์ที่แยกได้มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูง โอกาสที่โพรโทพลาสต์จะเจริญแบ่งเซลล์เป็นแคลลัสย่อมมีสูงเพิ่มขึ้นด้วย เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารภายใต้สภาวะที่เหมาะสมต่อไป

2.2 การเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์โป๊ยเซียน

2.2.1 วิธีการเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์

ในการเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์วิธีการเพาะเลี้ยงเพื่อให้ได้ผลดี และมีประสิทธิภาพจึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง เนื่องจากโพรโทพลาสต์มีความบอบบางแตกง่าย ดังนั้นการดูแลรักษานั้นมีความจำเป็นและมากกว่าการเลี้ยงเซลล์ จากการทดลองเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์ทั้ง 4 วิธี พบว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว โดยใช้วุ้นอะกาโรสเป็นวิธีที่ดีที่สุด เนื่องจากโพรโทพลาสต์สามารถสร้างผนังเซลล์ใหม่ และมีชีวิตรอดได้นานที่สุด ทั้งนี้เนื่องจากวุ้นอะกาโรสนั้นมีสารปนเปื้อนที่เป็นพิษน้อยกว่า นอกจากนี้ยังเพิ่มประสิทธิภาพในการเพาะเลี้ยงได้ดีกว่าการใช้วุ้น Difco Bacto agar (Folling *et al*., 1995) ในขณะที่การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว บนอาหารแข็ง และวิธี Nurse culture โพรโทพลาสต์ไม่มีการสร้างผนังเซลล์ใหม่ ความมีชีวิตลดลงและตาย หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ซึ่งสอดคล้องกับ Webb และคณะ (1994) พบว่าการเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์ในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวโดยใช้วุ้นอะกาโรสเป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุดต่อการเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์ของ *Lactuca perennis* ซึ่งโพรโทพลาสต์มีการสร้างผนังเซลล์ใหม่ได้เร็วขึ้น และแบ่งตัวได้เร็วกว่าการเลี้ยงในอาหารเหลว Nakano และคณะ (1995) พบว่าการเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์ของ *Gentiana* ในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว โพรโทพลาสต์มีการแบ่งเซลล์และเจริญเป็นโคโลนีได้ดีกว่าการเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์ในอาหารเหลว อีกทั้งยังช่วยยับยั้งการรวมตัวกันเป็นกลุ่มของโพรโทพลาสต์ โดยไม่ทำให้โพรโทพลาสต์ตกตะกอนที่ก้นจานเพาะเลี้ยง และเซลล์ไม่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล (cell browning)

ในการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งพบว่าโพรโทพลาสต์แตกเป็นส่วนใหญ่ เนื่องจากโพรโทพลาสต์ที่แยกได้จากใบนั้นมักมีเยื่อหุ้มเซลล์ที่บางและแตกง่าย นอกจากนี้โมเลกุลของสารอาหารถูกยึดเกาะอยู่กับวุ้นทำให้แพร่เข้าสู่โพรโทพลาสต์ได้ยาก โพรโทพลาสต์จึงขาดสารอาหารและตายได้ (Reichert และ Liu , 1996) ส่วนการเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์โดยวิธี Nurse culture เป็นการอาศัยเซลล์พี่เลี้ยงในการทำให้โพรโทพลาสต์ที่ต้องการเพาะเลี้ยงมีการเจริญเติบโตได้ โดยคาดว่ามีการส่งสารบางชนิดที่จำเป็นต่อการเจริญของเซลล์ (essential metabolites) ไปยังเซลล์เดี่ยว ซึ่งเซลล์เดี่ยวในระยะเริ่มแรกยังไม่สามารถผลิตเองได้ (Folling *et al*., 1995) นอกจากนี้ยังพบว่าจะมีการระเหยของน้ำในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์ เมื่อมีการระเหยของน้ำในอาหารมากทำให้ระดับออสโมลาริตี้เปลี่ยนไป จึงทำให้โพรโทพลาสต์เจริญได้ไม่ดี (Kihara และ Funatsuki, 1995)

2.2.2 ความหนาแน่นของโพรโทพลาสต์เริ่มต้นที่ใช้เพาะเลี้ยง

ความหนาแน่นของโพรโทพลาสต์มีผลต่อความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงมาก เนื่องจากจำนวนเริ่มต้นก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการมีชีวิตรอดและการเจริญเติบโตต่อไปของโพรโทพลาสต์ ซึ่งความหนาแน่นที่พอเหมาะอยู่ระหว่าง 10^4 ถึง 10^5 โพรโทพลาสต์ต่อมิลลิลิตร จากการทดลองพบว่าการเพาะเลี้ยงที่ใช้จำนวนเริ่มต้น 1 x 10^5 โพรโทพลาสต์ต่อมิลลิลิตร เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยง เพราะโพรโทพลาสต์ยังคงกลม มีเม็ดคลอโรพลาสต์สีเขียว ความมีชีวิตเท่ากับ 87.42 เปอร์เซ็นต์ และยังพบการสร้างผนังเซลล์ใหม่ขึ้นมา ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Folling และคณะ (1995) ที่พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์ของ *Lolium perenne* จำนวนโพรโทพลาสต์เริ่มต้น 1 x 10^5 โพรโทพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ทำให้โพรโทพลาสต์สามารถสร้างผนังเซลล์ใหม่และมีการแบ่งเซลล์เป็นโคโลนีเล็กๆได้ดีกว่าการใช้จำนวนเริ่มต้น 2 x 10^5 โพรโทพลาสต์ต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ Tian และ Meng (1999) กับ Karim และ Adachi (1997) พบว่าการใช้จำนวนโพรโทพลาสต์เริ่มต้น 1 x 10^5 โพรโทพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ของ *Moricandia nitens* และ *Allium cepa* ตามลำดับ โพรโทพลาสต์สามารถแบ่งเซลล์และเจริญเป็นแคลลัสได้ดีกว่าการใช้โพรโทพลาสต์จำนวนเริ่มต้น 5 x 10^5 โพรโทพลาสต์ต่อมิลลิลิตร

ในการเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์จำนวนเริ่มต้น 5x10^4 โพรโทพลาสต์ต่อมิลลิลิตรนั้น พบว่าโพรโทพลาสต์ไม่สามารถเจริญเติบโตและแบ่งเซลล์ได้ ความมีชีวิตเท่ากับ 68.50 เปอร์เซ็นต์ หลังจากการเพาะเลี้ยงไปแล้ว 1 สัปดาห์ เนื่องจากมีจำนวนน้อยเกินไป ซึ่ง Reichert และ Liu (1996) ได้รายงานว่าโพรโทพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงแต่ละโพรโทพลาสต์จะปล่อยสารพวกเมแทบอไลต์ลงในอาหารเพาะเลี้ยงและสารนี้สนับสนุนการเจริญเติบโตของโพรโทพลาสต์ซึ่งกันและกัน หากมีจำนวนโพรโทพลาสต์น้อยเกินไปทำให้มีสารเหล่านี้น้อยไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตและการมีชีวิตรอดของโพรโทพลาสต์ ส่วนการทดลองที่ใช้จำนวนโพรโทพลาสต์เริ่มต้น 5 x 10^5 โพรโทพลาสต์ต่อมิลลิลิตรนั้น โพรโทพลาสต์มีความหนาแน่นมากทำให้เกาะติดกันเป็นกลุ่มใหญ่ หลังจากเพาะเลี้ยง 1 สัปดาห์ โพรโทพลาสต์จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ความมีชีวิตเท่ากับ 76.64 เปอร์เซ็นต์ อาจเนื่องจากโพรโทพลาสต์มีความหนาแน่นมากเกินไป ทำให้เกิดการแก่งแย่งอาหารซึ่งกันและกัน (Xu และ Jia , 1996)

2.2.3 ชนิดของอาหารเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์

ในการเพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์ อาหารเพาะเลี้ยงมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโต ชนิดของอาหารเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมขึ้นกับชนิดของโพรโทพลาสต์ จากการทดลองพบว่าโพรโทพลาสต์ ที่แยกได้จากใบโป๊ยเซียนเมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆ 16 สูตร โพรโท-พลาสต์สามารถสร้างผนังเซลล์ใหม่ได้ทุกสูตรยกเว้นสูตรที่มี 2,4-D 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมด้วย BA 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และเจริญแบ่งเซลล์ได้ในอาหารที่มี NAA ร่วมกับ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ (สูตรที่ 6-สูตรที่ 10) โดยในอาหารสูตรที่มี NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมด้วย BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดการสร้างผนังเซลล์ใหม่และการแบ่งเซลล์ได้สูงสุด ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช เช่น ออกซิน และ ไซโทไคนิน จำเป็นต่อการเจริญของพืชและมีส่วนสำคัญในการชักนำการสร้างผนังเซลล์และการแบ่งเซลล์ โพรโทพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงมีการสร้างผนังเซลล์ใหม่เกิดขึ้นภายใน 5-6 วัน สอดคล้องกับการทดลองของ Shahin และ Shepard (1980) ที่เพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์จากใบของมันสำปะหลัง ในอาหารสูตร MS ที่มี NAA ร่วมด้วย BA พบว่าโพรโทพลาสต์มีการสร้างผนังเซลล์ภายใน 1 สัปดาห์ และมีการแบ่งเซลล์เป็นโคโลนี และสอดคล้องกับ Kim และ Lee (1996) ที่พบว่าโพรโทพลาสต์ที่แยกได้จากใบของ *Dianthus superbus* เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มี NAA ร่วมด้วย BA สามารถสร้างผนังเซลล์ใหม่และแบ่งเซลล์เกิดเป็นแคลลัส นอกจากนี้ Marchant และคณะ (1997) รายงานว่า NAA และ BA เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีประสิทธิภาพมากต่อการชักนำให้เกิดการแบ่งเซลล์และการสร้างโคโลนี

ส่วนในสูตรอาหารที่มี 2,4-D พบว่ามีการสร้างผนังเซลล์ใหม่แต่ไม่พบการแบ่งเซลล์เลย ถึงแม้มีการสร้างผนังเซลล์ใหม่ขึ้นมาแล้ว ทั้งนี้เนื่องจากอาหารที่ทำให้เกิดการสร้างผนังเซลล์ใหม่อาจไม่เหมาะต่อการชักนำการแบ่งเซลล์และไม่เหมาะต่อการเจริญในการสร้างโคโลนีและแคลลัสต่อไป ในทางกลับกันอาหารที่เหมาะสมต่อการแบ่งเซลล์อาจไม่เหมาะต่อการชักนำการสร้างผนังเซลล์ใหม่ เพราะสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชอาจมีผลต่อเซลล์เมมเบรนโดยทำให้เกิดการขยายตัวจนแตกได้ (Balestri และ Cinelli , 2001) นอกจากนี้การลดแรงดันออสโมติกอย่างช้าๆของอาหารมีความจำเป็นต่อการรักษาอัตราการแบ่งเซลล์ ไม่อย่างนั้นโพรโทพลาสต์ของเซลล์ที่เกิดใหม่จะเกิดพลาสโมไลซีสขึ้นมาอีกและหดตัวผละจากผนังเซลล์ที่เกิดใหม่ การลดแรงดันออสโมติกทำได้โดยการเจือจางสารออสโมติคัม ซึ่งจะเติมอาหารใหม่ที่มีสารออสโมติคัมอยู่น้อยหรือไม่มีเลยลงไปในอาหารที่เพาะเลี้ยงโพรโทพลาสต์ (Katsirdakis และ Roubelakis, 1992) แต่โพรโทพลาสต์โป๊ยเซียนที่เพาะเลี้ยงไม่สามารถแบ่งเซลล์จนกลายเป็นแคลลัสได้อาจเนื่องจากชนิด

และความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใช้ยังไม่เหมาะต่อการเจริญของโพรโทพลาสต์ นอกจากนี้อาจต้องย้ายไปยังอาหารใหม่เพื่อให้เกิดการแบ่งเซลล์เป็นโคโลนีและสร้างเป็นแคลลัสต่อไป