บทที่ 4

วิจารณ์

1. วิธีการแยกโปรโตพลาสต์

เอนไซม์ที่ใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์ในปัจจุบันมีอยู่มากมายหลายชนิด ที่นิยมใช้กันมากคือ เซลลูเลส เพคติเนส และคอมบิเนชั่นของกลุ่มเซลลูเลสกับกลุ่มเพคติเนส (Eriksson, 1977) ในการศึกษานี้ใช้เอนไซม์ 2 ชนิด คือ เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์-10 และมาเซอโรไซม์อาร์-10 โดยใช้ระดับความเข้มข้นของเซลลูเลสโอโนซูกะอาร์-10 เข้มข้น 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์ ทุกระดับความเข้มข้นใช้ร่วมกับมาเซอโรไซม์อาร์-10 เข้มข้น 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์ จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการใช้สารละลายเอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์-10 เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับมาเซอโรไซม์อาร์-10 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เติม MES เข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์มีโซฟิลล์ของกล้วยไม้เหลืองจันทบูร ทำให้ได้จำนวนโปรโตพลาสต์มากขึ้นและความมีชีวิตสูงสุด ในขณะที่ Teo และ Neuman (1978) รายงานว่าการแยกโปรโตพลาสต์จากชิ้นส่วนโปรโตคอร์มของกล้วยไม้ลูกผสมสกุล *Renantada* Rosalind Cheok นอกจากเอนไซม์ดังกล่าวข้างต้นต้องใช้เอนไซม์ตัวอื่นร่วมด้วย แต่ของกล้วยไม้เหลืองจันทบูรใช้เอนไซม์เพียง 2 ชนิด ก็สามารถแยกโปรโตพลาสต์จากใบออกมาได้ อาจเนื่องมาจากเป็นกล้วยไม้ต่างชนิดกัน มีโครงสร้างของผนังเซลล์และองค์ประกอบของผนังเซลล์ที่แตกต่างกันออกไป ทำให้เอนไซม์ย่อยได้ยากง่ายแตกต่างกันออกไป

การเลือกใช้แหล่งโปรโตพลาสต์ถือว่าเป็นเรื่องที่สำคัญมาก โดยแหล่งโปรโตพลาสต์ที่ดีควรเป็นแหล่งที่ให้โปรโตพลาสต์เป็นจำนวนมาก มีความแข็งแรง ไม่แตกง่าย มีไซโตพลาสซึมหนาแน่น แวคิวโอลน้อยสามารถเจริญเป็นพืชต้นใหม่ได้ดี (พัฐวดี, 2536) โดยแหล่งของชิ้นส่วนพืชที่นำมาแยกโปรโตพลาสต์มีผลทำให้ได้จำนวน และความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์แตกต่างกันไป ลักษณะของเซลล์พืชที่นำมาทำการแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ต้องเป็นพืชที่มีอายุน้อย เพราะเซลล์ยังอ่อนทำให้เอนไซม์สามารถย่อย และแยกโปรโตพลาสต์ได้รวดเร็วขึ้น โปรโตพลาสต์ที่ได้ก็จะมีความแข็งแรงและมีความมีชีวิตสูง Nassour และ Dorion (2002) รายงานการแยกโปรโตพลาสต์จากชิ้นส่วนใบ ก้านใบ ลำต้น และราก ของ *Pelargonium* x *hortorum*

'Alain' พบว่าชิ้นส่วนใบให้จำนวนโปรโตพลาสต์สูงสุด คือ $2x10^7$ ต่อกรัมน้ำหนักสด และจากการศึกษาในครั้งนี้ก็พบว่าชิ้นส่วนใบสามารถให้จำนวนและความมีชีวิตสูงสุดคือ $1.53x10^7$ ต่อกรัมน้ำหนักสด และยังพบว่าการแยกโปรโตพลาสต์จากชิ้นส่วนโปรโตคอร์ม พบว่ามีเศษเซลล์ต่างๆ เป็นจำนวนมาก โปรโตพลาสต์มีลักษณะที่ไม่กลม เซลล์มีแวคิวโอลขนาดใหญ่สำหรับสะสมของเสียภายในเซลล์ บางเซลล์มีลักษณะใสไม่มีเม็ดคลอโรพลาสต์ด้านใน และในบางเซลล์มีผลึกรูปเข็ม (idioblast cell) อยู่ข้างในเป็นจำนวนมาก ซึ่งเป็นเซลล์ที่เกิดจากการสะสมของเสียจากขบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์ idioblast cell เป็นเซลล์พิเศษที่ต่างจากเซลล์อื่นๆ คือ ภายในสะสมสารแคลเซียมออกซาเลต เมื่อเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงกับโปรโตพลาสต์ที่แยกจากชิ้นส่วนใบ พบว่าเซลล์ที่มีผลึกรูปเข็มอยู่ข้างในจะทิ่มแทงเซลล์ทำให้เซลล์แตกหลุดออกมาภายนอกและทิ่มแทงเซลล์อื่นๆ ทำให้เซลล์อื่นแตกไปด้วย และเซลล์ที่มีลักษณะใสไม่มีพัฒนาการในการแบ่งเซลล์จึงไม่เหมาะแก่การนำไปเพาะเลี้ยง Kunasakdakul และ Smitamana (2003) รายงานการแยกโปรโตพลาสต์จากชิ้นส่วนใบของ *Dendrobium* Prathum Red ในหลอดทดลอง พบว่าโปรโตพลาสต์ที่แยกได้มีผลึกรูปเข็มอยู่ภายในเซลล์ และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงก็พบว่าผลึกรูปเข็มจะแทงทะลุเซลล์ออกมาและแทงเซลล์อื่นๆ ให้แตกไปด้วย เช่นเดียวกับรายงานของ Kanchanapoom และคณะ (2001) ที่แยกโปรโตพลาสต์จากชิ้นส่วนใบของกล้วยไม้ *Dendrobium* Pompadour ในหลอดทดลองซึ่งโปรโตพลาสต์ที่แยกได้ไม่มีการสร้างผนังเซลล์และแบ่งเซลล์ และยังพบปัญหาเกี่ยวกับการกำจัดผลึกรูปเข็มที่ทำให้เซลล์ของโปรโตพลาสต์แตก Krautwig และ Lorz (1995) ได้กล่าวถึงการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากช่อดอกที่ยังไม่เจริญเติบโตเต็มที่ เมล็ดที่เจริญเติบโตเต็มที่ ต้นอ่อน และชั้นมีโซฟิลล์ของใบข้าว และเซลล์ซัสเพนชั่นที่ชักนำจากต้นอ่อน เรณู ช่อดอกที่ยังไม่เจริญเติบโตเต็มที่ เมล็ดที่เจริญเติบโตเต็มที่ และแคลลัสจากใบของข้าว การเพาะเลี้ยงโปรโตพาสต์จากต้นอ่อนและเรณูของข้าวโพด ต้นอ่อนและแคลลัสของข้าวสาลี ต้นอ่อน เรณู และแคลลัสของข้าวบาร์เล่ย์ ที่ชักนำจากต้นอ่อนและเรณู ว่าการที่โปรโตพลาสต์ของพืชสามารถพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้นั้นขึ้นอยู่กับแหล่งชิ้นส่วนพืชที่นำมาแยก และเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์เป็นสำคัญ Abdullah และคณะ (1986) พบว่าการแยกและการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากเซลล์ซัสเพนชั่นของธัญพืช เช่น ข้าวโพดจะประสบปัญหาในเรื่องของการเพาะเลี้ยง โดยพบว่าหลังการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ไปแล้วโปรโตพลาสต์จะไม่มีพัฒนาการในการแบ่งเซลล์มากนัก แต่การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากเอ็มบริโอเจนนิคซัสเพนชั่นของข้าวกลับประสบผลสำเร็จในการเพาะเลี้ยงโดยสามารถพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้ และสรุปว่าการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่จากโปรโตพลาสต์ของธัญพืชขึ้นอยู่กับแหล่งของโปรโตพลาสต์เป็นสำคัญ รวมทั้งในพืชใบเลี้ยงคู่แหล่งของชิ้นส่วนพืชที่นำมาแยกโปรโตพลาสต์ก็เป็นส่วนสำคัญต่อจำนวนและความมี

ชีวิตของโปรโตพลาสต์ รวมถึงพัฒนาการหลังการเพาะเลี้ยงด้วยเช่นเดียวกัน Ai-Ping และคณะ (1995) รายงานการแยกโปรโตพลาสต์จากใบเลี้ยง ใบจริงที่เพาะเลี้ยงในและนอกหลอดทดลอง และเซลล์ซัสเพนชั่นของแอปเปิ้ล (*Malus* x *domestica* Borkh.) 4 สายพันธุ์ พบว่าสามารถแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์ซัสเพนชั่นได้จำนวนและความมีชีวิตสูงสุดในทุกสายพันธุ์ รองลงมาคือ ใบเลี้ยง และใบจริงที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง ส่วนใบจริงที่เพาะเลี้ยงนอกหลอดทดลอง พบว่าสามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้ในอัตราที่ต่ำมาก และจากการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากแหล่งต่างๆ ของแอปเปิ้ลพันธุ์ Starkrimson พบว่าโปรโตพลาสต์จากเซลล์ซัสเพนชั่นมีการแบ่งเซลล์สูงสุด 19.9 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ ใบเลี้ยง และใบจริงที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองแบ่งเซลล์ 16.5 และ 14.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนใบเลี้ยงนอกหลอดทดลองไม่พบการแบ่งเซลล์ โสภา (2542) รายงานการแยกโปรโตพลาสต์จากใบเลี้ยง ใบจริงจากต้นกล้าส้มโชกุน (*Citrus reticulate* Blanco) ที่เพาะเมล็ดในหลอดทดลอง และใบจากการเพาะเลี้ยงลำต้นเหนือใบเลี้ยง พบว่าสามารถแยกโปรโตพลาสต์จากใบทั้ง 3 ชนิดได้ $1.09x10^7$, $3.07x10^7$ และ $8.48x10^7$ โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด และความมีชีวิต 80.90, 85.86 และ 89.19 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ชวนพิศ (2543) รายงานการแยกโปรโตพลาสต์ของยางพาราจากใบอ่อนของต้นกล้าที่เพาะเลี้ยงคัพภะ ใบจากการเพาะเลี้ยงข้อใบเลี้ยง ปลายราก และเซลล์ซัสเพนชั่นอายุต่างๆ พบว่าใบสามารถให้จำนวนโปรโตพลาสต์สูง สุด $2.5x10^7$ โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด รองลงมาคือ เซลล์ซัสเพนชั่น ใบจากการเพาะเลี้ยงข้อใบเลี้ยง และปลายราก คือ $1.3x10^7$, $2.6x10^6$ และ $2.2x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ และพบว่าเซลล์ซัสเพนชั่นสามารถให้ความมีชีวิตสูงสุด 93 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ ราก ใบอ่อนจากการเพาะเลี้ยงคัพภะ และใบ คือ 90, 77 และ 66 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ทั้งหมดที่กล่าวมาแสดงให้เห็นว่าแหล่งของชิ้นส่วนพืชที่นำมาใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์ส่งผลต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์

อายุของชิ้นส่วนที่นำมาแยกโปรโตพลาสต์มีผลต่อจำนวน ความมีชีวิต และพัฒนาการของโปรโตพลาสต์หลังการเพาะเลี้ยงด้วย โดยปกติแล้วโปรโตพลาสต์ที่แยกจากเนื้อเยื่อที่มีอายุมากหรือมีการเจริญเติบโตในขั้นที่สอง (secondary growth) มักให้จำนวนโปรโตพลาสต์น้อยเนื่องจากเซลล์มีผนังหนามีสารพวกลิกนิน ซูเบอร์ลิน และคิวตินซึ่งยากแก่การย่อยด้วยเอนไซม์ และเซลล์ส่วนใหญ่จะไม่มีชีวิตแล้ว หรือหากมีก็ไม่มีการแบ่งเซลล์ต่อไป (ประศาสตร์, 2538) สมปอง (2536) รายงานว่าอายุของใบมีผลต่อความยากง่ายของเอนไซม์ในการย่อยให้ได้จำนวน โปรโตพลาสต์ที่มากน้อยแตกต่างกันออกไป Theodoropoulos และ Roubelakis-Angelakis (1990) พบว่าอายุของใบองุ่น (*Vitis vinifera* L.) มีผลต่อปริมาณและคุณภาพของโปรโตพลาสต์ที่แยกได้ จากการศึกษานี้พบว่าชิ้นส่วนพืชที่สามารถให้จำนวนและความมีชีวิตสูงสุดคือ ชิ้นส่วนใบกล้วยไม้เหลืองจันทบูรที่มีอายุ 4 สัปดาห์ และเมื่อใช้ชิ้นส่วนใบอายุ 5 สัปดาห์ พบว่าเซลล์มีผลึกรูปเข็มภายในเซลล์

เป็นจำนวนมาก ส่วนชิ้นส่วนใบที่มีอายุ 1 สัปดาห์ พบว่ามีจำนวนความมีชีวิตต่ำ เนื่องจากใบที่มีอายุน้อยจะมีผนังเซลล์เป็นแบบ primary wall (เทียมใจ, 2527) ซึ่งส่วนใหญ่ประกอบด้วยเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและเพคติน ซึ่งสารละลายเอนไซม์สามารถย่อยสลายผนังเซลล์ได้ง่ายส่งผลให้โปรโตพลาสต์มีความมีชีวิตต่ำ ซึ่งการใช้อายุของชิ้นส่วนที่เหมาะสมจะส่งผลให้ได้จำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์สูงสุด รวมถึงได้ลักษณะโปรโตพลาสต์ที่ดีด้วย และเมื่อนำมาเพาะเลี้ยงสามารถให้โปรโตโคลนได้ Sajise และ Sagawa (1988) ใช้แคลลัสของ ฟาแลนนอปซีสอายุ 3 สัปดาห์ ในการแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาส์ พบว่าสามารถพัฒนาให้ โปรโตโคลนหลังจากการเพาะเลี้ยง 60 วัน Yin และคณะ (1993) ใช้เซลล์ซัสเพนชั่นของข้าว หลังการย้ายเลี้ยง 3-5 วัน ในการแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาส์ พบว่าสามารถพัฒนาให้แคลลัสหลัง จากการเพาะเลี้ยง 40 วัน ประภาและเสาวรี (2543) รายงานการแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาต์จากใบ แคลลัส และเซลล์ซัสเพนชั่นของข้าวหอม (*Oryza sativa* L.) พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 พบว่าใบจากต้นกล้าอายุ 5 วัน แคลลัสอายุ 3 สัปดาห์ และเซลล์ซัสเพนชั่นอายุ 6 สัปดาห์ ให้จำนวน โปรโตพลาสต์ $9.14x10^6$, $3.39x10^6$ และ $2.96x10^6$ โปรโตพลาสต์ต่อกรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ แต่เมื่อตรวจสอบความมีชีวิตกลับพบว่าเซลล์ซัสเพนชั่นให้เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูงสุด 80-90 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ ใบ 60 เปอร์เซ็นต์ และแคลลัส 50-60 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ Assani และคณะ (2002) และ Assani และคณะ (2005) ใช้เอ็มบริโอเจนนิคเซลล์ซัสเพนชั่นของกล้วย หลังการย้ายเลี้ยง 3-4 วัน ในการแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาส์ พบว่าสามารถพัฒนาให้แคลลัสหลังจากการเพาะเลี้ยง 77-84 วัน นิจวรรณ (2545) ใช้เซลล์ซัสเพนชั่นของสะเดาช้างอายุ 5 วัน พบว่าสามารถให้การแบ่งเซลล์ 10.9 เปอร์เซ็นต์ Mizuhiro และคณะ (2001) ใช้เซลล์ซัสเพนชั่นของ *Primula malacoides* หลังการย้ายเลี้ยง 3-5 วัน ในการแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาส์ พบว่าสามารถพัฒนาให้โปรโตโคลนหลังจากการเพาะเลี้ยง 180 วัน ข้อมูลเหล่านี้แสดงให้เห็นถึงการเลือกใช้อายุของชิ้น ส่วนพืชที่เหมาะสมในการแยก มีผลต่อการเพาะเลี้ยงและพัฒนาการของโปรโตพลาสต์

ระยะเวลาในการอินคูเบทชิ้นส่วนพืชเป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่มีผลต่อจำนวน และความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ โดยพบว่าการอินคูเบทชิ้นส่วนพืชเป็นระยะเวลานาน ทำให้โปรโตพลาสต์อยู่ในสารละลายเอนไซม์นานเกินไป ส่งผลให้โปรโตพลาสต์เสียหายและความมีชีวิตลดลง Megia และคณะ (1992) รายงานการแยกโปรโตพลาสต์จากกล้วย โดยการอินคูเบทชิ้นส่วนแคลลัสในสารละลายเอนไซม์เป็นระยะเวลา 5 ชั่วโมง ให้จำนวนและความมีชีวิตสูงสุด Umate และคณะ (2005) ทำการแยกโปรโตพลาสต์จากชิ้นส่วนใบของ mulberry (*Morus imdica*) อินคูเบทในสารละลายเอนไซม์บนเครื่องเขย่าแบบวงกลม 40-50 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 5 ชั่วโมง พบว่าสามารถให้จำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์สูงสุด ในทำนองเดียวกันนี้พบว่าการอินคูเบท

ชิ้นส่วนใบกล้วยไม้เหลืองจันทบูรเป็นระยะเวลา 5 ชั่วโมง ให้จำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์สูงสุด ตรงข้ามกับ Kunasakdakul และ Smitamana (2003) ใช้ระยะเวลาในการอินคูเบทชิ้นส่วนใบของกล้วยไม้ *Dendrobium* Prathum Red ในหลอดทดลอง เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง ให้จำนวนความมีชีวิตและลักษณะของโปรโตพลาสต์ดีที่สุด ประภา และเสาวรี (2543) ใช้ระยะเวลาในการอินคูเบทชิ้นส่วนใบ แคลลัส และเซลล์ซัสเพนชั่นของข้าวหอม เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง พบว่าสามารถให้จำนวนโปรโตพลาสต์สูงสุด แต่เมื่อเพิ่มเป็น 5 ชั่วโมง ทำให้จำนวนโปรโตพลาสต์ลดลง Koh และคณะ (1985) ใช้ระยะเวลา *Aranda* Tay Swee Eng และ *Aranda* Noorah Alsagoff 10 และ 7 ชั่วโมง ตามลำดับ พบว่าการอินคูเบทชิ้นส่วนพืชเป็นระยะเวลานานส่งผลให้ความมีชีวิตลดลง Lee และคณะ (1989) กล่าวว่าระยะเวลาในการอินคูเบทชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อในสารละลายเอนไซม์มีผลต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ โดยถ้าระยะเวลาในการอินคูเบทชิ้นส่วนนานขึ้น จะทำให้จำนวนโปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตลดลง Theodoropoulos และ Roubelakis-Angelakis (1990) กล่าวว่าความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์ที่สูง และการอินคูเบทชิ้นส่วนพืชเป็นเวลานานทำให้เป็นอันตราย และเกิดความเสียหายต่อโปรโตพลาสต์ โดยส่งผลต่อโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ โสภา (2542) พบว่าการแยกโปรโตพลาสต์จากใบส้มจุกเป็นระยะเวลา 10 ชั่วโมง ทำให้ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ลดลงต่ำกว่าครึ่งหนึ่ง เนื่องจากโปรโตพลาสต์อยู่ในสารละลายเอนไซม์นานเกินไปซึ่งในองค์ประกอบของสารละลายเอนไซม์อาจมีสารหรือเอนไซม์ที่เป็นอันตรายต่อโปรโตพลาสต์ผสมอยู่ ดังนั้นควรเลือกระยะเวลาที่สั้นที่สุดที่สามารถย่อยโปรโตพลาสต์ได้จำนวนมากและความมีชีวิตสูง เพื่อพัฒนาการที่ดีในการเพาะเลี้ยงขั้นต่อไป

การทำงานของเอนไซม์ที่ใช้ขึ้นกับระดับความเป็นกรด-ด่างด้วย โดยระดับความเป็นกรด-ด่าง 5.6-5.8 ที่เหมาะสมส่งผลให้ความสามารถในการทำงานของเอนไซม์เพิ่มขึ้นด้วย นิจวรรณ (2545) ปรับระดับความเป็นกรด-ด่างของสารละลายเอนไซม์เป็น 5.7-5.8 ในการแยกโปรโตพลาสต์จากใบ แคลลัส และเซลล์ซสเพนชั่น พบว่าสามารถให้จำนวนและความมีชีวิตสูงสุด ทั้งนี้ Yin และคณะ (1993) รายงานว่าระดับความเป็นกรด-ด่างของสารละลายเอนไซม์ในการแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์ซัสเพนชั่นของข้าวคือ 5.8 ในขณะที่ Assani และคณะ (2002) และ Assani และคณะ (2005) รายงานการปรับระดับความเป็นกรด-ด่างของสารละลายเอนไซม์ที่ใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์ซัสเพนชั่น แคลลัส และใบของกล้วยคือ 5.6 พบว่าสามารถให้จำนวนโปรโตพลาสต์ 10^6 ต่อมิลลิลิตร ทุกชิ้นส่วน และความมีชีวิตของเซลล์ซัสเพนชั่น 71-91% ใบและแคลลัส 24-40% Haicour และคณะ (2004) รายงานการปรับระดับความเป็นกรดด่างของสารละลายเอนไซม์ในการแยกโปรโตพลาสต์จากใบ ราก และแคลลัสของกล้วยคือ 5.6 พบว่าสามารถให้จำนวนโปรโตพลาสต์ 0.1-2.8x10^6 ต่อมิลลิลิตร และให้เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูงสุด Pan และคณะ

(2003) ปรับระดับความเป็นกรด-ด่างของสารละลายเอนไซม์ในการแยกโปรโตพลาสต์จากใบ *Artemisia judaica* L. และ *Echinops spinosissimus* Turra. เป็น 5.6 อินคูเบทข้ามคืน พบว่าสามารถให้โปรโตพลาสต์ที่สามารถพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้ อย่างไรก็ตาม Chen และ Ku (1985) รายงานการปรับระดับความเป็นกรดด่างของสารละลายเอนไซม์ ในการแยกโปรโตพลาสต์จากใบกล้วยคือ 5.5 สำหรับการศึกษานี้ก็พบว่า ระดับความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์-10 เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับมาเซอโรไซม์อาร์-10 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เติม MES เข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ ในการแยกโปรโตพลาสต์จากใบของกล้วยไม้เหลืองจันทบูรคือ 5.5 ซึ่งใกล้เคียงกับกล้วยและข้าวที่กล่าวมาแล้วข้างต้น สมปอง (2539) รายงานว่าโดยทั่วไปแล้วระดับความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วง 4.7-6.2 หากสูงหรือต่ำกว่านี้จะทำให้ความมีชีวิตและปริมาณของโปรโตพลาสต์ที่แยกได้ลดลง

ชนิดและความเข้มข้นของออสโมติคัมของสารละลายเอนไซม์ที่ใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์มีความสำคัญมาก เนื่องจากโปรโตพลาสต์ที่แยกได้ไม่มีผนังเซลล์ ดังนั้นออสโมติคัมที่ไม่เหมาะสมอาจส่งผลต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ที่แยกได้ รวมถึงส่งผลต่อความอยู่รอดของโปรโตพลาสต์ด้วย (บุญยืน, 2540) การเลือกออสโมติคัมที่เหมาะสมเป็นการป้องกันไม่ให้โปรโตพลาสต์เหี่ยวและแตกในระหว่างการย่อย Mizuhiro และคณะ (2001) ได้ศึกษาชนิดของออสโมติคัมที่เหมาะสมต่อการพัฒนาการของ *Primula obconica* พบว่าการใช้กลูโคสร่วมกับแมนนิทอลให้ประสิทธิภาพในการพัฒนาการและการสร้างโคโลนีสูงสุด โดยทั่วไปแล้วการใช้แมนนิทอลอย่างเดียวก็เพียงพอ และความเข้มข้นที่ใช้ก็แตกต่างกันขึ้นกับชนิดพืช เช่น ในการแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์ซัสเพนชั่นของหญ้าแฝก (Prasertsongskun, 2004) และกาบใบข้าวใช้ แมนนิทอล เข้มข้น 0.4 โมลาร์ (กฤษณา, 2541) ใบกล้วยไม้สกุลอะแรนด้าใช้แมนนิทอล เข้มข้น 0.5 โมลาร์ (Loh and Rao, 1985) เช่นเดียวกับใบของ *Dendrobium* Prathum Red (Kunasakdakul and Smitamana, 2002) และใบ แคลลัส และเซลล์ซัสเพนชั่นของสะเดาช้าง (นิจวรรณ, 2545) สำหรับในการศึกษานี้ ออสโมติคัมที่เหมาะสมต่อการแยกและการเพาะเลี้ยงกล้วยไม้เหลืองจันทบูรคือ แมนนิทอล เข้มข้น 0.45 โมลาร์ ความแตกต่างของชนิดและความเข้มข้นของออสโมติคัมที่ใช้เป็นเพราะพืชต่างชนิดกันย่อมมีองค์ประกอบ และโครงสร้างของใบต่างกันทำให้ออสโมติกในใบต่างกัน ความเข้มข้นของออสโมติคัมสูงเกินไปนอกจากจะทำให้โปรโตพลาสต์เสียหายแล้วยังยับยั้งการแบ่งเซลล์อีกด้วย (Evans and Bravo, 1983; Wallin and Eriksson, 1973)

2. การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

โดยทั่วไปอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จะคล้ายคลึงกับอาหารที่เพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อทั่วไป แต่จำเป็นต้องเติมออสโมติคัมด้วยเพื่อควบคุมความดันออสโมติกจนกว่าโปรโตพลาสต์จะสร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่ Eriksson (1977) รายงานว่าการสร้างผนังเซลล์ของโปรโตพลาสต์ขึ้นอยู่กับแรงดันออสโมติกภายในเซลล์ ถ้าแรงดันออสโมติกภายในเซลล์สูงจะทำให้การสร้างผนังเซลล์ใหม่ และการแบ่งเซลล์เกิดขึ้นช้า นอกจากชนิดของอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงแล้ว ชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เติมในอาหารเพาะเลี้ยงก็ส่งผลต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ ซึ่งแม้พืชในสกุลเดียวกันก็ยังมีความต้องการสารควบคุมการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันออกไป จากการศึกษาพบว่าอาหารเหลวสูตร MS ร่วมกับ NAA เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์ดีที่สุด ในขณะที่ Sajise และ Sagawa (1988) เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากแคลลัสกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอปซีส ในอาหารเหลวสูตรดัดแปลง VW ร่วมกับ 1/2 ธาตุอาหารรองในสูตร MS โดยปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโตสามารถชักนำแคลลัส และสร้างโปรโตคอร์มได้ Kunasakdakul และ Smitamana (2003) เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบอ่อนของกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอปซีสในอาหารเหลวสูตรดัดแปลง PS เติม NAA เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร BAP เข้มข้น 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร และ Zeatin เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำแคลลัสและพัฒนาเป็นแคลลัสที่มีลักษณะเหมือนเอ็มบริโอเจนนิคได้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากพืชต่างชนิดกันต้อง การธาตุอาหารที่แตกต่างกันในการแบ่งเซลล์และพัฒนาการไปเป็นพืชต้นใหม่

ความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์เริ่มต้นที่เพาะเลี้ยงก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการมีชีวิตรอด และการเจริญเติบโตของโปรโตพลาสต์ โดยทั่วไปในกล้วยไม้ใช้ความหนาแน่นเริ่มต้น $1x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร (พัฐวดี, 2536; คำนูณ, 2540) อย่างไรก็ตามโปรโตพลาสต์ไม่สามารถเจริญเติบโตและมีชีวิตรอดได้หลังจากการเพาะเลี้ยงไป 2 สัปดาห์ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากที่ความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์สูง อาจมีการปลดปล่อยสารชีวเคมีออกมามากจนยับยั้งการแบ่งเซลล์ แต่ Sajise และ Sagawa (1988) รายงานการเพาะเลี้ยงกล้วยไม้ที่ความหนาแน่น $1x10^6$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ส่งผลให้ได้แคลลัสและพัฒนาเป็นโปรโตโคลนได้ สำหรับการศึกษาในกล้วยไม้เหลืองจันทบูร พบว่าที่ความหนาแน่น $5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ส่งเสริมการแบ่งเซลล์และพัฒนาการของโปรโตพลาสต์สูงสุด อย่างไรก็ตามโปรโตพลาสต์ของกล้วยไม้เหลืองจันทบูรก็ไม่สามารถเจริญเติบโตและมีชีวิตรอดได้หลังจากการเพาะเลี้ยงไป 2 สัปดาห์ Assani และคณะ (2005) รายงานการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากเอ็มบริโอเจนนิคเซลล์ซัสเพนชั่นของกล้วย โดยปรับความหนาแน่นก่อนเพาะเลี้ยงเป็น $5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร พบว่าสามารถพัฒนา

เป็นโซมาติกเอ็มบริออยด์ได้ Yin และคณะ (1993) รายงานการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากเซลล์ซัสเพนชั่นของข้าว โดยปรับความหนาแน่นของโปรโตพลาสต์ก่อนเลี้ยงเป็น $5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร พบว่าโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงสามารถพัฒนาการไปเป็นพืชต้นใหม่ได้ ในพืชใบเลี้ยงคู่บางชนิดใช้ความหนาแน่นเริ่มต้นเลี้ยงต่ำเพียง $5x10^4$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ได้แก่ การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากชิ้นส่วนโซมาติกเอ็มบริออยด์ของฝ้าย (*Gossypium hirsutum*) พันธุ์ Coker 201 ความหนาแน่นที่สูงเกินไป $5x10^6$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ส่งเสริมการเกิดสีน้ำตาล (Sun *et al*., 2005) Haicour และคณะ (2004) เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของกล้วยในอาหารเหลวที่ความหนาแน่นสูง 10^5x10^6 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร พบว่าสามารถพัฒนาเป็นโปรโตโคลนได้ Kao และ Michaylux (1975) รายงานว่าจำนวนโปรโตพลาสต์เริ่มต้นที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงมีผลต่อ ประสิทธิภาพและการเจริญของโปรโตพลาสต์ เนื่องจากโปรโตพลาสต์แต่ละเซลล์มีการแพร่สาร เมตาบอไลต์ที่สร้างลงในอาหารเพาะเลี้ยง และสารเหล่านี้สนับสนุนการเจริญเติบโตของ โปรโตพลาสต์ซึ่งกันและกัน จารุวัตร (2534) กล่าวว่าหากมีโปรโตพลาสต์น้อยเกินไปทำให้สารเหล่านี้น้อยเกินไปทำให้มีสารเหล่านี้น้อยไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโต และการมีชีวิตรอดของ โปรโตพลาสต์ Hidano และ Nuzeki (1988) รายงานว่าความหนาแน่นที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ไม้ผลอยู่ในช่วง $1x10^5$-$1x10^6$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร การเพาะเลี้ยงที่ความหนาแน่นมากเกินไปทำให้โปรโตพลาสต์แก่งแย่งอาหารซึ่งกันและกัน ในทางตรงกันข้ามหากมีจำนวนน้อยเกินไปโปรโตพลาสต์ก็ไม่สามารถเจริญได้

ชนิดของน้ำตาลก็มีผลต่อพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ โดยทั่วไปพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ได้ดีในอาหารเติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ (Mizuhiro *et al*., 2001; Balestri and Cinelli, 2001; Haicour *et al*., 2004) ทำนองเดียวกับการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์กล้วยไม้เหลืองจันทบูร ในการศึกษานี้พบว่า การใช้น้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ให้พัฒนาการในการแบ่งเซลล์และการสร้างมาโครโคโลนีสูงสุด Mizuhiro และคณะ (2001) เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์พริมโรส ในสกุล *Primula malacoides* และ *Primula obconica* โดยใช้น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ พบว่าโปรโตพลาสต์สามารถพัฒนาการไปเป็นพืชต้นใหม่ภายใน 150 วัน Kunasakdakul และ Smitamana (2003) รายงานการแยกโปรโตพลาสต์จากชิ้นส่วนใบของ *Dendrobium* Prathum Red ในหลอดทดลองและเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่เติมน้ำตาลซูโครส เข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับกลูโคส เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ พบว่าโปรโตพลาสต์สามารถแบ่งเซลล์จนได้ไมโครโคโลนี 4-5 เซลล์ และภายใน 2 เดือน สามารถพัฒนาจนได้เซลล์ที่มีลักษณะเหมือนแคลลัส ดังนั้นน้ำตาลซึ่งเป็นแหล่งของคาร์บอนจึงมีส่วนสำคัญในการให้การพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่แตกต่างกันไปขึ้นกับชนิดของพืชด้วย

ในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์โดยทั่วไปแล้ว อาหารเพาะเลี้ยงมักใช้สูตร MS เป็นพื้นฐาน แล้วดัดแปลงโดยการเติมสารบางอย่างลงไปเพื่อให้เหมาะสมกับโปรโตพลาสต์แต่ละชนิด (พัฐวดี, 2536) ในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์กล้วยไม้นั้น สูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงได้แก่สูตร MS, B5, KC, KM8P และ VW เป็นต้น Loh และ Rao (1985) เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์อะแรนด้าในสูตรอาหาร VW ดัดแปลงโดยการเติมน้ำมะพร้าว 10 เปอร์เซ็นต์ อย่างเดียว Sajise และ Sagawa (1988) เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากแคลลัสของฟาแลนนอปซีสในอาหารสูตร VW ดัดแปลงโดยการเติม 1/2 ของธาตุอาหารรองของสูตร MS ในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์พบว่าโปรโตพลาสต์สามารถพัฒนาเป็นแคลลัสและโปรโตคอร์มได้ Haicour และคณะ (2004) เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์กล้วยบนอาหารสูตร MS พบว่าสามารถพัฒนาไปเป็นโปรโตโคลนได้ Li และคณะ (2005) เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ของ moss *(Atrichum undulatum P. Beauv)* ในหลอดทดลองในอาหารเหลวสูตร MS พบว่าโปรโตพลาสต์มีการแบ่งเซลล์ 45% และสามารถพัฒนาเป็นโปรโตโคลนได้ และจากการศึกษาในสูตรอาหาร MS, VW และ VW ดัดแปลงโดยการเติม 1/2 ธาตุอาหารรองในสูตร MS ทั้งที่เติมและไม่เติมน้ำมะพร้าว พบว่าอาหารสูตร MS ที่ไม่มีการเติมน้ำมะพร้าวให้พัฒนาการของโปรโตพลาสต์สูงสุด

- การเพาะเลี้ยงบนอาหารเหลว (culturing on liquid media) เทคนิคในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์มีด้วยกันหลากหลายวิธีด้วยกัน แต่มักกระทำใน 2 วิธีการใหญ่ๆ คือการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว และการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งหรือกึ่งแข็งกึ่งเหลว ซึ่งแต่ละวิธีสามารถแบ่งออกเป็นอีกหลายวิธีด้วยกัน และจากการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์กล้วยไม้เหลืองจันทบูรด้วยวิธีการที่หลากหลาย พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารเหลวเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ ให้การแบ่งเซลล์และพัฒนาการสูงสุดหลังจากนั้นจะไม่มีการพัฒนาต่อไปอีก สอดคล้องกับการราย งานของ Loh และ Rao (1985) ที่กล่าวว่าเมื่อเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ไป 15 วัน จำนวน โปรโตพลาสต์จะแบ่งตัวเพิ่มขึ้น 48-75% และกลุ่มเซลล์เหล่านี้จะไม่มีพัฒนาการต่อไปอีก เนื่อง จากโมเลกุลของอาหารสามารถแพร่เข้าสู่โปรโตพลาสต์ได้ทันที ทำให้ไม่ขาดแคลนสารอาหารและสามารถสร้างผนังเซลล์ใหม่ได้ ประภา และเสาวรี (2543) เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารเหลว พบว่าสามารถสร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่ภายหลังการเพาะเลี้ยง 2-3 ชั่วโมง แต่ไม่สามารถแบ่งเซลล์เพื่อสร้างโคโลนีหรือแคลลัส ทำนองเดียวกับการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งซึ่งไม่สามารถแบ่งเซลล์ได้เช่นกัน Yan-Xiu และคณะ (1991) ที่รายงานว่าโปรโตพลาสต์ของชะบาจีน (*Hibiscus syriacus*) เมื่อเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารเหลวเกิดการแบ่งเซลล์ 64 เปอร์เซ็นต์ มากกว่าวิธีการอื่นๆ เช่นเดียวกับ Prasertsongskun (2004) ที่รายงานว่าโปรโตพลาสต์จากเซลล์ซัสเพนชั่นของหญ้าแฝกสามารถแบ่งเซลล์ได้เฉพาะในอาหารเหลวเท่านั้น และแบ่งเซลล์สูงสุด 5.1 เปอร์เซ็นต์ ลัดดาวัลย์

(2544) รายงานการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบมังคุด พบว่าสามารถส่งเสริมการแบ่งเซลล์สูงสุด 6.93 เปอร์เซ็นต์ หลังการเพาะเลี้ยง 1 สัปดาห์ โดยทั่วไปแล้วมักนิยมเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารเหลวก่อน (Price and Earle, 1984; Loh and Rao, 1985; Koh *et al*., 1988) และเมื่อมีการสร้างผนังเซลล์และแบ่งเซลล์แล้ว จึงย้ายลงในอาหารแข็ง

- การเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง (culturing on solid media) และการเพาะเลี้ยงแบบอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว (culturing on semisolid media) จากการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์กล้วยไม้เหลืองจันทบูร พบว่าโปรโตพลาสต์ไม่สามารถแบ่งเซลล์แตกและตายหลังการเพาะเลี้ยงไปได้ 3 วัน เนื่องจากโปรโตพลาสต์สูญเสียออสโมติกโพเทนเชียล (osmotic potential) และอาจเนื่องมาจากโมเลกุลของสารอาหารถูกยึดเกาะอยู่กับวุ้นแพร่เข้าสู่โปรโตพลาสต์ได้ยาก โปรโตพลาสต์จึงขาดอาหารและตายในที่สุดเช่นเดียวกับ คำนูณ (2540) และ ประภา และเสาวรี (2543) กล่าวว่าเมื่อทำการเลี้ยงเซลล์ในอาหารแข็ง จะพบว่าเมื่อเลี้ยงไปได้ 1 วัน โปรโตพลาสต์แตกทั้งหมด พัฐวดี (2536) รายงานการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารเหลว อาหารแข็ง อาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว อาหารเหลวแบบหยด พบว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งโปรโตพลาสต์แตกเป็นส่วนใหญ่ แต่การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวและอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวโปรโตพลาสต์มีชีวิตรอดได้นานที่สุด

- การเพาะเลี้ยงแบบบีดหรือดิสค์ (bead or disc culture) Mizuhiro และคณะ (2001) เพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ *Primula malacoides* และ *Primula obconica* โดยเทคนิคแบบบีดหรือดีสค์ พบว่าหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 150 วัน โปรโตพลาสต์สามารถพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ได้ แต่จากการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์กล้วยไม้เหลืองจันทบูร พบว่าหลังการเพาะเลี้ยง 1 สัปดาห์ โปรโตพลาสต์มีการแตกหน่อ แต่ไม่พบการแบ่งเซลล์ สัปดาห์ที่ 2 โปรโตพลาสต์แตกตายทั้งหมด

- การเพาะเลี้ยงแบบเทคนิคฟีดเดอร์ Haicour และคณะ (2004) รายงานการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาต์ของกล้วยโดยวิธีการที่หลากหลายดังนี้คือ เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว อาหารแข็ง อาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว การฝังเลี้ยงในอาหารเหลว แบบบีด และเซลล์พี่เลี้ยงในอาหารเหลว แบบฟีดเดอร์ พบว่าการเพาะเลี้ยงด้วยเซลล์พี่เลี้ยงแบบฟีดเดอร์ โดยใช้ข้าว *Lolium multiflorum*, *Triticum monococcum* (Poaceae) และเซลล์ซัสเพนชั่นของกล้วยเป็นฟีดเดอร์เซลล์ให้การพัฒนา การของโปรโตพลาสต์ไปเป็นโซมาติกเอ็มบริออยได้ แต่จากการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์กล้วยไม้เหลืองจันทบูร พบว่าการเพาะเลี้ยงโดยใช้โปรโตพลาสต์ และเซลล์ซัสเพนชั่นของยาสูบเป็นเซลล์ พี่เลี้ยง ให้ผลต่อพัฒนาการในการแบ่งเซลล์ได้ดีแต่ผลที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่เมื่อพิจารณาถึงเปอร์เซ็นต์การแตกหน่อ พบว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ส่วนการใช้โปรโตพลาสต์และเซลล์ซัสเพนชั่นของกุหลาบมอญ ให้ผลในการแบ่งเซลล์ต่ำกว่าการไม่มีเซลล์พี่เลี้ยงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดยการเพาะเลี้ยงโดยมีเซลล์พี่เลี้ยงพบการแตกหน่อมากกว่าการ

เลี้ยงในอาหารเหลว แต่จะเห็นได้ว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์พี่เลี้ยงในอาหารที่เติมไฟตาเจลจะให้ผลดีกว่าการเลี้ยงในอาหารที่เติมอากาโรส แต่อย่างไรก็ตามการที่นำเซลล์พี่เลี้ยงทั้งสองมาทำการเลี้ยงในอาหารแข็งอาจเป็นอีกสาเหตุหนึ่ง ที่ทำให้สารชีวเคมีที่เซลล์พี่เลี้ยงปลดปล่อยออกมาสัมผัสกับโปรโตพลาสต์ของกล้วยไม้เหลืองจันทบูรเฉพาะส่วนบนเท่านั้น อีกสาเหตุอาจเกิดจากการที่โปรโตพลาสต์ที่นำมาทำเป็นเซลล์พี่เลี้ยงมีความหนาแน่นต่ำเกินไป ส่วนอายุของเซลล์ซัสเพนชั่นที่นำมาทำเป็นเซลล์พี่เลี้ยงอาจไม่เหมาะต่อการส่งเสริมพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ ซึ่งทำให้เซลล์ไม่มีประสิทธิภาพในการเป็นเซลล์พี่เลี้ยงให้กับโปรโตพลาสต์กล้วยไม้เหลืองจันทบูร

ในการศึกษาต่อไป ควรทำการศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงเพิ่มเติม เช่น การศึกษาเกี่ยวกับการนำสาร PVP (Polyvinylpyrrolidone) ผงถ่าน มาใช้เพื่อการดูดซับสารที่ปลดปล่อยออกมามากเกินไปจนไปมีผลในการยับยั้งการแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์ การเติมแคลเซียม และแมกนีเซียมเพื่อช่วยในการสร้างผนังเซลล์และการแบ่งเซลล์ ทั้งนี้แคลเซียมมีคุณสมบัติที่สำคัญคือเป็นตัวเชื่อมสารชีวโมเลกุลเข้าด้วยกัน รวมถึงโครงสร้างและสมบัติทางสรีระของเยื่อหุ้มเซลล์ และมิดเดิลลาเมลลาของผนังเซลล์ทำให้เซลล์มีความแข็งแรง แต่หากใช้ในปริมาณที่มากเกินไปก็ไม่ส่งผลดีต่อเซลล์ รวมถึงการนำพืชในสกุลเดียวกันมาทำเป็นเซลล์พี่เลี้ยง ทั้งนี้เพื่อความสำเร็จในการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่