บทที่ 4

วิจารณ์

1. การชักนำแคลลัสและพืชต้นใหม่

การชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนใบสะเดาช้างด้วยอาหารสูตร MS เติมออกซิน NAA หรือ 2,4-D ร่วมกับ ไซโตไคนิน BA หรือ KN พบว่า NAA ให้แคลลัสประเภทคอมแพคแคลลัส ในขณะที่ 2,4-D ให้แคลลัสเป็นประเภทฟรายเอเบิลแคลลเป็นส่วนใหญ่ ลัดดาวัลย์ มูสิกะปาละ (2544) รายงานว่า ใบชะมวงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเติม NAA ร่วมกับ BA และใบมะพูดที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร เติม 2,4-D ร่วมกับ BA ให้แคลลัสเป็นประเภทฟรายเอเบิลแคลลัส ในการศึกษานี้แคลลัสที่ได้มักเกิดขึ้นบริเวณรอยตัดของชิ้นส่วนใบก่อน แล้วจึงเกิดบริเวณแผ่นใบ ทั้งนี้เนื่องมาจากบริเวณรอยตัดมีการดูดซับอาหารได้เร็วที่สุด สอดคล้องกับการทดลองของ ลัดดาวัลย์ มูสิกะปาละ (2544) รายงานว่า แคลลัสจากใบมะพูด มะดัน และชะมวง ส่วนใหญ่มักเกิดบริเวณรอยตัดของชิ้นส่วน

NAA สามารถชักนำแคลลัสได้สูงสุดเมื่อใช้ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อใช้ความเข้มข้นต่ำกว่านี้ ทำให้การชักนำแคลลัสลดลง ในขณะที่ 2,4-D ชักนำแคลลัสได้สูงสุดเมื่อใช้ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อความเข้มข้นสูงขึ้น การชักนำแคลลัสลดลง และเมื่อความเข้มข้นเป็น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ใบสะเดาช้างตายไม่สามารถสร้างแคลลัสได้ เนื่องจาก 2,4-D เป็นออกซินที่มีกิจกรรมสูงกว่า NAA สอดคล้องกับการทดลองของ อรอุมา รุ่งน้อย (2539) ซึ่งรายงานว่า สะเดาเทียมตอบสนองต่อ 2,4-D ความเข้มข้นต่ำ (2 ไมโครโมลาร์)

จากการทดลองนี้ สารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณคอมแพคแคลลัส คือ NAA เข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ KN 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตามเมื่อย้ายเลี้ยงเพิ่มปริมาณครั้งที่ 2 แคลลัสเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน ในขณะที่ NAA เข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มปริมาณได้ แต่พบว่าหลังจากเลี้ยงเพิ่มปริมาณเป็นระยะเวลา 3 เดือน โดยย้ายเลี้ยงไปยังอาหารใหม่ทุกเดือน แคลลัสเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลบริเวณที่สัมผัสกับอาหาร ส่วนสารควบคุมที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณฟรายเอเบิลแคลลัส คือ 2,4-D ร่วมกับ BA เข้มข้นชนิดละ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 2,4-D เข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ KN เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มปริมาณและดูแลรักษาฟรายเอเบิลได้หากมีการย้ายเลี้ยงทุกเดือน หากเพาะเลี้ยงเกิน 1 เดือนแล้วยังไม่ได้ย้ายเลี้ยง ทำให้แคลลัสเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเนื่องจากมีการสะสมของสารประกอบฟีนอล

การชักนำพืชต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเกิดขึ้นจาก 2 กระบวนการ คือ ออร์กาโนเจนีซีส เป็นกระบวนการสร้างอวัยวะต่าง ๆ เช่น รากหรือยอด จากเซลล์หรือเนื้อเยื่อพืช และเอ็มบริโอเจนีซีส

เป็นกระบวนการกำเนิดและพัฒนาการไปเป็นต้นอ่อน ส่วนใหญ่ทางด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มักได้มาจากเซลล์หรือเนื้อเยื่อของเซลล์ร่างกาย ดังนั้นจึงเรียกว่า กระบวนการโซมาติกเอ็มบริโอเจนีซีส ความสำเร็จของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมักขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ หลายปัจจัยด้วยกัน เช่น ชิ้นส่วนพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง สูตรอาหาร สารควบคุมการเจริญเติบโต ความเข้มข้นของน้ำตาล และปัจจัยทางสภาพแวดล้อม ในพืชชนิดเดียวกัน เซลล์ เนื้อเยื่อ หรืออวัยวะที่ต่างกันให้ผลตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงที่ต่างกัน ถึงแม้เป็นชิ้นส่วนเดียวกัน บริเวณใกล้เคียงกันยังให้ผลการพัฒนาที่แตกต่างกัน ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสกุล *Azadirachta* พบว่าสามารถเพาะเลี้ยงได้จาก ชิ้นส่วนใบ (Eeswara *et al*., 1998 ; สมปอง เตชะโต และอรอุมา รุ่งน้อย, 2542 ; Te-chato and Rungnoi, 2000) อับละอองเกสร (Gautam *et al*., 1993) เมล็ด (Su *et al*., 1997 ; Murthy and Saxena, 1998) และตาข้าง (Liew and Teo, 1998) โดยชิ้นส่วนที่ต่างกันมีกระบวนการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ที่ต่างกัน การพัฒนาพืชต้นใหม่ผ่านกระบวนการออร์กาโนเจนีซีสอาจเกิดขึ้นจากชิ้นส่วนที่มีจุดกำเนิดของยอดหรือรากอยู่แล้ว เช่น ข้อ ปลายยอด เป็นต้น ชิ้นส่วนดังกล่าวเจริญให้ยอดโดยตรง ดังรายงานของ Liew และ Teo (1998) ได้เพาะเลี้ยงตาข้างสะเดาช้าง ซึ่งสามารถพัฒนาเป็นยอด หรือผ่านการสร้างแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนอื่น ๆ เช่น การเพาะเลี้ยงเลี้ยงอับละอองเกสรสะเดาอินเดีย มีพัฒนาการเป็นแคลลัสจากนั้นพัฒนาเป็นยอดจากแคลลัส (Gautam *et al*., 1993) ส่วนกระบวนการเอ็มบริโอเจนีซีสสามารถพัฒนาจากชิ้นส่วนใบผ่านการสร้างแคลลัส (Te-chato and Rungnoi, 2000) ใบเลี้ยง หรือ ลำต้นใต้ใบเลี้ยง (Murthy and Saxena, 1998 ; Su *et al*.,1997) อาหารที่ใช้เลี้ยงเพื่อชักนำการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ทั้งสองกระบวนการในการเพาะเลี้ยงพืชสกุล *Azadirachta* ที่ผ่านมาส่วนใหญ่เป็นอาหารสูตร MS (Eeswara *et al*., 1998 ; Gautam *et al*., 1993 ; Liew and Teo, 1998 ; Su *et al*., 1997 ; Murthy and Saxena, 1998 ; Te-chato and Rungnoi, 2000 ; สมปอง เตชะโต และอรอุมา รุ่งน้อย, 2542) และยังมีการใช้สูตรอื่น ๆ ในบางขั้นตอนการเพาะเลี้ยง เช่น ในขั้นตอนชักนำแคลลัสใช้อาหารสูตร Nitsch and Nitsch (NN) (Gautam *et al*., 1993) และขั้นตอนการชักนำเอ็มบริโอใช้อาหารสูตร Schenk and Hildebrandt (SH) (Te-chato and Rungnoi, 2000) นอกจากนี้สารควบคุมการเจริญเติบโตหรืออัตราส่วนระหว่างออกซินและไซโตไคนินมีผลต่อกระบวนการเกิดพืชต้นใหม่ ในการชักนำยอดมักใช้เฉพาะไซโตไคนินเพียงชนิดเดียวหรือใช้ร่วมกับออกซินความเข้มข้นต่ำ เช่น Eeswara และคณะ (1998) ใช้ไซโตไคนิน 2 ชนิด (BAP และ KN) เพื่อชักนำยอดจากชิ้นส่วนใบสะเดาอินเดีย ในขณะที่ สมปอง เตชะโต และอรอุมา รุ่งน้อย (2542) ใช้ออกซิน (NAA) ความเข้มข้นต่ำร่วมกับ ไซโตไคนิน (BA) ความเข้มข้นสูงในการชักนำยอดจากชิ้นส่วนใบสะเดาช้าง Murthy และ Saxena (1998) รายงานว่า TDZ (1-50 ไมโครโมลาร์) เพียงชนิดเดียวมีประสิทธิภาพในการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอของสะเดาอินเดีย นอกจากนี้วิตามินบางชนิดที่เติมลงไปในอาหารส่งเสริมการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ เช่น

เคซีนไฮโดรไลเสท (casein hydrolysate) เข้มข้น 500 - 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งเสริมการพัฒนายอดจำนวนมาก (สมปอง เตชะโต และอรอุมา รุ่งน้อย, 2542) และการพัฒนาเอ็มบริโอ (Su *et al*., 1997 ; Te-chato and Rungnoi, 2000) นอกจากนี้ Eeswara และคณะ (1998) ใช้ อะดีนีนซัลเฟต (adenine sulphate) ในการส่งเสริมการพัฒนายอดจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบ ความเข้มข้นของน้ำตาลมีผลต่อการชักนำกระบวนการเอ็มบริโอเจนีซีส โดย Su และคณะ (1997) รายงานการใช้ซูโครส 50 กรัมต่อลิตร ในการชักนำกระบวนการเอ็มบริโอเจนีซีสในสะเดาอินเดีย ในการทดลองนี้พบว่า เคซีนไฮโดรไลเสทมีผลต่อการชักนำยอดจากแคลลัสโดยกระบวนการออร์กาโนเจนีซีสจากชิ้นส่วนใบสะเดาช้าง อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพยังคงต่ำ ดังนั้นครั้งต่อไปจึงควรทดลองใช้ อาหารสูตร SH TDZ และเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาล เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการชักนำพืชต้นใหม่

2. การแยกโปรโตพลาสต์

ปัจจัยที่มีผลต่อการแยกโปรโตพลาสต์ในพืชโดยทั่วไป ได้แก่ ชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ ชนิดและความเข้มข้นของออสโมติคัม อายุใบหรือขนาดใบ วิธีการเตรียมใบก่อนนำมาแยก และแหล่งของโปรโตพลาสต์ที่นำมาแยก

ชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์มีผลต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบสะเดาช้าง เอนไซม์ที่ใช้ย่อยผนังเซลล์พืชมี 3 กลุ่ม คือ กลุ่มเซลลูเลส เช่น เซลลูเลส, ไดรซีเลส และเซลลูไลซิน กลุ่มเฮมิเซลลูเลส เช่น เฮมิเซลลูเลส และโรไซม์ และกลุ่มเพคติเนส เช่น เพคติเนส, มาเซอไรไซม์ และ เพคโตไลเอส (Evans and Bravo, 1983) ชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์นั้นขึ้นกับ ชนิดของพืช และเนื้อเยื่อที่นำมาเป็นแหล่งโปรโตพลาสต์ เอนไซม์ที่ใช้อาจจะเป็นชนิดเดียวหรือหลายชนิดรวมกันก็ได้ จารุวัฒน์ จันทร์ประดิษฐ์ (2534) สามารถแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์ซัสเพนชั่นของโกโก้ได้โดยใช้เอนไซม์ไดรซีเลสเพียงชนิดเดียว ในขณะที่พืชหลายชนิดต้องการเอนไซม์ผสม 2 ชนิดขึ้นไปเพื่อแยกโปรโตพลาสต์ เช่น ใช้เอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์-10 ร่วมกับมาเซอโรไซม์อาร์-10 ในการแยกโปรโตพลาสต์จากใบส้มแขก (Te-chato, 1997) และใบนมตำเลีย (สมัชชา นาคสมบัติ, 2543) โสภา ทวีคณะโชติ (2542) ใช้เอนไซม์ผสม 3 ชนิด คือ เพคโตไลเอสวาย-23 เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส และมาเซอโรไซม์อาร์-10 ในการแยกโปรโตพลาสต์จากใบส้มจุก สำหรับการศึกษานี้ได้ทดลองใช้เอนไซม์ผสม 2 ชนิด คือ เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส หรือเซลลูเลส อย่างใดอย่างหนึ่งร่วมกับมาเซอโรไซม์อาร์-10 พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส หรือเอนไซม์เซลลูเลส มีผลให้แยกโปรโตพลาสต์ได้มากขึ้น อย่างไรก็ตามพบว่าความมีชีวิตลดลง เอนไซม์เซลลูเลสสามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้มากกว่าเซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส แต่ความมีชีวิตต่ำกว่าครึ่งหนึ่ง อาจเป็นเพราะอินคิวเบทเป็นระยะเวลานานกว่า คือ 10 ชั่วโมง ในขณะ

ที่ในสารละลายเอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส อินคิวเบทเป็นเวลา 3 ชั่วโมง เนื่องจากโปรโตพลาสต์อยู่ในสารละลายเอนไซม์นานเกินไป ซึ่งในองค์ประกอบของเอนไซม์ดังกล่าวอาจมีสารหรือเอนไซม์ที่เป็นอันตรายต่อโปรโตพลาสต์ผสมอยู่ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์มาเซอโรไซม์อาร์-10 จาก 1.0 เป็น 2.0 เปอร์เซ็นต์ ไม่ทำให้แยกโปรโตพลาสต์ได้เพิ่มขึ้น และความมีชีวิตมีแนวโน้มลดลง ทั้งนี้เพราะเอนไซม์มาเซอโรไซม์ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เพียงพอต่อการย่อยสารเพคตินที่เชื่อมระหว่างเซลล์ทำให้เซลล์หลุดออกมาเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ ง่ายต่อการย่อยผนังเซลล์ด้วยเอนไซม์กลุ่มเซลลูเลส ให้ผลสอดคล้องกับการทดลองของ สมัชชา นาคสมบัติ (2543) ซึ่งใช้เอนไซม์มาเซอโรไซม์อาร์-10 เข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ ในการแยกโปรโตพลาสต์ของใบนมตำเลีย สำหรับการทดลองนี้เลือกเอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส เข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับมาเซอโรไซม์ เข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ มาใช้ในการศึกษาการแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ เนื่องจากให้จำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์เพียงพอต่อการศึกษาการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ อย่างไรก็ตาม สมปอง เตชะโต (2530) รายงานว่าเอนไซม์เซลลูเลสโอโนซูกะอาร์เอส ความเข้มข้นสูงส่งผลให้จำนวนโปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตจากใบถั่วฝักยาวลดลง ที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะในองค์ประกอบของเอนไซม์ดังกล่าวยังมีเอนไซม์โปรทิเอสและนิวคลิเอสซึ่งเป็นอันตรายต่อโปรโตพลาสต์ผสมอยู่ด้วย

โปรโตพลาสต์เป็นเซลล์ที่ปราศจากผนังเซลล์ ดังนั้นจึงมีความอ่อนแอต่อระดับออสโมติกที่สูงหรือต่ำเกินไป หากโปรโตพลาสต์อยู่ในสภาพที่มีแรงดันออสโมติกสูงจะทำให้เกิดกระบวนการพลาสโมไลซิสโดยน้ำภายในเซลล์จะเคลื่อนที่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ออกภายนอกทำให้โปรโตพลาสต์เหี่ยว ในทางตรงกันข้าม โปรโตพลาสต์ที่อยู่ในสภาพที่มีระดับแรงดันออสโมติกที่ต่ำเกินไปจะทำให้น้ำภายนอกเซลล์เคลื่อนผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าภายในเซลล์เป็นผลให้เซลล์เต่งและแตกในที่สุด ดังนั้นแรงดันออสโมติกของสารละลายเอนไซม์ที่อยู่ล้อมรอบโปรโตพลาสต์จะต้องอยู่ในสภาพสมดุล โดยทั่วไปการปรับแรงดันออสโมติกของสารละลายเอนไซม์ทำได้โดยการเติมสารละลายออสโมติคัม ออสโมติคัมที่นิยมใช้ได้แก่ สารละลายน้ำตาลแอลกอฮอล์ เช่น แมนนิทอล หรือซอร์บิทอล เนื่องจากไม่มีผลกระทบต่อเมแทบอลิซึมของเซลล์ทำให้โปรโตพลาสต์ที่ได้มีคุณสมบัติคงที่ในระหว่างเพาะเลี้ยง น้ำตาลอย่างอื่น เช่น กลูโคส หรือ ซูโครสนั้นเซลล์ดูดไปใช้และมีผลต่อเมแทบอลิซึม ซึ่งเป็นผลให้โปรโตพลาสต์เกิดความไม่คงที่ในระหว่างการเพาะเลี้ยง (คำนูณ กาญจนภูมิ, 2539) สำหรับการทดลองนี้ใช้แมนนิทอลเป็นออสโมติคัม โดยทั่วไปความเข้มข้นของแมนนิทอลที่ใช้ได้ผลดีอยู่ในช่วง 0.23-0.90 โมลาร์ (Kao and Michayluk, 1975) โดยทั่วไปนิยมใช้แมนนิทอลความเข้มข้น 0.7 โมลาร์ ในการแยกโปรโตพลาสต์จากใบ เช่น ใบมังคุด พะวา และส้มแขก (ลัดดาวัลย์ มูสิกะปาละ, 2544) ใบส้มจุก (โสภา ทวีคณะโชติ, 2542) ใบส้มโชกุน (Te-chato and Sriphakdi, 2000) และใบยางพารา (ชวนพิศ นิยะกิจ, 2544) อย่างไรก็ตามมีการใช้แมนนิทอล เข้มข้น 0.5

โมลาร์ ในการแยกโปรโตพลาสต์จากใบนมตำเลีย (สมัชชา นาคสมบัติ, 2543) ใบมะเขือเทศพันธุ์สีดา (วิไลลักษณ์ ชินะจิตร และสุธาทิพย์ การรักษา, 2537) และใช้แมนนิทอลเข้มข้น 0.4 โมลาร์ ในการแยกโปรโตพลาสต์จากกาบใบข้าว (กฤษณา สุดทะสาร, 2541) ความแตกต่างนี้เป็นเพราะพืชต่างชนิดกันย่อมมีองค์ประกอบและโครงสร้างของใบต่างกัน ทำให้มีความดันออสโมติกในใบต่างกัน ในการทดลองนี้ แมนนิทอล เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ให้จำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์สูงสุด อย่างไรก็ตาม เมื่อทดลองใช้แมนนิทอล 0.4 โมลาร์ พบว่า ให้จำนวนโปรโตพลาสต์ และพัฒนาการที่ดีกว่า 0.5 โมลาร์ (ไม่แสดงข้อมูล) ดังนั้นจึงใช้ แมนนิทอลเข้มข้น 0.4 โมลาร์ สำหรับการแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์ซัสเพนชั่นโดยทั่วไปนิยมใช้ความเข้มข้น 0.3-0.5 โมลาร์ ชวนพิศ นิยะกิจ (2544) ใช้แมนนิทอลเข้มข้น 0.4 โมลาร์ ในการแยกและเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากเซลล์ซัสเพนชั่นยางพารา ในการทดลองนี้ใช้แมนนิทอลเข้มข้น 0.3 โมลาร์ ในการแยกโปรโตพลาสต์จากแคลลัส และเซลล์ซัสเพนชั่น อย่างไรก็ตามไม่ได้ศึกษาออสโมติคัมที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์จากแคลลัสและเซลล์ซัสเพนชั่น Eriksson (1977) อ้างโดย จารุวัฒน์ จันทร์ประดิษฐ์ (2534) รายงานว่าการสร้างผนังเซลล์ของโปรโตพลาสต์ขึ้นอยู่กับแรงดันออสโมติกภายในเซลล์ ถ้าแรงดันออสโมติกภายในเซลล์สูง จะทำให้การสร้างผนังเซลล์ใหม่และการแบ่งเซลล์เกิดขึ้นช้าด้วย

ตำแหน่งหรือขนาดของใบที่นำมาใช้แยกโปรโตพลาสต์มีผลต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ จากการทดลองนี้ พบว่า ใบสะเดาช้างที่มีความกว้าง 2.1-3.0 เซนติเมตร ซึ่งอยู่ในก้านใบรวมชุดที่ 2 นับจากยอด มีลักษณะกึ่งแก่กึ่งอ่อน เหมาะสมในการนำมาใช้แยกโปรโตพลาสต์ที่สุด อย่างไรก็ตาม Mills และ Hammerschlag (1994) รายงานว่า ใบท้อ (*Prunus persica*) ขนาดเล็ก (ยาว 4-10 มิลลิเมตร) สามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้สูงสุดเมื่อเทียบกับใบขนาดกลาง (ยาว 13-17 มิลลิเมตร) และใบขนาดใหญ่กว่า (ยาว 22-30 มิลลิเมตร) ในขณะที่ โสภา ทวีคณะโชติ (2542) พบว่าการแยกใบส้มจุกคู่ที่ 1 และคู่ที่ 2 จากใบในหลอดทดลอง ให้จำนวนและความมีชีวิตไม่แตกต่างกันทางสถิติ มยุรี วุฒิสิทธิ์ (2539) รายงานว่า โปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบกล๊อกซิเนียที่มีความยาวมากกว่า 2.5 เซนติเมตร หรือใบแก่ มีเม็ดคลอโรพลาสต์หนาแน่น ช่องว่างอากาศน้อย เหมาะสมแก่การนำไปเพาะเลี้ยง ส่วนโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากใบอ่อน หรือใบที่มีความยาวน้อยกว่า 2.5 เซนติเมตร อ่อนแอและแตกง่าย

วิธีการเตรียมใบก่อนนำมาแยกโปรโตพลาสต์มีผลต่อจำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ การนำใบไปเก็บในที่มืดก่อนนำมาแยกโปรโตพลาสต์ เพื่อไม่ให้เซลล์พืชสร้างสารเซลลูโลสมาสะสมไว้ที่ใบ ซึ่งมีผลทำให้การย่อยด้วยสารละลายเอนไซม์ทำได้ง่ายและเร็วขึ้น การนำใบวางบนอาหาร เพื่อให้ใบดูดซับอาหารมาใช้ในระหว่างการเก็บรักษาก่อนนำมาแยกโปรโตพลาสต์ และการแช่ใบไว้ในสารละลายล้างโปรโตพลาสต์เพื่อให้เซลล์พืชปรับตัวต่อสารละลายที่มีความดัน

ออสโมติกสูง ลัดดาวัลย์ มูสิกะปาละ (2544) รายงานว่า ใบมังคุดที่เก็บไว้ในที่มืด 24 ชั่วโมง ให้จำนวนและความมีชีวิตสูงสุด รองลงมาคือ ใบสด ส่วนการแช่ใบในสารละลายล้างโปรโตพลาสต์ไม่สามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้เลย อย่างไรก็ตามวิธีการดังกล่าวไม่ส่งผลดีในการศึกษานี้ ซึ่งพบว่า ใบสดให้จำนวนและความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์สูงสุด การวางใบบนอาหารแล้วเก็บในที่มืดเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ให้ความมีชีวิตสูงกว่าการวางใบในจานเพาะเลี้ยงแล้วเก็บในที่มืด 24 ชั่วโมง ส่วนการแช่ใบในสารละลายล้างโปรโตพลาสต์ให้จำนวนโปรโตพลาสต์ต่ำสุด แต่ให้ความมีชีวิตสูงสุดรองจากใบสด ผลที่แตกต่างกัน อาจเป็นเพราะว่าในการทดลองแยกโปรโตพลาสต์จากใบมังคุดในหลอดทดลองไม่ได้ตัดใบก่อนนำมาเก็บในที่มืด แต่ในการทดลองนี้ตัดใบก่อนแล้วนำมาเก็บในที่มืด ทำให้ใบสะเดาช้างดูดซึมอาหารได้ไม่ดีเท่ากับการได้รับอาหารจากต้นแม่ ทำให้จำนวนและความมีชีวิตต่ำกว่าการใช้ใบสด นอกจากนี้ สุชดา คงทน (2544) รายงานว่า วิธีการเตรียมใบโดยเก็บในที่มืดและไม่ได้เก็บในที่มืดก่อนนำมาแยกโปรโตพลาสต์ของใบเบญจมาศให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติ

เซลล์ซัสเพนชั่น และแคลลัสเป็นแหล่งโปรโตพลาสต์ที่เหมาะสมเพื่อนำมาแยกโปรโตพลาสต์ เนื่องจากสามารถเจริญได้รวดเร็ว และสภาวะของการเจริญก็ควบคุมได้ เนื้อเยื่อที่จะเกิดขึ้นจะอยู่กันอย่างหลวม ๆ จึงทำให้สารละลายเอนไซม์แทรกเข้าไปได้ง่าย นอกจากนั้นโปรโตพลาสต์ที่แยกจากเซลล์ซัสเพนชั่น และแคลลัส คาดว่าพร้อมที่จะตอบสนองได้เร็วกว่าโปรโตพลาสต์ที่มาจากใบ เนื่องจากโปรโตพลาสต์ที่มาจากใบนั้นยังไม่คุ้นเคยกับสภาพของการเพาะเลี้ยง สิ่งที่สำคัญอีกอย่างหนึ่งคือ เซลล์อยู่ในสภาพปลอดเชื้อจุลินทรีย์ จึงไม่จำเป็นที่จะต้องฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวอีก แต่ข้อเสียจากการนำแคลลัสและเซลล์ซัสเพนชั่นมาแยกโปรโตพลาสต์ คือ ผนังเซลล์มักทนทานต่อการทำลายของเซลลูเลส ทำให้ปริมาณโปรโตพลาสต์ที่แยกได้น้อย (คำนูณ กาญจนภูมิ, 2542) ทำนองเดียวกับการทดลองนี้ซึ่งพบว่า ชิ้นส่วนใบให้จำนวนโปรโตพลาสต์มากที่สุด รองลงมาคือ แคลลัส และเซลล์ซัสเพนชั่นให้จำนวนน้อยที่สุด ทั้งนี้อาจเป็นเพราะไม่ได้ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมต่อการแยกโปรโตพลาสต์จากแคลลัสและเซลล์ซัสเพนชั่น แต่ใช้ชนิดและความเข้มข้นเดียวกับที่ได้ศึกษาจากการแยกโปรโตพลาสต์จากใบ นอกจากนี้อายุของแคลลัสและเซลล์ซัสเพนชั่นก็มีผลต่อจำนวนโปรโตพลาสต์ที่ได้อีกด้วย พจมาลย์ สุรนิลพงศ์ และสมปอง เตชะโต (2542) รายงานว่าเซลล์ซัสเพนชั่นของยางพาราอายุ 10 วัน ให้จำนวนโปรโตพลาสต์สูงที่สุด ดังนั้นในการศึกษาต่อไปควรจะต้องมีการศึกษาอายุของแคลลัสและเซลล์ซัสเพนชั่นสะเดาช้างที่จะนำมาแยกโปรโตพลาสต์ด้วย ในการศึกษานี้ การที่เซลล์ซัสเพนชั่นให้จำนวนโปรโตพลาสต์น้อยกว่าแคลลัส เนื่องจากเซลล์ซัสเพนชั่นที่ชักนำได้มีลักษณะเป็นกลุ่มเซลล์ขนาดใหญ่ และแข็งกว่าแคลลัส ซึ่งเป็นประเภทฟรายเอเบิลแคลลัสทำให้เอนไซม์เข้าไปย่อยสารเพคตินและเซลลูโลสได้ยาก

3. การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์

ในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ จำนวนโปรโตพลาสต์เริ่มต้นที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงมีผลต่อประสิทธิภาพการเจริญของโปรโตพลาสต์ เนื่องจากโปรโตพลาสต์มีการแพร่สารเมแทบอไลต์ที่สร้างลงในอาหารเพาะเลี้ยง และสารเหล่านี้จะสนับสนุนการเจริญเติบโตของโปรโตพลาสต์ซึ่งกันและกัน (Kao and Michayluk, 1975) โดยทั่วไปความหนาแน่นที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ไม้ผลอยู่ระหว่าง $1x10^5$-$1x10^6$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร (Hidano and Nuzeki, 1988) การเพาะเลี้ยงที่หนาแน่นมากเกินไปทำให้โปรโตพลาสต์แก่งแย่งอาหารซึ่งกันและกัน ในทางตรงข้ามหากน้อยเกินไปโปรโตพลาสต์ก็ไม่สามารถเจริญได้ เนื่องจากโปรโตพลาสต์อยู่ห่างกันจึงไม่สามารถแพร่สารเมแทบอไลต์เพื่อสนับสนุนการเจริญเติบโตของโปรโตพลาสต์อื่น ๆ ได้ สำหรับการศึกษานี้พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบสะเดาช้างด้วยความหนาแน่น $5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ให้การแบ่งเซลล์สูงสุด ซึ่งใกล้เคียงกับการทดลองของจารุวัฒน์ จันทร์ประดิษฐ์ (2534) รายงานว่า จำนวนโปรโตพลาสต์ของเซลล์ซัสเพนชั่นของโกโก้เริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงคือ $4x10^5$ ซึ่งแบ่งเซลล์และเจริญเติบโตได้ดี ในขณะที่ ลัดดาวัลย์ มูสิกะปาละ และสมปอง เตชะโต (2543) รายงานว่าโปรโตพลาสต์ส้มแขกที่เลี้ยงด้วยความหนาแน่น $1.5x10^5$ โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ให้การแบ่งเซลล์สูงสุด

อาหารเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ส่วนใหญ่มักมีออกซินเพียงชนิดเดียว เช่น จารุวัฒน์ จันทร์ประดิษฐ์ (2534) รายงานว่า โปรโตพลาสต์จากเซลล์ซัสเพนชั่นโกโก้ต้องการ 2,4-D เพียงชนิดเดียวในการเจริญเติบโต หรือหลายชนิดรวมกับไซโตไคนินชนิดเดียวหรือสองชนิดเพื่อกระตุ้นการแบ่งตัวและการเจริญของโปรโตพลาสต์ มีโปรโตพลาสต์ของพืชน้อยชนิดที่เจริญได้โดยไม่ต้องเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต โดยทั่วไปแล้วในการเพาะเลี้ยงมักเริ่มด้วยออกซินในปริมาณที่สูง เช่น NAA หรือ 2,4-D เข้มข้น 1-3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับไซโตไคนินความเข้มข้นต่ำ เช่น BAP 0.1-1 มิลลิกรัมต่อลิตร (คำนูณ กาญจนภูมิ, 2539 ; สมัชชา นาคสมบัติ, 2543 ; Te-chato, 1988 ; Te-chato and Sriphakdi, 2000) การเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์นั้นมีความจำเพาะในแต่ละพืช นอกจากนี้ การดูแลรักษานั้นมีความจำเป็นมากทั้งนี้เพราะโปรโตพลาสต์มีความบอบบาง แตกง่าย และต้องย้ายไปยังอาหารใหม่เพื่อปรับระดับออสโมติคัมจนกว่าโปรโตพลาสต์จะสร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่ เมื่อพบว่าโปรโตพลาสต์เริ่มมีการแบ่งเซลล์ควรเปลี่ยนแปลงสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใช้เลี้ยง เช่น เปลี่ยนแปลงสมดุลของออกซินและไซโตไคนิน เพื่อกระตุ้นมอร์โฟเจนเนซีส (คำนูณ กาญจนภูมิ, 2539) สำหรับการศึกษานี้ใช้สารควบคุมออกซินและไซโตไคนินชนิด และความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อส่งเสริมการแบ่งเซลล์และพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ พบว่า 2,4-D เข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 วัน แล้วลดความเข้มข้นของแมนนิทอล เป็น 0.3 โมลาร์ ให้การ

แบ่งเซลล์สูงสุด อย่างไรก็ตามพบว่าในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากใบสะเดาช้างประสบปัญหาการเหี่ยว และหยุดพัฒนาการในระยะต่อมาหลังจากเพาะเลี้ยง 2 สัปดาห์ ไม่ว่าจะลดออสโมติคัมลงสัปดาห์ละ 0.1 โมลาร์ ก็ตามโปรโตพลาสต์ที่เพาะเลี้ยงคงมีเพียงการแบ่งเซลล์ระยะที่ 1 และระยะที่ 2 เท่านั้น

เมื่อเปรียบเทียบการแบ่งเซลล์หรือพัฒนาการของโปรโตพลาสต์ระหว่างแหล่งชิ้นส่วนต่าง ๆ พบว่า แคลลัสและเซลล์ซัสเพนชั่นมีความเหมาะสมในการนำมาเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์มากกว่าใบ เนื่องจากให้การแบ่งเซลล์สูงกว่าใบ ในทำนองเดียวกันนี้ ชวนพิศ นิยะกิจ (2544) รายงานว่า โปรโตพลาสต์ที่แยกจากเซลล์ซัสเพนชั่นยางพาราให้จำนวนน้อยกว่าโปรโตพลาสต์ที่แยกจากใบ แต่ให้การแบ่งเซลล์สูง อย่างไรก็ตามในขณะนี้โปรโตพลาสต์จากแคลลัสเหมาะสมในการนำมาเพาะเลี้ยงมากที่สุด เนื่องจาก สามารถให้พัฒนาการในการแบ่งเซลล์ได้ดีที่สุดประมาณ 6 เซลล์ (2 เปอร์เซ็นต์) ในขณะที่เซลล์ซัสเพนชั่นและใบแบ่งเซลล์ได้ 2 เซลล์ และจากการศึกษานี้สามารถชักนำพืชต้นใหม่จากแคลลัสได้ ดังนั้นโปรโตพลาสต์ที่แยกจากแคลลัสจึงน่าจะมีความสามารถชักนำพืชต้นใหม่เช่นเดียวกัน ถ้าหากมีการศึกษาสูตรอาหาร สารควบคุมการเจริญเติบโต รวมทั้งสภาพแวดล้อมอื่น ๆ ที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์จากแคลลัสต่อไป