บทที่ 3

วิธีการวิจัย

การศึกษาการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูและการรวมโปรโตพลาสต์ในครั้งนี้ แบ่งออกเป็น 2 การทดลอง คือ

1. การเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูของคะน้าจีนพันธุ์ Veggin 1314 และบร็อคโคลี่พันธุ์ Green King
2. การแยกและรวมโปรโตพลาสต์ของคะน้าจีนพันธุ์ Veggin 1314 และบร็อคโคลี่พันธุ์ Green King ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณู โดยการใช้กระแสไฟฟ้า

1) การเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูของคะน้าจีนพันธุ์ Veggin 1314 และบร็อคโคลี่พันธุ์ Green King

การเตรียมพืช

เพาะเมล็ดคะน้าจีนพันธุ์ Veggin 1314 และบร็อคโคลี่พันธุ์ Green King ในวัสดุเพาะกล้า หลังจากต้นกล้าคะน้ามีอายุ 18 วัน และบร็อคโคลี่อายุ 25 วัน จึงย้ายปลูกในแปลงภายนอกโรงเรือนที่สถานีวิจัยอินทนนท์ ต.บ้านขุนกลาง อ.จอมทอง จ.เชียงใหม่ โดยให้น้ำ ใส่ปุ๋ย พ่นสารเคมีป้องกันจำกัดศัตรูพืชอย่างสม่ำเสมอ หลังจากย้ายปลูกคะน้าจีนประมาณ 45 วัน และบร็อคโคลี่ประมาณ 70 วัน เริ่มเข้าระยะแทงช่อดอก ตัดดอกในขณะที่ช่อดอกแรกยังไม่มีดอกบานใส่ในถุงพลาสติก และเก็บที่อุณหภูมิต่ำระหว่างการนำมาห้องปฏิบัติการ

การฟอกฆ่าเชื้อ

นำดอกคะน้าจีนและบร็อคโคลี่มาล้างด้วยน้ำผสมน้ำยาลดแรงตึงผิว เขย่าเป็นระยะ ๆ ประมาณ 15 นาที ล้างน้ำยาออกในน้ำไหลอีก 3 ครั้ง ๆ ละ 1 นาที ฆ่าเชื้อบริเวณผิวดอกโดยจุ่มในเอธิลแอลกอฮอล์ 70% เป็นเวลา 1 นาที ก่อนนำมาฟอกฆ่าเชื้อด้วย Clorox 10% ผสม Tween 20 1-2 หยด นำไปใส่ใน suction pump เป็นเวลา 15 นาที เขย่าเป็นระยะ ๆ ล้าง Clorox ออกด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ๆ ละประมาณ 5 นาที

การแยกอับละอองเรณู

วางดอกคะน้าและบร็อคโคลี่ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วบนจานแก้วภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสามมิติ แกะอับละอองเรณูโดยใช้ปากคีบปลายแหลม (tweezers) จับบริเวณปลายดอกหรือก้านดอก ใช้ปลายมีดตัดปลายฐานดอก แกะกลีบเลี้ยงออกทีละกลีบจนกระทั่งหมดให้เหลือเฉพาะอับละอองเรณู

ใช้ปลายมีดสะกิดบริเวณรอยต่อของอับละอองเรณูและก้านชูอับละอองเรณู (filament) ให้หลุดออกจากกัน โดยไม่ให้มีส่วนก้านอับละอองเรณูติดมา หรืออับละอองเรณูช้ำ เลี้ยงอับละอองเรณูในอาหารเหลวสูตร B_5 ปริมาตร 0.5 มล. ใน plate พลาสติกขนาด 15x60 มม. และมีจำนวนอับละอองเรณู 24 อับต่อ plate นำอับละอองเรณูไปเลี้ยงในที่มืดที่อุณหภูมิ 35 ^{0}ซ เป็นระยะเวลา 2 วัน ก่อนย้ายมาเลี้ยงในตู้ที่ปรับให้มีอุณหภูมิ 25^{0}ซ และให้ได้รับแสงฟลูออเรสเซนต์ที่ความเข้ม 3,000 mol $m^{-2}s^{-1}$ เป็นระยะเวลา 16 ชั่วโมงสลับกับไม่ได้รับแสง 8 ชั่วโมงต่อวัน

การทดลองที่ 1 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการพัฒนาของอับละอองเรณูของคะน้าจีนพันธุ์ Veggin 1314 และบร็อคโคลี่พันธุ์ Green King

1.1 ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างขนาดดอก และระยะการพัฒนาของละอองเรณูคะน้าจีนพันธุ์ Veggin1314 และบร็อคโคลี่พันธุ์ Green king

แบ่งขนาดดอกคะน้าจีนและบร็อคโคลี่เป็นขนาดต่างๆ โดยวัดจากฐานดอกถึงปลายดอก จำนวน 5 ขนาด ดังนี้ 1.1-1.5 1.6-2.5 2.6-3.5, 3.6-4.5 และ มากกว่า 4.5 มม. (ภาพที่ 1 และ 2) นำดอกแต่ละขนาดวางบนสไลด์ แกะเอาเฉพาะอับละอองเรณู จากนั้นใช้ด้ามเข็มเขี่ยบดเพื่อให้ละอองเรณูหลุดจากอับ เขี่ยละอองเรณูให้กระจายบนสไลด์ก่อนปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ นำสไลด์ไปตรวจสอบหาระยะการพัฒนาของละอองเรณูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยใช้ดอกแต่ละขนาดจำนวน 20 ดอก คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ บันทึกภาพและระยะการพัฒนาของละอองเรณูจากดอกแต่ละขนาดตามระยะต่าง ๆ ดังนี้ pollen mother cell, pollen tetrad, uninucleate และ starch grain

1.2 พัฒนาสูตรอาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสมต่อการพัฒนาของอับละอองเรณู

การทดลองทั้งหมดได้ใช้อาหารสูตร B_5 (1968) ที่ดัดแปลงโดย Keller (1984) เป็นสูตรอาหารหลักและดัดแปลงความเข้มข้นของฮอร์โมนในแต่ละสูตรดังนี้คือ

1.2.1 ศึกษาระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน 2,4-D และ NAA ที่เหมาะสมต่อการพัฒนาของอับละอองเรณูของคะน้าจีนและบร็อคโคลี่

เลี้ยงอับละอองเรณูของคะน้าจีนพันธุ์ Veggin 1314 และบร็อคโคลี่พันธุ์ Green King ที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้วบนอาหารสูตร B_5 ที่ดัดแปลงโดย Keller (1984) แต่เปรียบเทียบความเข้มข้นของ 2,4-D และ NAA ในระดับต่าง ๆ กัน ตามตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ความเข้มข้นของ 2,4-D และ NAA ในระดับต่าง ๆ ที่เติมในอาหารสูตร B_5 (Gamborg, 1968)

NAA (มก./ล.) / 2,4-D (มก./ล.)	0.1	0.5	1.0
0.1	สูตร 1	สูตร 2	สูตร 3
0.5	สูตร 4	สูตร 5	สูตร 6
1.0	สูตร 7	สูตร 8	สูตร 9

วางแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียล โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (factorial in completely randomize design) โดยให้แต่ละความเข้มข้นของ 2,4-D ร่วมกับ NAA เป็นวิธีการจำนวน 9 วิธีการ และเปรียบเทียบกับอาหารที่ไม่เติมฮอร์โมนชนิดใด ๆ (วิธีการที่ 10) แต่ละวิธีการทำการทดลอง 4 ซ้ำ แต่ละซ้ำเลี้ยงอับละอองเรณูจำนวน 24 อับ หลังจากเลี้ยง 30 วันบันทึกจำนวนอับละอองเรณูที่พัฒนาเป็นแคลลัสบนอาหารแต่ละสูตร

1.2.2 ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการพัฒนาของอับละอองเรณู

แยกอับละอองเรณูของคะน้าจีนพันธุ์ Veggin 1314 และบร็อคโคลี่พันธุ์ Green King ที่มีขนาดดอกอยู่ระหว่าง 2.6-3.5 มม. ก่อนนำอับละอองเรณูของคะน้าจีนมาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร B_5 ที่ดัดแปลงโดย Keller (1984) และเติม 2,4-D 0.1 มก./ล. และ NAA 0.5 มก./ล. ส่วนอับละอองเรณูของบร็อคโคลี่นั้น นำมาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรเดียวกันที่เติม 2,4-D 0.5 มก./ล. และ NAA 0.1 มก./ล. และดัดแปลงเติมน้ำตาลจำนวน 5 ระดับ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1	เติมน้ำตาลร้อยละ 2
กรรมวิธีที่ 2	เติมน้ำตาลร้อยละ 4
กรรมวิธีที่ 3	เติมน้ำตาลร้อยละ 6
กรรมวิธีที่ 4	เติมน้ำตาลร้อยละ 8
กรรมวิธีที่ 5	เติมน้ำตาลร้อยละ 10

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) โดยให้ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลเป็นวิธีการ แต่ละวิธีการประกอบด้วย 4 ซ้ำ แต่ละซ้ำเลี้ยงอับละอองเรณูจำนวน 24 อับ หลังจากเพาะเลี้ยง 30 วัน บันทึกจำนวนอับละอองเรณูที่พัฒนาเป็นแคลลัส

1.3 เปรียบเทียบวิธีการ pretreatment ที่เหมาะสมต่อการพัฒนาของอับละอองเรณู

นำช่อดอกคะน้าจีนบรรจุใส่ถุงพลาสติก แล้วนำไปบ่มในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 ^{0}ซ เป็นเวลาต่างๆ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1	0 ชม. (ไม่ผ่านอุณหภูมิ 4 ^{0}ซ)
กรรมวิธีที่ 2	24 ชม.
กรรมวิธีที่ 3	48 ชม.
กรรมวิธีที่ 4	72 ชม.

ส่วนช่อดอกบร็อคโคลี่ นำมาบรรจุใส่ flask แล้วนำไปแช่ในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิดังนี้

กรรมวิธีที่ 1	ไม่ผ่านการแช่ในน้ำอุ่น
กรรมวิธีที่ 2	แช่ในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 45 ซ^{0}เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง ตามด้วย 40 ซ^{0} เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง

หลังจากนั้นนำดอกคะน้าจีนและบร็อคโคลี่ที่ผ่านการกระตุ้นตามกรรมวิธีต่าง ๆ มาฟอกฆ่าเชื้อ ก่อนแยกอับละอองเรณูไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร B_5 ที่ดัดแปลงโดย Keller (1984) โดยอาหารที่เลี้ยงอับละอองเรณูของคะน้าจีนดัดแปลงเติมน้ำตาล 4 %, 2,4-D 0.1 มล./ล. และ NAA 0.5 มก./ล. ส่วนอาหารเลี้ยงอับละอองเรณูของบร็อคโคลี่ดัดแปลงเติมน้ำตาล 4%, 2,4-D 0.5 มก./ล. และ NAA 0.1 มก./ล. วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) โดยการกระตุ้นแต่ละกรรมวิธีเป็นวิธี

การ แต่ละวิธีการประกอบด้วย 4 ซ้ำ แต่ละซ้ำมีอับละอองเรณูจำนวน 24 อับ หลังจากเพาะเลี้ยง 30 วัน บันทึกจำนวนอับละอองเรณูที่พัฒนาเป็นแคลลัส

1.4 พัฒนาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณู

เลี้ยงอับละอองเรณูของคะน้าจีนพันธุ์ Veggin 1314 บนอาหารสูตร B_5 ที่ดัดแปลงโดย Keller (1984) แต่เติมน้ำตาล 4%, 2,4-D 0.1 มก./ล. และ NAA 0.5 มก./ล ในขณะที่เลี้ยงอับละอองเรณูของบร็อคโคลี่พันธุ์ Green King. บนอาหารสูตร B_5 ที่ดัดแปลงโดย Keller (1984) เช่นกัน แต่ดัดแปลงเติมน้ำตาล 4%, 2,4-D 0.5 มก./ล. และ NAA 0.1 มก./ล หลังจากเพาะเลี้ยงได้ 45 วัน ย้ายอับละอองเรณูที่พัฒนาเป็นแคลลัสมาชักนำให้เจริญเป็นต้นบนอาหารแข็งสูตรต่าง ๆ โดยใช้อาหารสูตร B_5 ที่ดัดแปลงโดย Keller (1984) และ MS (Murashige and Skoog, 1962) เป็นสูตรอาหารหลัก แต่ดัดแปลงระดับความเข้มข้นของ BAP ดังนี้

อาหารสูตร 1 B_5 ที่ดัดแปลงเติมน้ำตาล 3 % NAA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ BAP 0.5 มก./ล. และ GA_3 0.1 มก./ล.

อาหารสูตร 2 B_5 ที่ดัดแปลงเติมน้ำตาล 3 % NAA 0.5 มก./ล. ร่วมกับ BAP 1.0 มก./ล. และ GA_3 0.1 มก./ล.

อาหารสูตร 3 MS ที่ดัดแปลงเติมน้ำตาล 3 % BAP 0.04 มก./ล. ร่วมกับ IAA 0.5 มก./ล. และ GA_3 0.1 มก./ล.

อาหารสูตร 4 MS ที่ดัดแปลงเติมน้ำตาล 3 % BAP 0.1 มก./ล. ร่วมกับ IAA 0.5 มก./ล. และ GA_3 0.1 มก./ล.

อาหารสูตร 5 MS ที่ดัดแปลงเติมน้ำตาล 3 % BAP 0.25 มก./ล. ร่วมกับ IAA 0.5 มก./ล. และ GA_3 0.1 มก./ล.

อาหารสูตร 6 MS ที่ดัดแปลงเติมน้ำตาล 3 % BAP 0.5 มก./ล. ร่วมกับ IAA 0.5 มก./ล. และ GA_3 0.1 มก./ล.

อาหารสูตร 7 MS ที่ดัดแปลงเติมน้ำตาล 3 % BAP 0.75 มก./ล. ร่วมกับ IAA 0.5 มก./ล. และ GA_3 0.1 มก./ล.

นำแคลลัสไปเลี้ยงภายในตู้ควบคุมที่มีอุณหภูมิ 25^0ซ และให้ได้รับแสงฟลูออเรสเซนต์ ความเข้มแสง 3,000 mol $m^{-2}s^{-1}$ จำนวน 16 ชั่วโมงต่อวัน บันทึกการเจริญและการพัฒนาของแคลลัส

การทดลองที่ 2 การตรวจสอบระดับชุดของโครโมโซม (ploidy level) ของต้นคะน้าจีนและบร็อคโคลี่ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูการตรวจนับจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์ในเซลล์ปากใบ

นำใบของต้นคะน้าจีนและบร็อคโคลี่ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเรณู มาลอกเอาเฉพาะส่วนของชั้น lower epidermis ก่อนนำมาวางบนหยดน้ำบนสไลด์ ทิ้งไว้สักครู่ก่อนปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ จากนั้นนำไปนับจำนวนเม็ดคลอโรพลาสต์บริเวณเซลล์ปากใบ (guard cell) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound เปรียบเทียบกับต้นคะน้าจีนและบร็อคโคลี่ต้นปกติที่ได้จากการเพาะเมล็ดและเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) โดยแต่ละกรรมวิธีประกอบไปด้วย 4 ซ้ำ แต่ละครั้งตรวจนับเม็ดคลอโรพลาสต์จำนวน 30 ปากใบ

2) การแยกและรวมโปรโตพลาสต์คะน้าจีนพันธุ์ Veggin 1314 และบร็อคโคลี่พันธุ์ Green king

การเตรียมเอ็นไซม์ เตรียมสารละลายเอ็นไซม์โดยชั่ง Macerozyme R 10 0.3 กรัม และเอ็นไซม์ cellulase RS 0.5 กรัม นำมาละลายใน washing solution ที่ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 100 มล. และปรับค่า pH ให้ได้ 5.8 ก่อนนำมากรองผ่านเมนเบรนที่มีขนาดของรู 0.22 ไมครอน แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –30 ^{0}C

การเตรียมสารละลาย washing solution ใช้สารละลาย washing solution ที่ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ซึ่งเตรียมโดยการชั่ง mannitol 91 กรัม, $CaCl_2.2H_2O$ 1.5 กรัม เติมน้ำกลั่น 2 ครั้งให้ได้ปริมาตรเป็น 1,000 มล. ปรับค่า pH ให้ได้ 5.8 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 ^{0}ซ เป็นเวลา 20 นาที

การแช่ใบพืชในส่วนผสมของเอ็นไซม์ นำใบคะน้าจีนและบร็อคโคลี่มาลอกเซลล์ชั้นนอกด้านใต้ท้องใบออก ตัดเป็นชิ้นขนาดเล็ก ๆ แล้วนำมาแช่ในสารละลายเอ็นไซม์ปริมาตร 10 มล. ในจานเลี้ยงเชื้อขนาด 9 ซม. นำไปวางบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 45 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25±2 ^{0}ซ เป็นเวลา 4-5 ชั่วโมง

การแยกโปรโตพลาสต์ หลังจากแช่ใบคะน้าและบร็อคโคลี่ในสารละลายเอ็นไซม์และย่อยให้ได้โปรโตพลาสต์ตามระยะเวลาแล้ว กรองสารละลายโปรโตพลาสต์และเศษใบพืชผ่านไนลอนเมชขนาดช่อง 77 ไมครอน ใส่หลอดปั่นขนาด 15 มล. นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 500 รอบต่อ

นาที เป็นเวลา 3 นาที ดูดเอาสารละลายในส่วนบนหลอดทิ้ง แล้วล้างตะกอนโปรโตพลาสต์ด้วย washing solution โดยนำไปปั่นตกตะกอนอีกครั้งที่ความเร็ว 500 รอบต่อนาที นาน 3 นาที ดูดเอาน้ำใส่ด้านบนทิ้งให้เหลือเฉพาะตะกอนโปรโตพลาสต์บริเวณก้นหลอด นำตะกอนโปรโตพลาสต์ไปลอยบนสารละลายน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 25 % เพื่อทำให้บริสุทธิ์ โดยปั่นที่ความเร็ว 700 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ใช้พาสเจอร์ปิเปตดูดเอาโปรโตพลาสต์สมบูรณ์ที่ลอยอยู่ตรงกลางระหว่างสารละลาย mannitol และสารละลายน้ำตาลซูโครส นำมาปั่นล้างน้ำตาลซูโครสออกด้วย washing solution 2 ครั้ง ตรวจนับจำนวนโปรโตพลาสต์โดยหยดโปรโตพลาสต์ลงบนฮีมาไซโตมิเตอร์ แล้วนับจำนวนโปรโตพลาสต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ บันทึกจำนวน และลักษณะโปรโตพลาสต์

การย้อมสีโปรโตพลาสต์ หลังจากปั่นล้างน้ำตาลซูโครสออกจากโปรโตพลาสต์ของบร็อคโคลี่แล้ว นำโปรโตพลาสต์มาย้อมด้วยสี neutral red เข้มข้น 0.1% ใน washing solution ปริมาตร 2 มล. หยด cellulase ลงไป 1-2 หยด เขย่าให้เข้ากัน ปล่อยทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที จากนั้นล้างสีย้อมออกโดยใช้ washing solution นำไปปั่นให้ตกตะกอน 2 ครั้ง ๆ 3 นาที ตรวจดูลักษณะของโปรโตพลาสต์ที่ย้อมสีภายใต้กล้องจุลทรรศน์ก่อนนำไปรวมกับโปรโตพลาสต์ของคะน้า

การรวมโปรโตพลาสต์โดยการใช้กระแสไฟฟ้า นำโปรโตพลาสต์ที่แยกจากบร็อคโคลี่และย้อมด้วยสี neutral red กับโปรโตพลาสต์ของคะน้าในความเข้มข้นที่เหมาะสมมาผสมรวมกัน นำไปผ่านการกระตุ้นให้รวมกันโดยกระแสไฟฟ้าด้วยเครื่อง Shimadzu Somatic Hybridizer รุ่น SSH-10 หลังจากนั้นนำโปรโตพลาสต์มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร PS (1981) ที่ความเข้มข้นสารละลาย mannitol 0.5 โมลาร์ แต่เปรียบเทียบความเข้มข้นของฮอร์โมนจำนวน 4 สูตร (รายละเอียดดังตารางที่ 2) ปริมาตร 1 มล. ในจานพลาสติกปลอดเชื้อขนาด 15X60 มม. เลี้ยงในที่มืดที่อุณหภูมิ 25^{0}ซ เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นนำย้ายมาเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ควบคุมสภาพความชื้นสัมพัทธ์ของบรรยากาศประมาณ 85% และความเข้มแสงประมาณ 800-1,200 mol $m^{-2}s^{-1}$ หลังจากนั้น 1 สัปดาห์จึงเปลี่ยนถ่ายอาหารโดยดูดเอาอาหารเก่าออก แล้วเติมอาหารสูตร MS (1962) ที่เติมซูโครส 3.0% 2,4-D เข้มข้น 0.1 มก./ล. และ BAP เข้มข้น 1.0 มก./ล. และ mannitol 0.4 โมลาร์

การตรวจสอบความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ ตรวจสอบโดยใช้สารละลายฟลูออเรสซินไดอะซีเตท (FDA) เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เติมลงในสารละลายโปรโตพลาสต์ในอัตราส่วนที่เท่ากัน

ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที นำไปหยดบนสไลด์หลุม แล้วนำไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนส์ โปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตจะมีกิจกรรมของเอนไซม์เอสเทอเรส ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับ FDA ทำให้เกิดการเรืองแสงสีเขียวเหลืองภายใต้คลื่นอัลตร้าไวโอเลต นับจำนวนโปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตเปรียบเทียบกับจำนวนโปรโตพลาสต์ทั้งหมด โดย

$$\% \text{ ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์} = \frac{\text{จำนวนโปรโตพลาสต์ที่เรืองแสง} \times 100}{\text{จำนวนโปรโตพลาสต์ทั้งหมด}}$$

ตารางที่ 2 ชนิด และความเข้มข้นของฮอร์โมนที่ดัดแปลงเติมในอาหาร PS (1981) ที่ใช้เลี้ยงโปรโตพลาสต์ลูกผสมระหว่างคะน้าจีนพันธุ์ Veggin 1314 และบร็อคโคลี่พันธุ์ Green king

สูตรอาหาร	ชนิดและความเข้มข้นของฮอร์โมน (มก./ล.)		
	2,4-D	NAA	Zeatin
1	0	2.25	0.75
2	1.0	0.1	0.5
3	0.1	1.0	0.75
4	0.1	0.1	0.75

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) โดยให้อาหารแต่ละสูตรเป็นวิธีการ บันทึกผลการตอบสนองต่ออาหารของโปรโตพลาสต์การแบ่งเซลล์ และการเจริญเป็นกลุ่มเซลล์ ตลอดจนความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์