หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

สรุปและอภิปรายผล

สรุปผล

1. ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแคลลัสยาสูบที่ชักนำในอาหารที่เติมออกซินต่างชนิดกัน

เมื่อนำส่วนลำต้นและใบของยาสูบ 2 ชนิดที่ต้องการศึกษา คือ Nicotiana tabacum และ Nicotiana rustica มาเลี้ยงในอาหารชักนำแคลลัสสูตร MS. (1962) ที่เติม IAA และไคเนติน พบว่าใน N. tabacum ให้แคลลัสที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยดูจากลักษณะการเกาะกลุ่ม สีของแคลลัสและความชุ่มน้ำ มีความแตกต่างกัน แบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม (รูปที่ 4) ในขณะที่ N. rustica ให้แคลลัสที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาต่างกัน 3กลุ่ม (รูปที่ 8) เมื่อเลี้ยงแคลลัสของยาสูบทั้ง 2 ชนิดในอาหารสูตร MS. (1962) ที่เติม 2,4-D แทนIAA พบว่ายาสูบทั้ง 2 ชนิดให้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างกันเป็น 2 กลุ่ม (รูปที่ 5 และ 9) ซึ่งในแคลลัสแต่ละกลุ่มมีอัตราการเจริญและเปอร์เซนต์การเปลี่ยนแปลงเป็นต้นใหม่ต่างกัน

2. ผลการศึกษาการแปรในรูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ของแคลลัส regenerated plant และ subcultured ของแคลลัสที่ได้จาก explant ของยาสูบที่ต่างกันเมื่อแคลลัสมีอายุต่าง ๆ กัน

ยาสูบทั้ง 2 ชนิดให้ผลการศึกษาไปในทำนองเดียวกัน กล่าวคือแคลลัสในกลุ่มเดียวกันที่ได้จากส่วนลำต้นและส่วนใบให้รูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ที่คล้ายคลึงกัน แคลลัสแต่ละกลุ่มมีการแปรในรูปแบบทั้งจำนวนและความเข้มของเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ ต่างกันไป แต่เมื่อพิจารณาร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแคลลัส ทำให้สามารถแบ่งแคลลัสออกเป็นพวกใหญ่ ๆ ได้ 2 พวก พวกแรกคือแคลลัสที่มีลักษณะภายนอกสีค่อนข้างเขียว มีการเกาะกลุ่มของเซลล์แน่น ไม่ชุ่มน้ำ แคลลัสพวกนี้จะมีความเข้มและจำนวนแถบของ

เปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์กลุ่มเคลื่อนที่เร็วสูง เช่น แคลลัสในกลุ่มที่ 1 ของ N. tabacum แคลลัสกลุ่มที่ 1 และ 3 ของ N. rustica ที่เลี้ยงในอาหารชักนำแคลลัสสูตร MS.(1962) ที่เติม IAA และ ไคเนตินรวมทั้งแคลลัสกลุ่มที่ 2 ของ N. tabacum และ N. rustica ที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS.(1962) ที่เติม 2,4-D แทน IAA แคลลัสพวกที่ 2 มีลักษณะภายนอกสีขาวเหลือง บางครั้งมีสีน้ำตาลปน แคลลัสเปราะ ร่วน ฟู ชุ่มน้ำ มีการเกาะกลุ่มของเซลล์หลวม แคลลัสพวกนี้มีความเข้มของเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์กลุ่มเคลื่อนที่เร็วต่ำและมีจำนวนแถบน้อยกว่าแคลลัสพวกแรกแคลลัสกลุ่มนี้ ได้แก่ แคลลัสกลุ่มที่ 2 ของ N. tabacum และ N. rustica ที่เลี้ยงในอาหารชักนำแคลลัสสูตร MS. (1962) ที่เติม IAA และไคเนติน และแคลลัสกลุ่มที่ของ 1 ของ N. tabacum และ N. rustica ที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS. (1962)ที่เติม 2,4-D แทน IAA

เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ของแคลลัส regenerated plant และ subcultured ของแคลลัสที่อายุต่าง ๆ กัน จะไม่พบการแปรในระยะทางการเคลื่อนที่ของแถบสี แต่ในแคลลัสพบว่า N. rustica มีการแปรในด้านความเข้มและจำนวนแถบของไอโซไซม์กลุ่มเคลื่อนที่เร็วมากกว่า N. tabacum แต่เมื่อแคลลัสเกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นต้นใหม่บางแถบที่เคยหายไปจะปรากฏขึ้นมา และบางแถบที่เคยมีความเข้มต่ำขณะที่เป็นแคลลัสก็จะปรากฏเข้มขึ้นเมื่อเกิดเป็น regenerated plant นอกจากนั้นยังพบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ถูกปลดปล่อยลงในอาหารที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่ออีกด้วย

เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ของ explant ที่ใช้กับแคลลัสและ regenerated plant พบว่า การเปลี่ยนแปลงจาก explant ไปเป็นแคลลัสนั้นรูปแบบไอโซไซม์ในแคลลัสมีแถบสีในกลุ่มเคลื่อนที่ช้าเพิ่มขึ้นในความเข้มสูง แต่ไม่พบแถบสีกลุ่มนี้ใน explant และเมื่อแคลลัสเกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นต้นใหม่แถบสีในกลุ่มเคลื่อนที่ช้าจะมีความเข้มต่ำลงจนตรวจไม่พบในบางช้ำ ซึ่งกลับมาคล้ายคลึงกับรูปแบบไอโซไซม์ของ explant

3. ผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์กับการเปลี่ยนแปลงเป็นต้นใหม่ของแคลลัส

จากผลสรุปในข้อ 2. สามารถจัดแบ่งแคลลัสเป็น 2 พวกใหญ่ ๆ ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา รวมทั้งตามจำนวนและความเข้มของเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ในกลุ่มเคลื่อนที่เร็วดังกล่าวแล้ว ยังพบว่าแคลลัสพวกที่มีเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์กลุ่มเคลื่อนที่เร็วมีความเข้มและจำนวนแถบสูง ให้เปอร์เซนต์การเกิดเป็นต้นใหม่สูงกว่าแคลลัสพวกที่มีเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์กลุ่มเคลื่อนที่เร็วมีจำนวนและความเข้มต่ำ จากการเปรียบเทียบรูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ของแคลลัส และ regenerated plant ที่ได้จากแคลลัสนั้นพบว่าแคลลัสเมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นต้นใหม่ มีความเข้มและจำนวนแถบของเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์สูงขึ้นกว่าเมื่อยังเป็นแคลลัสอย่างเห็นได้ชัด อีกทั้งเมื่อเลี้ยงแคลลัสในอาหารชักนำแคลลัสสูตร MS. (1962) ที่เติม IAA และไคเนตินซึ่ง IAA สามารถกระตุ้นให้ความเข้มและจำนวนแถบสีของเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์สูงขึ้นกว่าแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารที่เติม 2,4-D แทน และยังพบว่าแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารที่เติม IAA จะให้เปอร์เซนต์การเปลี่ยนแปลงไปเป็นต้นสูงกว่าแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารที่เติม 2,4-D แทน IAA อีกด้วย จากผลต่าง ๆ เหล่านี้ได้แสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์กับเปอร์เซนต์การเปลี่ยนแปลงไปเป็นต้นใหม่ของแคลลัส โดยพบความสัมพันธ์ไปในทางบวก กล่าวคือ ถ้าแคลลัสมีความเข้มและจำนวนแถบสีของเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์กลุ่มเคลื่อนที่เร็วสูง แคลลัสนั้นจะมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นต้นใหม่ได้สูงมากกว่าแคลลัสที่มีความเข้มและจำนวนแถบของเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์กลุ่มเคลื่อนที่เร็วต่ำ ดังนั้นอาจใช้รูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ในกลุ่มเคลื่อนที่เร็วร่วมกับลักษณะภายนอกของแคลลัส ในการทำนายความสามารถของแคลลัสในการเปลี่ยนแปลงเป็นต้นใหม่

4. ผลการศึกษารูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ของยาสูบที่ปลูกในสภาพแวดล้อมภายนอก และที่เพาะในอาหารสังเคราะห์ที่ควบคุมสภาพแวดล้อม

ยาสูบที่ปลูกในสภาพแวดล้อมภายนอก ให้รูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ที่ไม่คงที่ เมื่อยาสูบอายุน้อย (30, 50 วัน) โดยความเข้มรวมทั้งจำนวนแถบของเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์จะเพิ่มขึ้น เมื่อยาสูบอายุมากขึ้น (70 และ 90 วัน) และแถบสีจะเริ่มคงที่ขึ้นเมื่อยาสูบอายุ 70 วันขึ้นไป ส่วนยาสูบที่เพาะในอาหารสังเคราะห์ไม่เติมฮอร์โมน

และมีการควบคุมสภาพแวดล้อม จะมีรูปแบบไอโซไซม์ค่อนข้างคงที่ ตั้งแต่ยาสูบอายุน้อย และพบจำนวนแถบน้อยกว่ายาสูบที่ปลูกในสภาพแวดล้อมภายนอกคือ ไม่พบแถบสีในกลุ่มเคลื่อนที่ช้า หรือพบในความเข้มต่ำมาก และรูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์จากส่วนลำต้นและใบจะให้รูปแบบเฉพาะตัวสามารถสังเกตความแตกต่างได้

เมื่อศึกษารูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์จากส่วนลำต้นและใบภายในต้นเดียวกันของยาสูบทั้ง 2 ชนิด พบว่าจำนวนแถบและความเข้มของไอโซไซม์เพิ่มขึ้นแบบ basipetal คือมีการพัฒนารูปแบบไอโซไซม์จากส่วนยอดลงไปยังส่วนโคนต้น แสดงว่าไอโซไซม์มีหน้าที่เพิ่มมากขึ้นในเนื้อเยื่อที่มีอายุมากขึ้นและไอโซไซม์มีความแตกต่างกันไปตามหน้าที่ทางสรีระวิทยาและสภาวะการพัฒนาของพืชนั้น ๆ

อภิปรายผล

ในการศึกษาการเลี้ยงเนื้อเยื่อของยาสูบในงานวิจัยนี้ ใช้ยาสูบ 2 ชนิด คือ N. tabacum และ N. rustica เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแคลลัส ตลอดจนน้ำหนักของแคลลัสนั้นและเปอร์เซนต์การเกิด regenerated plant เมื่อแคลลัสเจริญในสูตรอาหารที่มีออกซินต่างชนิดกันคือ IAA และ 2,4-D พบว่าในอาหารสูตรที่เติม IAA และไคเนติน ทั้ง N. tabacum และ N. rustica จะให้แคลลัสที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างกัน จำแนกได้เป็น 2 และ 3 กลุ่ม ตามลำดับ และเมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรที่เติม 2,4-D แทน IAA ยาสูบทั้ง 2 ชนิดจะให้แคลลัสที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างกันจำแนกได้เป็น 2 กลุ่ม ดังแสดงให้เห็นความแตกต่างได้ในตารางที่ 17 และในรูปที่ 6, 10

ตารางที่ 17 เปรียบเทียบความแตกต่างของลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเปอร์เซนต์การเกิด regenerated plant ของแคลลัส N. tabacum และ N. rustica ที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS. (1962) ที่เติมออกซินต่างกัน คือ IAA และ 2,4-D

ชนิดของยาสูบ	N. tabacum				N. rustica				
ชนิดของออกซิน	IAA		2,4-D		IAA			2,4-D	
กลุ่มของแคลลัส	1	2	1	2	1	2	3	1	2
การเกาะกลุ่มของเซลล์	เซลล์เกาะกลุ่มกันหนาแน่น	เซลล์เกาะกลุ่มกันอย่างหลวม ๆ	เซลล์เกาะกลุ่มกันอย่างหลวม แคลลัสชุ่มน้ำ	เซลล์เกาะกลุ่มกันแน่นกว่ากลุ่มที่ 1	เซลล์เกาะกลุ่มกันหนาแน่น	เซลล์เกาะกลุ่มกันอย่างหลวม ๆ แคลลัสฟู	เซลล์เกาะกลุ่มกันหนาแน่น	เซลล์เกาะกลุ่มกันอย่างหลวม ๆ แคลลัสร่วน ชุ่มน้ำ	เซลล์เกาะกลุ่มกันแน่นกว่ากลุ่มที่ 1 แคลลัสชุ่มน้ำ
สีของแคลลัส	สีเขียวและค่อย ๆ เขียวเข้ม	สีเขียวอ่อนมากค่อมาเป็นสีน้ำตาลออกเหลือง	สีน้ำตาลค่อนข้างดำ	สีเหลืองปนเขียว	สีขาวขุ่นออกเขียว	สีเหลืองปนน้ำตาลอ่อน	สีขาวใสออกเขียว	สีขาวออกน้ำตาลอ่อน ๆ	สีเหลืองออกเขียว
น้ำหนักเฉลี่ยของแคลลัส 1 ชิ้น (25 ซ้ำ) (จากส่วนลำต้น)	1.927	1.315	1.327	1.393	1.401	1.144	1.477	0.873	0.941
% การเกิด regenerated plant (25 ซ้ำ) (จากส่วนลำต้น)	66.67	25	10.34	27.58	68.75	29.16	75	10.71	19.51

การแปรของลักษณะการเกาะกลุ่มของเซลล์ สีของแคลลัส น้ำหนักเฉลี่ยและเปอร์เซนต์การเกิด regenerated plant ของแคลลัส เกิดขึ้นในยาสูบทั้ง 2 ชนิด ที่เลี้ยงในอาหารที่เติมออกซินชนิดเดียวกัน และสามารถสังเกตความแตกต่างได้ชัดเจนในแคลลัสที่เลี้ยงในออกซินต่างชนิดกัน แคลลัสของยาสูบทั้ง 2 ชนิดที่เลี้ยงในอาหารที่เติม IAA จะให้เปอร์เซนต์การเกิด regenerated plant สูงกว่าแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารเติม 2,4-D ดังนั้นถ้าต้องการให้ได้ต้น regenerated plant มาก ควรเลี้ยงแคลลัสในอาหารที่มี IAA เป็นองค์ประกอบหรือถ้ามีความจำเป็นต้องใช้ 2,4-D ควรใช้ในปริมาณที่ต่ำกว่าที่ใช้ในการทดลองนี้ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Tran Thanh Van (1974) ที่ทดลองใช้ 2,4-D ในความเข้มข้น 10^{-5} โมล (2.2 มก./ล.) และ ไคเนติน 10^{-6} โมล (0.2 มก./ล.) ซึ่งให้แคลลัสยาสูบมีสีน้ำตาลออกเทา และเป็นแคลลัสที่ไม่มีการเกิด organogenesis แต่ถ้าใช้ IAA ที่ 10^{-5} โมล (1.6 มก./ล.) ร่วมกับ ไคเนติน 10^{-6} โมล (0.2 มก./ล.) จะเกิดแคลลัสได้ดีกว่า อาจเป็นเพราะ 2,4-D มีผลต่อการยับยั้งการเปลี่ยนแปลงเป็นต้นใหม่ โดยในอาหารที่มีความเข้มข้นของออกซินสูงเกินไป จะมีผลต่อการงอกของ plumule และ radicle โดยไปยับยั้งการขยายตัวของเซลล์ (Noggle and Fritz, 1983) ทำให้ plumule และ radicle ยืดตัวได้น้อยกว่าต้นอ่อนที่เพาะในสภาพปกติ อีกทั้ง 2,4-D เป็นออกซินที่สลายตัวได้ยากกว่า IAA ทำให้ 2,4-D สะสมในแคลลัสมากเกินไป ควรใช้ออกซินที่สลายตัวได้ง่ายกว่า 2,4-D เช่น IAA เติมลงในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ในการศึกษารูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ของแคลลัสยาสูบทั้ง 2 ชนิด คือ N. tabacum และ N. rustica พบว่าสามารถใช้เปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ในการตรวจสอบชนิดของยาสูบได้ โดยที่ยาสูบทั้ง 2 ชนิดจะให้รูปแบบไอโซไซม์ที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน N. tabacum มีการเคลื่อนที่ของแถบ (Rf) อยู่ระหว่าง 0.15-0.66 มีจำนวนแถบรวม 9 แถบ โดยสามารถแบ่งแถบไอโซไซม์ได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มเคลื่อนที่ช้าและกลุ่มเคลื่อนที่เร็ว ส่วนใน N. rustica ก็จัดแบ่งแถบไอโซไซม์ตามการเคลื่อนที่ได้เป็น 2 กลุ่มเช่นเดียวกัน แต่มีค่า Rf อยู่ระหว่าง 0.14-0.72 และมีจำนวนแถบรวม 8 แถบ เห็นได้ว่า N. rustica มีแถบของเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ที่เคลื่อนที่ลงมาได้ระยะทาง

มากกว่า อาจเป็นเพราะแถบไอโซไซม์ของ N. rustica มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่าหรือประจุรวมเป็นลบมากกว่า ทำให้การเคลื่อนที่ของแถบไอโซไซม์จากขั้วลบลงมายังขั้วบวกที่อยู่ตรงข้าม เป็นไปได้เร็วกว่าแถบไอโซไซม์ของ N. tabacum แต่การแยกของแถบไอโซไซม์ใน N. rustica ไม่ค่อยชัดเจนนัก อาจเป็นเพราะน้ำหนักโมเลกุลของไอโซไซม์แต่ละตัวใกล้เคียงกัน ขณะที่ไอโซไซม์ของ N. tabacum มีแถบแยกจากกันได้อย่างชัดเจนมากกว่า (รูปที่ 13 (2 จ.-2 ช.)

เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ระหว่างแคลลัส regenerated plant และ subcultured ของแคลลัสที่เกิดจากส่วนลำต้นกับส่วนใบ พบว่าให้รูปแบบของไอโซไซม์ที่คล้ายคลึงกันทั้งจำนวนแถบและระยะทางการเคลื่อนที่ของแถบ แม้จะมีความเข้มแตกต่างกันเล็กน้อย แสดงให้เห็นว่า ไม่ว่าจะใช้ explant จากส่วนลำต้นหรือใบของยาสูบก็จะให้แคลลัสที่มีรูปแบบไอโซไซม์ที่ไม่แตกต่างกันมากนัก ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Bassiri และ Carlson (1978) ศึกษารูปแบบไอโซไซม์ของแคลลัสที่ชักนำจากส่วนใบเลี้ยง ราก และส่วนอื่น ๆ ของถั่วแขก (Phaseolus vulgaris L.) พบว่า รูปแบบไอโซไซม์ของแคลลัสไม่ว่าจะมาจาก explant ส่วนใดก็จะให้รูปแบบไอโซไซม์เป็นแบบเดียวกัน Lavee และ Galston (1968b) อธิบายผลการทดลองที่คล้ายคลึงกันนี้ว่า อาจเป็นเพราะ explant จากส่วนที่ต่างกัน เมื่อนำมาทำการเลี้ยงเนื้อเยื่อและควบคุมสภาพแวดล้อมต่างๆ เหมือนกัน จะเกิดการ dedifferentiation ไปเป็นกลุ่มเซลล์เริ่มต้นเหมือน ๆ กัน และมีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็ว ทำให้ได้รูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ที่เป็นรูปแบบเดียวกัน แต่รูปแบบนี้จะต่างไปจาก explant ที่ใช้เมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองครั้งนี้ explant ที่ใช้คือต้นยาสูบที่เพาะในอาหารสังเคราะห์ 50 วัน ให้รูปแบบไอโซไซม์ที่มีการเคลื่อนที่ของแถบเพียง 1 กลุ่ม คือ กลุ่มเคลื่อนที่เร็ว โดยไม่พบไอโซไซม์ในกลุ่มเคลื่อนที่ช้า แต่แคลลัสที่ได้จากยาสูบนี้จะพบแถบสีในกลุ่มเคลื่อนที่ช้าเพิ่มขึ้นมาซึ่งแถบสีในกลุ่มนี้อาจมีความสำคัญในการเกิด dedifferentiation จาก explant ไปเป็นแคลลัสก็เป็นได้ เนื่องจากเป็นแถบที่มีความเข้มสูงและพบเกิดขึ้นในทุกซ้ำของการทดลอง ผลงานนี้สอดคล้องกับงานทดลองของ Shinchi และ Noguchi (1976) ที่พบแถบสีของ

เปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ในแคลลัสมีจำนวนแถบมากกว่าที่พบใน explant คือส่วนใบและรากของยาสูบ แต่เมื่อแคลลัสเกิด differentiation ไปเป็น regenerated plant พบว่าแถบสีในกลุ่มเคลื่อนที่ช้าที่มีความเข้มสูงในแคลลัสนั้นกลับมีความเข้มลดต่ำลงอย่างมาก จนเกือบตรวจสอบไม่พบในบางซ้ำของการทดลองและไอโซไซม์ในกลุ่มเคลื่อนที่เร็วของ regenerated plant จะให้ความเข้มสูงมากเมื่อเทียบกับของแคลลัส เห็นได้ว่าจาก explant ไปเป็นแคลลัสมีการเปลี่ยนแปลงของเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์และเมื่อแคลลัสให้ต้น regenerated plant ก็กลับให้รูปแบบไอโซไซม์คล้ายคลึงกับ explant เดิม งานวิจัยในลักษณะเดียวกันนี้ Pickering และคณะ (1973) ได้รายงานไว้ว่า การศึกษารูปแบบไอโซไซม์ระหว่างการ dedifferentiation จาก explant ของ Sinapsis alba ไปเป็นแคลลัสซึ่งในขบวนการนี้จะมีการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ แต่เมื่อเริ่มมีการ differentiateion รูปแบบของเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ก็จะกลับสู่สภาพปกติเหมือนเดิม ซึ่งผลการทดลองเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับการทดลองนี้

เมื่อศึกษาถึงความแตกต่างในรูปแบบไอโซไซม์ของเนื้อเยื่อแคลลัส regenerated plant และ subcultured ของแคลลัส เมื่อเลี้ยงในอาหารเป็นเวลานานต่าง ๆ กัน พบว่าส่วนใหญ่ให้รูปแบบไอโซไซม์ที่คล้ายคลึงกัน และมีรูปแบบคงที่ในแคลลัสกลุ่มต่าง ๆ แต่อาจพบการแปรในจำนวนและความเข้มของแถบสีไอโซไซม์ในบางซ้ำของการทดลอง และจะพบการแปรนี้ใน N. rustica มากกว่าใน N. tabacum แต่จะไม่พบการแปรในระยะทางการเคลื่อนที่ของแถบสีของไอโซไซม์ (ค่า Rf) ในสนามไฟฟ้า ซึ่งวิธีการแยกไอโซไซม์ในสนามไฟฟ้านั้น อาศัยความแตกต่างของประจุและขนาดโมเลกุลของไอโซไซม์ การเปลี่ยนแปลงของการเคลื่อนที่ทางสนามไฟฟ้าของไอโซไซม์ อาจมีผลมาจากกรดอะมิโนตัวใหม่ที่มาแทนที่ มีประจุแตกต่างไปจากกรดอะมิโนตัวเดิม แต่โดยส่วนใหญ่แล้ว กรดอะมิโนจะมีประจุเป็นกลาง ส่วนกรดอะมิโนที่มีประจุเป็นบวกหรือลบพบได้น้อย ดังนั้นการแทนที่ของกรดอะมิโนส่วนใหญ่จึงมีประจุเป็นกลางเหมือนกับกรดอะมิโนตัวเดิม ทำให้ประจุรวมไม่เปลี่ยนแปลง และไม่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของโมเลกุลทางสนามไฟฟ้า ทั้ง ๆ ที่การเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นจริง แต่อาจตรวจสอบไม่ได้ (Shaw, 1965)

ในการทดลองนี้ พบการเปลี่ยนแปลงทางความเข้มและจำนวนแถบของไอโซไซม์ในแคลลัสของ N. rustica มากกว่าที่พบใน N. tabacum ทั้งนี้อาจขึ้นกับชนิดของพืช โดยที่ N. tabacum เป็นพืชพันธุ์ปลูกที่นิยมปลูกกันทั่วไป ผ่านการปรับปรุงพันธุ์มานาน ทำให้มีความคงที่และอยู่ตัวในลักษณะต่าง ๆ มากกว่าใน N. rustica ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Sheen (1970) ที่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของรูปแบบไอโซไซม์ภายใน N. tabacum ในปี 1977 Cullis ได้อ้างถึงผลงานของ Torey และ Jinks (1976) ว่า N. rustica จะมีความไวต่อสภาพแวดล้อมมาก โดยมีการเปลี่ยนแปลงรูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ไปตามสภาวะต่าง ๆ กันถึง 24 แบบ ในการทดลองนี้แคลลัสของ N. rustica ให้รูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ไม่สม่ำเสมอ คือในบางซ้ำของการทดลองอาจตรวจแถบสีบางแถบไม่พบและมีความเข้มแตกต่างกันไป แต่เมื่อแคลลัสนั้นเกิด differentiation ไปเป็นต้นนั้น แถบที่เคยหายไปจะปรากฏขึ้นมาใน regenerated plant และความเข้มของแถบที่มีอยู่ก็สูงขึ้นกว่าในแคลลัสด้วย การที่ได้ผลเช่นนี้ได้มีนักวิทยาศาสตร์อธิบายว่า อาจเป็นเพราะการควบคุมการเกิด differentiation ไปเป็นอวัยวะต่าง ๆ ของพืช ต้องผ่านลำดับการเปลี่ยนแปลงที่ซับซ้อน มีการควบคุมที่ระดับยีน ซึ่ง differentiated gene เป็นตัวควบคุม และใช้ macromolecule เป็นตัวกลางสื่อสารข้อมูลในการเกิด differentiation (Reinert etal,1977) ซึ่งอาจมีการส่งเสริมหรือระงับการยับยั้ง หรือมีการยับยั้งการสร้างโปรตีนโดยยีน ซึ่งจะสังเกตเห็นได้จากการเปลี่ยนแปลงในรูปแบบไอโซไซม์ โดยที่อาจไม่พบไอโซไซม์บางตัวเกิดขึ้นในครั้งแรกหรือเกิดแต่มีในปริมาณน้อย และจะกลับมาปรากฏหรือเพิ่มกิจกรรมขึ้นอีกก่อนเกิดการ differentiation (Thorpe, Tran Thanh Van and Gaspar, 1978) แสดงว่ายีนที่ควบคุมการผลิตไอโซไซม์บางตัวจะมีการทำงานที่ระยะการพัฒนาขั้นต้น ๆ ขณะที่ยีนอื่น ๆ จะมีการทำงานที่ระยะต่าง ๆ กัน ในการพัฒนาเพื่อที่จะทำให้เกิดการผลิตไอโซไซม์ใหม่ ๆ หรือเพิ่มกิจกรรมของไอโซไซม์ที่มีอยู่เพื่อความจำเป็นในการเกิด differentiation ต่อไป (Shannon, 1968)

เมื่อศึกษาถึงไอโซไซม์ซึ่งอาจจะถูกปล่อยออกมาในอาหารที่ใช้เลี้ยงแคลลัส ตรวจพบว่ามีเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ในอาหารที่ใช้เลี้ยงด้วย และไอโซไซม์นี้มีรูปแบบที่คล้ายคลึงกับไอโซไซม์ที่พบในแคลลัสยาสูบ แต่ในอาหารที่ใช้เลี้ยงมีความเข้มของแถบสีต่ำกว่ามาก (จนทำให้ตรวจไม่พบแถบสีบางแถบในอาหารเลี้ยงแคลลัสของ N. tabacum) ความเข้มของแถบสีจะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นในอาหารที่ใช้เลี้ยงแคลลัสเป็นเวลานานขึ้น อาจเป็นเพราะเมื่อแคลลัสยาสูบมีอายุมากขึ้นจะมีกิจกรรมของเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์สูงขึ้น ทำให้มีการปล่อยไอโซไซม์ลงในอาหารมากขึ้น ในการทดลองของ McCown และคณะ (1970) พบว่าในการเลี้ยงเนื้อเยื่อของ Dianthus เนื้อเยื่อนั้นมีการปล่อยเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ลงในอาหาร และมีรูปแบบคล้ายคลึงกับที่พบในแคลลัสด้วย นอกจากนั้นยังพบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ถูกปล่อยลงในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อของถั่วลิสง (peanut) ด้วย (Srivastava and Huystee, 1973) จะเห็นว่า ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชทั่ว ๆ ไป เนื้อเยื่อปกติสามารถที่จะปลดปล่อยไอโซไซม์ได้ ซึ่งเป็นเหตุการณ์ปกติ ไม่ได้เกิดขึ้นเฉพาะเนื้อเยื่อที่ได้รับเชื้อโรค หรือมีบาดแผลดังที่เคยเข้าใจกันมาในอดีต นอกจากนั้นเนื้อเยื่อพืชยังสามารถปล่อยโปรตีนชนิดอื่น ๆ นอกจากเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ลงมาในอาหารได้ แต่เนื่องจากโปรตีนเหล่านั้นไม่ได้แสดงกิจกรรมของเอ็นไซม์ออกมา ทำให้ตรวจสอบได้ยากกว่าเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ซึ่งมีกิจกรรมที่เฉพาะเจาะจงและสามารถตรวจสอบได้ง่าย

ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีปัญหามากกว่าการปลูกพืชตามธรรมชาติ โดยที่ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อต้องการแร่ธาตุ อากาศ และน้ำ รวมทั้งออกซิน วิตามิน และ organic N_2 source ซึ่งสารเหล่านี้ต้องถูกนำเข้ามาในเซลล์ในรูปใดรูปหนึ่งและถูกขนส่งไปยังเซลล์อื่น ๆ ที่ไม่ได้สัมผัสอาหารโดยตรง พืชที่ปลูกตามธรรมชาติจะมีระบบท่อลำเลียงสำหรับใช้ในการเคลื่อนย้าย metabolite ต่าง ๆ ไปยังส่วนต่าง ๆ ของพืช แต่ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้นพืชจะปล่อยเอ็นไซม์หรือโปรตีนต่าง ๆ จากเนื้อเยื่อลงไปในอาหาร เพื่อเปลี่ยนแปลงอาหารไปเป็นสารบางอย่างที่จำเป็นในการเจริญของเนื้อเยื่อ ในขณะที่เนื้อเยื่อบางชนิดอาจปล่อยเอ็นไซม์ออกไป แล้วขัดขวางต่อการเจริญของเนื้อเยื่อเอง ซึ่งอาจเป็นข้ออธิบายว่าการที่เนื้อเยื่อบางชนิดจากพืชพวกใบเลี้ยงเดี่ยว หรือพืชใบเลี้ยงคู่ หรือพวก gymnosperm ไม่

สามารถนำมาเลี้ยงเนื้อเยื่อได้สำเร็จหรือเลี้ยงได้ยาก ก็เนื่องจากเนื้อเยื่อไม่สามารถจะเปลี่ยนแปลงอาหารสังเคราะห์ให้เป็นประโยชน์กับตัวเองได้ ในทางตรงกันข้ามอาจไปยับยั้งการเจริญด้วย (Straus and Campbell, 1963) การปล่อยเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ลงในอาหาร จึงแสดงถึงกระบวนการส่งผ่านระหว่างเซลล์ซึ่งชี้ให้เห็นถึงกลไกในการเคลื่อนย้ายสารภายในเซลล์ เพื่อความอยู่รอดของเนื้อเยื่อ (Pickering etal, 1973)

ในการปลดปล่อยไอโซไซม์จากเนื้อเยื่อลงในอาหารนั้น สามารถควบคุมได้ด้วยระดับ cation ในอาหาร ตัวอย่างเช่น Ca^{2+} มีประสิทธิภาพในการเพิ่มอัตราการปล่อยไอโซไซม์จากเนื้อเยื่อลงในอาหาร และจากการศึกษาพบว่าความเข้มของเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ที่ระดับสูงจะเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญในการเกิด lignification ซึ่งเป็นกระบวนการหนึ่งในการพัฒนาการเจริญของพืชด้วย ดังนั้นถ้าเนื้อเยื่อที่เลี้ยงในอาหารที่มีอิออนดังกล่าวในระดับสูงเกินไปจะทำให้การปล่อยเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ในอัตราที่สูงทำให้เปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ที่ผนังเซลล์มีปริมาณต่ำ ทำให้ขาดปัจจัยสำคัญในการเกิด lignification ดังนั้นเนื้อเยื่อที่เจริญในอาหารที่มีระดับ Ca^{2+} ที่พอเหมาะ (ขึ้นกับชนิดของพืช) ก็จะมีเปอร์ออกซิเดสในผนังเซลล์ของเนื้อเยื่อสูง ทำให้ไม่ขาดปัจจัยสำคัญในการเกิด lignification จะเห็นได้ว่า ความเข้มข้นที่เหมาะสมของอิออนในอาหารสามารถควบคุมระดับเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ในผนังเซลล์ของเนื้อเยื่อพืช ซึ่งจะส่งผลถึงความสามารถในการเกิด differentiation ด้วย (Lipetz and Garro, 1965) ในการทดลองนี้พบว่า ความเข้มของเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ที่ตรวจพบในอาหารต่ำมาก เมื่อเทียบกับไอโซไซม์ที่พบในแคลลัสอาจเป็นไปได้ว่า อาหารที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อในการทดลองนี้มีระดับอิออนที่พอเหมาะ ไม่สูงเกินไปจนทำให้อัตราการปล่อยเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ลงในอาหารสูงมากกว่าที่พบในแคลลัส อีกทั้งชนิดของพืชคือยาสูบเองก็ไม่ปล่อยเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ลงในอาหารมากเกินไปจนถึงกับไม่สามารถเกิด lignification หรือไม่สามารถพัฒนาเป็น regenerated plant ได้

ผลการศึกษาเปรียบเทียบรูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ระหว่างแคลลัส regenerated plant และ subcultured ของแคลลัส พบว่าไอโซไซม์ของแคลลัสและ

subcultured ของแคลลัสจะให้รูปแบบที่คล้ายคลึงกัน โดยแบ่งไอโซไซม์ตามการเคลื่อนที่ได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มเคลื่อนที่เร็ว และกลุ่มเคลื่อนที่ช้า มีจำนวนแถบรวมเท่ากัน แต่ความเข้มต่างกันเล็กน้อย โดยเฉพาะทั้งคู่มีไอโซไซม์ในกลุ่มเคลื่อนที่ช้ามีความเข้มสูงมาก แสดงให้เห็นว่าการ subcultured ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงจำนวนแถบและระยะการเคลื่อนที่ของไอโซไซม์ แต่รูปแบบไอโซไซม์ของทั้งคู่จะแตกต่างไปจากของ regenerated plant โดยที่ใน regenerated plant นั้นเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ในกลุ่มเคลื่อนที่ช้า มีความเข้มต่ำมาก ขณะที่แคลลัสกับ subcultured ของแคลลัสมีความเข้มสูง แต่ไอโซไซม์ในกลุ่มเคลื่อนที่เร็วให้ผลตรงกันข้ามคือใน regenerated plant พบความเข้มของแถบกลุ่มนี้สูงกว่าที่พบในแคลลัสและ subcultured เป็นที่น่าสังเกตว่าใน regenerated plant ของ N. tabacum พบแถบสีที่ Rf 0.66 ส่วน N. rustica พบแถบที่ Rf 0.72 เพิ่มขึ้นมา และแถบสีดังกล่าวในยาสูบทั้ง 2 ชนิดนี้จะไม่พบในแคลลัสและ subcultured ของแคลลัส และความเข้มของแถบสีดังกล่าวจะเพิ่มขึ้นใน regenerated plant ที่เลี้ยงในอาหารนานขึ้น ดังนั้นไอโซไซม์ที่ตำแหน่งนี้อาจมีความเกี่ยวข้องในการเกิด maturation ในพืช หรืออาจเกี่ยวข้องในการเกิด lignification เนื่องจากในแคลลัสไม่มีการสร้าง secondary cell wall ทำให้ตรวจไม่พบแถบสีนี้ในแคลลัสส่วนใหญ่ (Lagrimini and Rothstein, 1987) จะเห็นว่ารูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ระหว่างแคลลัสและ regenerated plant มีความแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดดังกล่าวแล้ว และในยาสูบทั้ง 2 ชนิดก็ให้ผลคล้ายคลึงกันเป็นเครื่องช่วยยืนยันความเป็นไปได้ที่จะใช้ความเข้มและจำนวนแถบที่เพิ่มขึ้นของเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ในกลุ่มเคลื่อนที่เร็ว ในการตรวจสอบการพัฒนาจากแคลลัสไปเป็น regenerated plant ได้ จะเห็นว่าในบางช้ำของการทดลองพบว่าแคลลัสและ subcultured ของแคลลัสมีความเข้มของเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ในกลุ่มเคลื่อนที่เร็วสูงและพบแถบสีที่ Rf 0.66 ใน N. tabacum และ 0.72 ใน N. rustica เพิ่มขึ้นมาในความเข้มต่ำ ซึ่งแคลลัสพวกนี้มีการพัฒนาเป็น regenerated plant ได้ดี จึงอาจใช้ทำนายได้ว่า แคลลัสหรือ subcultured ของแคลลัสที่มีรูปแบบไอโซไซม์เช่นนั้น มีแนวโน้มที่จะเกิด regenerated plant ได้ดีกว่าแคลลัส หรือ subcultured ที่ไม่ปรากฏแถบสีดังกล่าว

หรือมีความเข้มและจำนวนแถบของเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ในกลุ่มเคลื่อนที่เร็วต่ำกว่า นอกจากนั้นในการเลี้ยงแคลลัสที่เกิดจากส่วนลำต้นและใบของยาสูบทั้ง 2 ชนิด ในอาหารสังเคราะห์ที่เติม IAA พบว่าแคลลัสที่ได้จะมีการแปรในจำนวนและความเข้มของเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ แต่เมื่อพิจารณาร่วมกับลักษณะภายนอกของแคลลัสคือลักษณะการเกาะกลุ่มและสีของแคลลัส ทำให้สามารถแบ่งกลุ่มแคลลัสเป็นกลุ่มใหญ่ ๆ ได้ 2 กลุ่ม คือ แคลลัสที่ลักษณะภายนอกมีสีเขียวและเซลล์เกาะกลุ่มกันแน่น แคลลัสกลุ่มนี้ส่วนใหญ่จะมีเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ในกลุ่มเคลื่อนที่เร็วมีความเข้มสูง มีจำนวนแถบสีมาก และเมื่อเลี้ยงแคลลัสกลุ่มนี้ต่อไปจะเป็นแคลลัสที่มีเปอร์เซนต์การเกิด regenerated plant สูง ตัวอย่างแคลลัสในกลุ่มนี้คือแคลลัสกลุ่มที่ 1 ของยาสูบ N. tabacum และแคลลัสกลุ่มที่ 1 และ 3 ของยาสูบ N. rustica ตรงกันข้ามกับแคลลัสที่มีลักษณะภายนอกมีสีค่อนข้างเหลืองออกดำ การเกาะกลุ่มไม่แน่น ฟู จะให้รูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ในกลุ่มเคลื่อนที่เร็วมีความเข้มต่ำเป็นส่วนใหญ่ มีจำนวนแถบสีน้อย และเมื่อเลี้ยงแคลลัสกลุ่มนี้ต่อไปจะให้เปอร์เซนต์การเกิด regenerated plant ต่ำ เช่น แคลลัสกลุ่มที่ 2 ของยาสูบ N. tabacum และ N. rustica ส่วนแคลลัสของยาสูบทั้ง 2 ชนิดที่เลี้ยงในอาหารที่เติม 2,4-D แทน IAA พบว่าแคลลัสมีการแปรในจำนวนและความเข้มของแถบ เมื่อนำมาพิจารณาร่วมกับลักษณะภายนอกของแคลลัส พบว่าแคลลัสที่มีลักษณะภายนอกสีเหลืองออกเขียวและเซลล์เกาะกลุ่มกันแน่น แคลลัสกลุ่มนี้ส่วนใหญ่จะมีเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ในกลุ่มเคลื่อนที่เร็วมีความเข้มสูง และจำนวนแถบมากกว่าแคลลัสที่มีลักษณะชุ่มน้ำ สีน้ำตาลออกดำ และมีการเกาะกลุ่มของเซลล์หลวม ซึ่งมีเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์กลุ่มเคลื่อนที่เร็ว ความเข้มต่ำและจำนวนแถบน้อย เมื่อเปรียบเทียบแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารที่เติมIAA กับที่เติม 2,4-D แทน IAA พบว่าจะให้รูปแบบไอโซไซม์ต่างกัน โดยที่ความเข้มและจำนวนของแถบสีของเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ในยาสูบทั้ง 2 ชนิดของแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่เติม IAA จะสูงกว่าในแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่เติม 2,4-D อย่างเห็นได้ชัดเจน และเมื่อเลี้ยงต่อไปพบว่าแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารที่เติม IAA มีการพัฒนาให้ regenerated plant ในเปอร์เซนต์ที่สูงกว่าแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารที่เติม 2,4-D มาก (ดังตารางที่ 11 และ 16) จาก

ผลต่าง ๆ เหล่านี้แสดงว่าการเปลี่ยนแปลงในความเข้มและจำนวนแถบของเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ในกลุ่มเคลื่อนที่เร็ว น่าจะมีความเกี่ยวข้องกับการเกิด differentiation และ regeneration ของพืชไปเป็นอวัยวะต่าง ๆ ได้ นอกจากนั้นยังมีรายงานการวิจัยอื่น ๆ ที่ใช้ไอโซไซม์เป็นตัวบ่งชี้การเกิด differentiation เนื่องจากขณะที่เซลล์มีกระบวนการ differentiation ซึ่งจะนำไปสู่การพัฒนาลักษณะทางสัณฐานวิทยาต่างๆ และหน้าที่ที่เฉพาะเจาะจงของอวัยวะต่าง ๆ นั้นจะต้องผ่านการเปลี่ยนแปลง ซึ่งจะเห็นได้จากการแสดงออกในรูปแบบของไอโซไซม์ เช่นในการศึกษาการงอกของเมล็ดพืช พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงต่าง ๆ เกิดขึ้นภายในเมล็ด เช่นการสังเคราะห์หรือลดระดับเอ็นไซม์ และโปรตีนโครงสร้างอื่น ๆ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้จะเกิดขึ้นพร้อม ๆ กับการเกิด differentiation ของเมล็ดพืช (Scandalios and Sorenson, 1977) กิจกรรมของเอ็นไซม์ที่เพิ่มขึ้นในสิ่งมีชีวิตที่กำลังพัฒนา อาจเป็นผลมาจากการสังเคราะห์โมเลกุลเอ็นไซม์ขึ้นใหม่ หรือจากการกระตุ้นของสารตั้งต้นที่มีอยู่และก่อให้เกิดเอ็นไซม์ขึ้น แต่กลไกที่แน่นอนซึ่งสิ่งมีชีวิตชั้นสูงสามารถควบคุมการแสดงออกต่าง ๆ ระหว่างการพัฒนายังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด บางทีอาจมีการควบคุมที่ระดับยีนหรือใน path wayระหว่างยีนและผลผลิตสุดท้ายของยีน คือ เอ็นไซม์นั่นเอง ดังนั้นการศึกษาการแสดงออกของยีนต่าง ๆ ระหว่างการพัฒนาสามารถศึกษาผ่านไอโซไซม์ เนื่องจากไอโซไซม์เป็นผลผลิตของยีนโดยตรง แต่ไอโซไซม์มีรูปแบบโมเลกุลได้หลายรูปแบบภายในสิ่งมีชีวิตหนึ่ง จึงทำให้สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ในการศึกษาการพัฒนาของสิ่งมีชีวิตได้ดีกว่าเอ็นไซม์ธรรมดา ดังนั้นการศึกษาในรายละเอียดของการเปลี่ยนแปลงรูปแบบไอโซไซม์ระหว่างการพัฒนา อาจจะนำไปสู่ความเข้าใจกลไกพื้นฐานบางอย่างของกระบวนการ differentiation ในระดับเซลล์นอกจากนั้นความรู้ทาง physiochemical และคุณสมบัติของไอโซไซม์แต่ละตัวจะทำให้เข้าใจหน้าที่ทางสรีระวิทยา และการทำงานของไอโซไซม์ได้ดีขึ้น (Scandalios, 1974; Scandalios and Sorenson, 1977)

จากแนวความคิดดังกล่าวที่จะใช้ไอโซไซม์ในการศึกษาการเกิด differentiation ทำให้เกิดงานวิจัยขึ้นเป็นจำนวนมาก โดยเฉพาะการใช้เปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ ในการศึกษาการเกิด differentiation ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ เนื่องจาก

เหตุผลที่ว่าเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์มีหน้าที่มากมายในเซลล์ เช่น ช่วยเร่งปฏิกิริยา IAA oxidation ซึ่ง IAA เป็นฮอร์โมนควบคุมการเจริญของพืช ดังนั้นผลผลิตของปฏิกิริยานี้ก็น่าจะเกี่ยวข้องในการพัฒนาการเจริญของกลุ่มเซลล์ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อ หน้าที่อีกประการของเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์คือเกี่ยวข้องในการสังเคราะห์ลิกนิน โดยเฉพาะ anionic เปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ ซึ่งพบว่าจะมีกิจกรรมสูงต่อ coniferyl alcohol ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการเกิดลิกนิน ทำให้เกิดแนวคิดที่ว่า เปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์น่าจะมีบทบาทในการเกิด lignification ด้วย (Lagrimini and Rothstein, 1987) อีกทั้งการสะสมของลิกนินบนผนังเซลล์ชั้นที่ 2 ของเซลล์พืชก็เป็นส่วนหนึ่งในขั้นตอนการพัฒนาการเจริญของเซลล์พืช เหตุผลต่าง ๆ เหล่านี้เป็นข้อสนับสนุนว่าเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์น่าจะมีความเกี่ยวข้องในการเกิด differentiation (Lipetz and Garro, 1965) Skoog and Miller (1957); Lavee and Galston (1968b) พบว่าแคลลัสจาก pith ของยาสูบและ Pelargonium สามารถเกิด differentiation ไปเป็น lignified cell คือ รากและยอด โดยมีการพัฒนากิจกรรมเปอร์ออกซิเดส ซึ่งเป็นไปในทำนองเดียวกันกับการทดลองของ Simola (1973) ที่พบว่า เปอร์ออกซิเดสใน clump ของ Atropa belladomia ที่กำลังเกิดราก จะมีการเปลี่ยนแปลงทั้งจำนวนและความเข้มของไอโซไซม์ ซึ่งเขาได้อธิบายว่า ในระยะแรกของการเกิดรากเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์จะมีความสัมพันธ์กับการเกิด lignification และการสลายออกซิน ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของไอโซไซม์นี้จะเกิดก่อนที่จะปรากฏโครงสร้างของอวัยวะ ดังนั้นจึงน่าจะมีความสัมพันธ์กับการเกิด differentiation ส่วนการทดลองของ Mader, Munch และ Bopp (1975) พบว่าระหว่างการเกิดยอดของเนื้อเยื่อพืช จะมีกระบวนการ 2 กระบวนการที่เป็นอิสระเกิดขึ้น คือ กระบวนการแรกมีการยับยั้งการเจริญในแคลลัส ซึ่งไม่มี differentiation ทำให้เกิดการลดกิจกรรมของเปอร์ออกซิเดสในกลุ่มเคลื่อนที่เร็ว อีกกระบวนการหนึ่ง คือ ขณะที่แคลลัสบางส่วนมีการสร้างmeristemoids ก็จะพบกิจกรรมของเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์สูงขึ้น ซึ่ง Thorpe และ Gaspar (1978) อธิบายว่า การเพิ่มกิจกรรมของไอโซไซม์นี้เกิดขึ้นก่อนที่จะมีการเริ่มสร้างmeristemoid อาจแสดงถึงความต้องการที่จะลดออกซินภายในพืช เพื่อให้

ได้สัดส่วนของออกซินต่อไซโตไคนินในอัตราที่ต่ำพอเหมาะในการเกิดยอด ดังที่ Stafford และ Galston (1970) พบว่ามีกิจกรรมของเปอร์ออกซิเดสมากในพืช บริเวณที่มีอัตราส่วนของ IAA กับ ไคเนติน ต่ำ (โดยเชื่อว่าหน้าที่หนึ่งในหลาย ๆ ประการของเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ คือ การ oxidize IAA) หรืออาจเนื่องมาจากผลผลิตหรือตัวกลางที่ได้จากการ oxidize IAAจะไปกระตุ้นการเจริญได้ (Lee, 1971b; Meudt and Stecher, 1972) ดังนั้นจึงอาจใช้ความเข้มและจำนวนแถบสีของเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ร่วมกับลักษณะภายนอกของแคลลัส ในการทำนายความสามารถในการเกิด differentiation ของแคลลัส เช่นเดียวกับที่ Wolter และ Gordon (1975) ได้ใช้รูปแบบและกิจกรรมของเปอร์ออกซิเดสในการทำนายการพัฒนาการเจริญและการ differentiation ของแคลลัสของต้น aspen

จากแผนภาพที่ 7 และแผนภาพที่ 13 การที่แคลลัสที่เลี้ยงในอาหารที่เติม IAA ให้รูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ในกลุ่มเคลื่อนที่เร็ว มีความเข้มสูง และมีจำนวนแถบมากกว่าที่ได้จากแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารที่เติม 2,4-D แทน อาจเป็นไปได้ว่า IAA เป็นออกซินที่ชักนำให้เปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์มีกิจกรรมสูงกว่าการใช้ 2,4-D สอดคล้องกับการทดลองของ O'Neill และ Scott (1987) ที่พบว่าเนื้อเยื่อแครอทที่เลี้ยงในอาหารที่เติม IAA จะมีกิจกรรมของเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์เพิ่มขึ้น แต่ Wochok และ Burleson (1974) เลี้ยงเนื้อเยื่อแครอทในอาหารที่เติม 2,4-D พบว่า 2,4-D ไปยับยั้งกิจกรรมของเปอร์ออกซิเดสหรือไม่ชักนำให้เกิดเปอร์ออกซิเดส ซึ่งผลการทดลองทำนองเดียวกันนี้สอดคล้องกับรายงานของ Ritzert and Turin (1970) ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อยาสูบบางชนิดรวมทั้งงานของ Lee (1972) ที่แสดงถึงการยับยั้งเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ในยาสูบที่เลี้ยงในอาหารที่เติม 2,4-D แต่จะกระตุ้นการเกิดไอโซไซม์ในยาสูบที่เลี้ยงในอาหารที่เติม IAA เหตุผลที่เป็นไปได้คือเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์จะถูกชักนำโดยการเพิ่มระดับของ IAA ที่อยู่ภายในเนื้อเยื่อเหล่านี้ หน้าที่หนึ่งของเปอร์ออกซิเดส คือ การเร่งปฏิกิริยา oxidize IAA ผลผลิตหรือสารตัวกลางที่ได้จากปฏิกิริยานี้ จะมีประสิทธิภาพสูงกว่า IAA ในการกระตุ้นการเจริญในพืช ดังนั้นการเพิ่มกิจกรรมของเปอร์ออกซิเดสจะเพิ่มความสามารถของ IAA ในการเป็นฮอร์โมนที่ควบคุมการเจริญ (Meudt and Stecher, 1972) ขณะที่ 2,4-D ไม่

สามารถกระตุ้นไอโซไซม์นี้ได้ซึ่ง Brewbaker and Hasegawa (1975) ได้รายงานว่าการกระตุ้นและการยับยั้งกิจกรรมของเปอร์ออกซิเดสขึ้นกับชนิดและความเข้มข้นของฮอร์โมนที่ใช้ด้วย และสอดคล้องกับรายงานของ Scandalios and Sorenson (1977) ที่พบว่า IAA ที่ความเข้มข้นที่พอเหมาะต่อการเจริญของพืชเท่านั้นที่จะทำให้กิจกรรมของเปอร์ออกซิเดสในกลุ่มเคลื่อนที่เร็วเพิ่มขึ้น ถ้าระดับของ IAA สูงมากเกินไปจนสามารถยับยั้งการเจริญของพืชได้ จะไม่มีผลในการชักนำเปอร์ออกซิเดสในกลุ่มเคลื่อนที่เร็ว ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชชนิดอื่น ๆ เช่น pith ของ Pelargonium หรือถั่ว พบว่า IAA ที่เติมลงในอาหารในตอนแรกจะยับยั้งกิจกรรมของไอโซไซม์ แต่หลังจากเลี้ยงเป็นเวลานาน กิจกรรมของไอโซไซม์กลับถูกกระตุ้นโดย IAA (Ockerse, Seigel and Galston, 1966; Chen and Galston, 1967) จากผลการทดลองดังกล่าว ทำให้ความเชื่อในอดีตที่ว่าเปอร์ออกซิเดสไม่มีความสำคัญและไม่ได้รับผลกระทบจากออกซินนั้นหมดไป ในปัจจุบันนี้เป็นที่ทราบกันแล้วว่า ระดับและชนิดของออกซินในอาหารเป็นปัจจัยหนึ่งในการควบคุมกิจกรรมของไอโซไซม์ โดยอาจทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งหรือเป็นตัวกระตุ้นกิจกรรมของเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ (Lavee and Galston, 1968b)

นอกจากออกซินแล้ว ระดับความเข้มข้นของไคเนติน ก็มีบทบาทต่อการกระตุ้นหรือยับยั้งเปอร์ออกซิเดสด้วย (Lee, 1974) โดยที่สัดส่วนและความเข้มข้นของ IAA ต่อไคเนติน ต้องมีความเหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเนื้อเยื่อ ในความเข้มข้นที่เหมาะสมนี้จะทำให้เกิดการพัฒนากิจกรรมของเปอร์ออกซิเดส โดยที่ความสมดุลย์ระหว่างฮอร์โมนเหล่านี้จะควบคุมไอโซไซม์และ phenolic substance อื่นๆ (Stafford and Galston, 1970) ฮอร์โมนและไอโซไซม์มีอิทธิพลซึ่งกันและกันในการควบคุมการเจริญของพืช (Ockerse, Siegel and Galstan, 1966) โดยที่ฮอร์โมนจะควบคุมขั้นตอนการเจริญโดยผ่านการเปลี่ยนแปลงทางไอโซไซม์ (Shinshi and Noguchi, 1975) เช่นตัวอย่างความสัมพันธ์ระหว่าง IAA และเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ กล่าวคือ IAA จะควบคุมการสังเคราะห์โปรตีนในระดับ transcription ของ RNA ก่อนที่จะมีการเปลี่ยนแปลงรูปแบบและกิจกรรมของไอโซไซม์ (Powell etal, 1975) หรือฮอร์โมน อาจมีผลในการเปลี่ยนแปลงทาง

ความเข้มข้นของตัวยับยั้งหรือสร้างตัวกระตุ้นไอโซไซม์ขึ้น (Chen and Galston, 1967) ระดับ IAA ภายในเซลล์จะถูกควบคุมโดยเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ซึ่งเป็น oxidase enzyme และจะเกิดปฏิกิริยา oxidize IAA ขึ้น ซึ่งผลผลิตหลักที่ได้จากปฏิกิริยานี้จะมีความสำคัญในการควบคุมการเจริญของพืช (Ritzert and Turin, 1970)

ในการทดลองกับยาสูบที่ปลูกในสภาพแวดล้อมภายนอก ช่วงเดือนพฤษภาคม-สิงหาคม 2532 พบว่ามีช่วงอุณหภูมิแตกต่างกัน 28.4-29.7 องศาเซลเซียส ตามเข้มแสง 5.2-5.9 ชม. (กรมอุตุนิยมวิทยา) พบว่าส่วนลำต้นและใบของยาสูบเมื่อต้นยาสูบมีอายุน้อย (30 และ 50 วัน) จะให้รูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ที่ไม่คงที่มีจำนวนแถบน้อย ความเข้มต่ำและมีการแปรไปในแต่ละซ้ำของการทดลอง ในส่วนลำต้นจะให้จำนวนแถบน้อยกว่าในส่วนใบแต่เมื่อยาสูบอายุมากขึ้น (70 และ 90 วัน) รูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์จะมีจำนวนแถบคงที่ขึ้น โดยมีจำนวนแถบเพิ่มมากขึ้นและมีความเข้มสูงกว่าที่ได้จากยาสูบอายุ 30 และ 50 วัน อีกทั้งในส่วนลำต้นกับส่วนใบจะเริ่มมีจำนวนแถบใกล้เคียงกัน Thomas และ Neucere (1974) ได้อ้างถึงผลงานของ Chen Towill และ Lowenberg ในปี 1970 ว่า เปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ในใบอ่อนของ Xanthium มีจำนวนและความเข้มของแถบไม่คงที่ และรายงานของ Conklin และ Smith 1971 พบว่าจำนวนแถบของเปอร์ออกซิเดสเพิ่มขึ้นในใบลำโพง (Datura) เมื่อพืชมีอายุมากขึ้น ดังนั้นสารสกัดจากใบพืชที่อายุต่าง ๆ กันอาจจะให้รูปแบบไอโซไซม์ที่ไม่เหมือนกัน (Reddy and Garber, 1971)

ในส่วนลำต้นและส่วนใบจะให้รูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ที่เฉพาะในแต่ละส่วนและสามารถจำแนกความแตกต่างได้โดยที่ในยาสูบ N. tabacum ส่วนลำต้นจะไม่พบแถบไอโซไซม์ในกลุ่มเคลื่อนที่ช้า ในขณะที่สามารถพบได้ในส่วนใบที่อายุมาก ในกลุ่มเคลื่อนที่เร็วส่วนลำต้นมีความเข้มของแถบที่ Rf 0.44 และ 0.50 สูงเด่นกว่าแถบอื่น ขณะที่ความเข้มที่ Rf 0.47 ต่ำ แต่ส่วนใบพบความเข้มของแถบที่ Rf 0.47 ค่อนข้างสูง และความเข้มของแถบที่ Rf 0.44 และ 0.50 ไม่แตกต่างจากแถบอื่น (ดังรูปที่ 14) ส่วนใน N. rustica มีความแตกต่างระหว่างเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ของส่วนใบกับส่วนลำต้น โดยมีจำนวนแถบในกลุ่มเคลื่อนที่ช้าต่างกัน คือ ในใบมีจำนวนแถบ 4 แถบ ส่วนลำต้นมี 3 แถบ (ดังรูปที่ 18) ความจำเพาะของรูปแบบไอโซไซม์ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ อาจเนื่องมาจากกลไกในการควบคุม

ของยีน โดยที่ operator gene ในเซลล์ต่าง ๆ ของสิ่งมีชีวิตจะควบคุมยีนโครงสร้างในการที่จะผลิตโพลีเปปไทด์ ในอัตราที่ต่าง ๆ กันในเซลล์แต่ละเซลล์ ดังนั้นเนื้อเยื่อที่มีโพลีเปปไทด์ชนิดใดมากกว่าอีกชนิดหนึ่ง ก็จะปรากฏไอโซไซม์ที่มีโพลีเปปไทด์ชนิดนั้นมากกว่าในเนื้อเยื่ออื่น (Shannon, 1968)

การทดลองนี้ พบว่าในยาสูบที่อายุน้อย (30 และ 50 วัน) ส่วนลำต้นและส่วนใบจะให้จำนวนแถบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์น้อย และไม่คงที่อีกทั้งมีความเข้มต่ำ อาจเป็นเพราะเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์บางตัวยังไม่มีความสำคัญต่อต้นที่ยังอ่อนอยู่ก็เป็นได้ แต่เมื่อต้นที่มีอายุมากขึ้น (70 วันขึ้นไป) ก็จะพบแถบสีเพิ่มขึ้นจนมีจำนวนคงที่และความเข้มสูงขึ้น ดังนั้นในการพิสูจน์หรือตรวจสอบชนิดของยาสูบจึงควรใช้ส่วนของลำต้นหรือใบของยาสูบที่มีอายุมากตั้งแต่ 70 วันขึ้นไป ซึ่งอายุขนาดนี้จะให้แถบสีเฉพาะตัวที่มีเสถียรภาพและมีความคมชัดเจนแยกจากกันได้ง่าย

ยาสูบที่เพาะในอาหารสังเคราะห์ที่ไม่เติมฮอร์โมนและมีการควบคุมสภาพแวดล้อม ขณะที่ทำการเลี้ยงโดยควบคุมอุณหภูมิและปริมาณแสงให้คงที่ พบว่ารูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ในส่วนของใบและส่วนลำต้นให้รูปแบบค่อนข้างคงที่ไม่เปลี่ยนแปลงมีจำนวนคงที่แม้เมื่อยาสูบอายุน้อย ๆ และในต้นที่มีอายุต่างกัน โดยมีความเข้มของแถบเพิ่มขึ้น เมื่อเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์นานขึ้น (จากแผนภาพที่ 8 และ 14)

เมื่อนำยาสูบที่เพาะในอาหารสังเคราะห์ที่ไม่เติมฮอร์โมน และควบคุมสภาพแวดล้อมมาเปรียบเทียบกับยาสูบที่ปลูกในสภาพแวดล้อมภายนอก พบว่ายาสูบในอาหารสังเคราะห์ให้รูปแบบไอโซไซม์ที่มีเสถียรภาพมากกว่า คือ มีจำนวนแถบคงที่ และไม่พบการแปรผันในแต่ละซ้ำของการทดลอง แต่ว่ามีจำนวนแถบน้อยกว่าที่ปลูกในสภาพแวดล้อมภายนอก คือไม่พบไอโซไซม์ในกลุ่มเคลื่อนที่ช้าหรือพบในความเข้มต่ำมาก อาจเป็นเพราะสภาพแวดล้อมภายนอกมีความแปรผัน ทำให้เกิดผลกระทบโดยตรงหรือโดยอ้อมต่อยาสูบมากกว่ายาสูบที่เพาะในอาหารสังเคราะห์ที่ควบคุมสภาพแวดล้อม ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองของ Wilkinson et al (1985) ซึ่งทดลองปลูกยาสูบภายในเรือนทดลอง และสภาพแวดล้อมภายนอก โดยพบว่าจะมีการกระจายของรูปแบบไอโซไซม์ในใบที่มีอายุน้อยมากกว่าในใบที่มี

อายุมากขึ้น และพบว่ารูปแบบไอโซไซม์ยังมีการกระจายอย่างมากในยาสูบที่ปลูกภายใต้สภาพแวดล้อมภายนอก เมื่อเทียบกับยาสูบที่ปลูกในเรือนทดลอง Dejong et.al (1968) ก็พบว่าพืชที่ปลูกในเรือนทดลองและในสภาพแวดล้อมภายนอกจะให้รูปแบบไอโซไซม์ที่ต่างกัน ต่อมาในปี 1973 Dejong ได้ทดลองปลูกยาสูบในสภาพแวดล้อมต่าง ๆ กัน เช่น อุณหภูมิและช่วงแสงต่าง ๆ กัน พบว่าพืชจะตอบสนองต่อสภาวะต่าง ๆ นั้น โดยการเปลี่ยนแปลงในรูปแบบเปอร์ออกซิเดส เช่นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นความเข้มของแถบสีเปอร์ออกซิเดสกลุ่มเคลื่อนที่ปานกลางจะลดลง หรือเมื่อเพิ่มช่วงแสง กลุ่มไอโซไซม์เคลื่อนที่ช้าและปานกลางจะมีความเข้มของแถบลดลง ซึ่งการเปลี่ยนแปลงในเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์นั้น อาจอธิบายได้ว่า เป็นผลเนื่องมาจากเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์มีบทบาทในกระบวนการทางเมตาโบลิซึม ซึ่งถ้ามีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิหรือช่วงแสงไปจากเดิม จะทำให้สิ่งมีชีวิตนั้นมีการปรับโครงสร้างระดับโมเลกุลต่าง ๆ ของไอโซไซม์เพื่อที่จะให้เปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์สามารถควบคุมปฏิกิริยาต่าง ๆ ได้ตามปกติ แสดงว่าการปรับตัวของสิ่งมีชีวิตต่อสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันไปนั้นทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในรูปร่างโมเลกุลของเอ็นไซม์ ทำให้เกิดรูปแบบของไอโซไซม์ที่แตกต่างกันมากมาย McCown, McCown, Beck และ Hall (1970) ได้ทำการเลี้ยงแคลลัสของ Dianthus ภายใต้สภาวะที่แตกต่างกันทั้งอุณหภูมิและแสง พบว่ารูปแบบไอโซไซม์จะแตกต่างกันเนื่องจากเซลล์ต้องการปรับตัวให้เข้ากับสภาวะที่แตกต่างออกไป ดังนั้นในการตรวจสอบสายพันธุ์ของพืชนั้น เพื่อให้การทดลองมีความเชื่อถือได้ ควรปลูกพืชในสภาพแวดล้อมที่ไม่แปรผันมากนัก ควรเพาะในที่มีสภาพแวดล้อมคงที่ และควรเลือกเก็บตัวอย่างที่มีอายุมากพอเพื่อจะได้แถบของไอโซไซม์ที่มีเสถียรภาพมากและมีความเข้มของแถบสูงซึ่งจะทำให้สามารถสังเกตความแตกต่างในพืชแต่ละชนิดได้อย่างชัดเจนยิ่งขึ้น

จากแผนภาพที่ 9 และ 15 ในการศึกษารูปแบบไอโซไซม์จากส่วนลำต้นและส่วนใบภายในต้นเดียวกันของยาสูบทั้ง 2 ชนิด ที่เจริญเต็มที่จากส่วนยอดไปยังส่วนโคนต้น พบว่าไอโซไซม์จากทั้งส่วนลำต้นและใบจะให้ผลคล้ายคลึงกัน กล่าวคือจำนวนแถบและความเข้มของแถบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์จะเพิ่มขึ้นแบบ basipetal คือเพิ่มจากยอดลงไปยังโคนต้น แสดงให้เห็นว่า เปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์มีกิจกรรมเพิ่มขึ้นเมื่อใบและต้นมีอายุมากขึ้น มี

รายงานบางรายงานที่แสดงให้เห็นถึงสาเหตุที่กิจกรรมของเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์สูงขึ้นในยาสูบที่มีพัฒนาการสูงขึ้น เช่น ในส่วนใบนั้น ใบอ่อนมีคะตะเลสเพียงพอสำหรับขจัด H_2O_2 ที่มากเกินไป (ซึ่งอาจทำให้เกิดเป็นพิษกับเซลล์พืชได้) แต่ในใบที่โตเต็มที่ อาจมีเอ็นไซม์นี้ไม่เพียงพอ จึงมีการเพิ่มเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์เพื่อช่วยในการขจัด H_2O_2 ออกไป (Dejong, 1967) นอกจากนี้เปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์อาจใช้เร่งปฏิกิริยาการสร้างรงควัตถุสีน้ำตาล (brown pigment) ในใบที่มีพัฒนาการเต็มที่ก็ได้ (Sheen and Rebagay, 1970) ส่วนในลำต้นที่เริ่มมีพัฒนาการสูงขึ้น ก็จะเกิดกระบวนการ lignification ขึ้นมากกว่าในลำต้นอ่อน ทำให้พบกิจกรรมของเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์สูงขึ้น จะเห็นได้ว่ารูปแบบไอโซไซม์มีความแตกต่างกันไปในต้นพืชแต่ละส่วนตามหน้าที่ทางสรีระวิทยาต่าง ๆ และสภาวะการพัฒนาของพืช (Scandalios, 1974) Birecka, Shih และ Galston (1972) ก็พบการเพิ่มแบบ basipetal ของเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์เช่นกัน ใน pith ของยาสูบจากปล้องที่ตำแหน่งต่าง ๆ บนต้นเดียวกัน ซึ่งข้อต่าง ๆ ก็จะมีขนาดของเซลล์ และความหนาของเซลล์ที่แตกต่างกันด้วย แต่ก็ยังไม่สามารถที่จะบอกถึงความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างของเซลล์และรูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ ในกระถินยักษ์ (Leucaena leucoephala) พบว่าเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ เพิ่มตามอายุที่มากขึ้นเช่นเดียวกัน และจากการศึกษาในรายละเอียด พบว่าเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ของกระถินยักษ์บางแถบ จะแสดงบทบาทสำคัญในการเกิด lignification และ maturation (Frih, 1985) ในข้าวโพดก็พบเช่นเดียวกันนี้ โดย Brewbaker และ Hasegawa (1975) พบว่ามีการเพิ่มของเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ในระหว่างเกิด maturation ของส่วนลำต้นและใบ ทำให้เป็นที่น่าสงสัยว่าไอโซไซม์เหล่านั้นอาจจะมีบทบาทในการเกิด maturation และหน้าที่ส่วนหนึ่งของเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์คือ IAA oxidation และการเกิด lignification ซึ่งกระบวนการเหล่านี้ก็จะเกิดเพิ่มขึ้นระหว่างการเกิด maturation (Dejong, 1972) ดังนั้นจึงเป็นเหตุผลสนับสนุนว่าไอโซไซม์นี้อาจมีบทบาทในการเกิด maturatiion ด้วย

ข้อเสนอแนะ

มีพืชหลายชนิดเมื่อเลี้ยงให้ได้แคลลัสแล้ว ปัญหาที่ตามมา คือ มีอัตราการเกิด regenerated plant ต่ำ เช่นพืชตระกูลถั่ว ข้าวกลุ่ม indica เป็นต้น จากรายงานนี้ทำให้ทราบว่าเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ในกลุ่มเคลื่อนที่เร็วที่มีความเข้มสูงและจำนวนแถบมาก อาจมีความสัมพันธ์กับการเกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นต้นใหม่ของแคลลัสยาสูบ เนื่องจากแคลลัสกลุ่มที่มีเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์กลุ่มเคลื่อนที่เร็ว มีความเข้มสูงและจำนวนแถบมาก จะให้แคลลัสที่เกิดเป็น regenerated plant ในเปอร์เซนต์ที่สูงด้วย ซึ่งถ้าใช้ชนิดของฮอร์โมนและความเข้มข้นที่เหมาะสม ก็อาจสามารถกระตุ้นให้เกิดเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ในกลุ่มเคลื่อนที่เร็ว มีความเข้มสูงและจำนวนแถบมากได้ น่าจะเป็นผลดีต่อการเปลี่ยนแปลงไปเป็นต้นใหม่ของแคลลัส ในการวิจัยนี้พบว่าการใช้ IAA ที่ความเข้มข้น 1.9 มก./ล. กระตุ้นให้เกิดเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ในกลุ่มเคลื่อนที่เร็ว มีความเข้มสูงและจำนวนแถบมาก ซึ่งทำให้แคลลัสยาสูบสามารถที่จะเกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นต้นใหม่มีเปอร์เซนต์สูงกว่าการใช้ 2,4-D ดังนั้นในกรณีของแคลลัสยาสูบ ถ้าต้องการแคลลัสที่มีการเจริญดี และมีเปอร์เซนต์การเปลี่ยนแปลงเป็นต้นสูงควรใช้ IAA มากกว่า 2,4-D หรือถ้าจะจำเป็นต้องใช้ 2,4-D ควรใช้ในความเข้มข้นที่ต่ำกว่าที่ใช้ในการทดลองนี้ หรือใช้ออกซินที่สลายตัวได้ง่ายกว่า 2,4-D ในการชักนำให้เกิดแคลลัส อาจทำให้มีการเกิดเป็นต้นใหม่เพิ่มขึ้น ดังนั้นควรเลือกใช้ชนิดและความเข้มข้นของฮอร์โมนที่เหมาะสม ซึ่งต้องทำการวิจัยทดสอบดูก่อน เนื่องจากพืชแต่ละชนิดมีความต้องการในเรื่องของชนิดและความเข้มข้นของฮอร์โมนในการเปลี่ยนแปลงเป็นต้นใหม่ต่างกัน พร้อมกับทำการตรวจสอบรูปแบบของเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ในกลุ่มเคลื่อนที่เร็วไปด้วย ถ้าชนิดและความเข้มข้นของฮอร์โมนใดทำให้เปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ในกลุ่มเคลื่อนที่เร็วมีความเข้มสูงและมีจำนวนแถบมาก ชนิดและความเข้มข้นของฮอร์โมนนั้นอาจจะช่วยทำให้แคลลัสเกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นต้นให้ได้ในอัตราที่สูงขึ้นก็เป็นได้

ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อในพืชแต่ละชนิดจะให้แคลลัสที่มีลักษณะภายนอกแตกต่างกันไป ซึ่งแคลลัสแต่ละแบบก็จะมีการเจริญและเปอร์เซนต์การเปลี่ยนแปลงเป็นต้นใหม่แตกต่างกันไป ดังนั้นก่อนจะย้ายลงอาหารใหม่ ควรจะคัดเลือกเอาแคลลัสที่มีการเจริญดีและมีเปอร์เซนต์

การเกิดเป็นต้นใหม่สูง (ในกรณีที่ต้องการต้นใหม่จากแคลลัส) ลงในอาหารใหม่และคัดพวกที่มีการเจริญต่ำ และเปอร์เซนต์การเกิดเป็นต้นใหม่ต่ำออกไป เพื่อเป็นการประหยัดเวลา ประหยัดสารเคมี และเนื้อที่ในการย้ายแคลลัสครั้งต่อไป ซึ่งในการคัดเลือกแคลลัสอาจใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมกับความเข้มและจำนวนแถบของเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ในกลุ่มเคลื่อนที่เร็ว ร่วมกันในการพิจารณาแคลลัสที่มีแนวโน้มจะเกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นต้นใหม่ได้ดีกว่าแคลลัสกลุ่มอื่น จากรายงานที่ศึกษาในแคลลัสยาสูบพบว่าแคลลัสที่มีลักษณะการเกาะกลุ่มแน่น ไม่ชุ่มน้ำ สีค่อนข้างเขียว และมีรูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ในกลุ่มเคลื่อนที่เร็วมีความเข้มและจำนวนแถบสูง แคลลัสพวกนี้มีการเจริญที่ดีและมีเปอร์เซนต์การเปลี่ยนแปลงเป็นต้นใหม่สูงกว่าแคลลัสที่มีการเกาะกลุ่มของเซลล์หลวม ชุ่มน้ำ สีของแคลลัสเหลืองออกน้ำตาล และมีเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ในกลุ่มเคลื่อนที่เร็ว มีความเข้มต่ำ และมีจำนวนแถบน้อยซึ่งแคลลัสพวกนี้จะมีการเจริญต่ำ และมีเปอร์เซนต์การเกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นต้นใหม่ต่ำ จึงควรคัดเลือกแคลลัสในกลุ่มแรกย้ายลงไปในอาหารชักนำต้นได้ในเวลาที่เหมาะสมด้วย และคัดแคลลัสในกลุ่มหลังออกไป นอกจากนั้นปริมาณ cation บางตัวในอาหารที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อก็มีความสำคัญต่อการเกิดเป็นต้นใหม่ของแคลลัส เนื่องจาก cation บางตัวเช่น Ca^{2+} หรือ Mg^{2+} มีประสิทธิภาพในการเพิ่มอัตราการปลดปล่อยไอโซไซม์จากเนื้อเยื่อลงในอาหาร ถ้าปริมาณ cation ในสารอาหารมีระดับสูงเกินไป จะทำให้มีการปล่อยเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์จากเนื้อเยื่อลงในอัตราที่สูง เกิดการขาดเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ที่ผนังเซลล์ ซึ่งมีผลต่อการเกิด lignification ซึ่งเป็นกระบวนการสำคัญ ในการเกิดเป็นต้นใหม่ ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาหาปริมาณ cation ที่เหมาะสมต่อการเจริญและการพัฒนาของพืช ซึ่งควรตรวจสอบปริมาณไอโซไซม์ที่ถูกปล่อยลงมาในอาหารร่วมไปด้วย โดยที่สูตรอาหารที่เหมาะสมควรจะทำให้แคลลัสปล่อยไอโซไซม์ลงมาในอาหารมีปริมาณน้อย นอกจากนั้นรูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ สามารถใช้พิสูจน์ชนิดของยาสูบ โดยยาสูบแต่ละชนิดให้รูปแบบไอโซไซม์ที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน ดังนั้นในกรณีที่มีการสับเปลี่ยนขวดขณะทำการเลี้ยงแคลลัสยาสูบ ก็อาจใช้รูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ทำการพิสูจน์ชนิดของแคลลัสยาสูบเพื่อป้องกันความผิดพลาดในการทดลอง

ในการศึกษารูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ โดยใช้เทคนิคทาง electrophoresis มีหลักสำคัญ คือ 1. การเลือกตัวอย่าง และ 2. การเลือก extract buffer ที่เหมาะสมกับชนิดของตัวอย่าง ในการเลือกตัวอย่างพืชที่นำมาใช้สกัดไอโซไซม์ ควรเลือกส่วนของพืชที่เก็บได้ง่าย สะดวก และมีให้เก็บได้ตลอด เช่น ส่วนของใบ ซึ่งสามารถเก็บตัวอย่างได้ตลอดทั้งปี และเก็บรักษาได้ง่าย จากรายงานนี้ทำให้ทราบว่าภายในต้นเดียวกันและในอวัยวะเดียวกันก็จะให้รูปแบบเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ไม่คงที่ โดยเฉพาะในส่วนอ่อน แต่จะคงที่ขึ้นในส่วนที่มีอายุมากขึ้น ดังนั้นการเก็บตัวอย่าง เพื่อประโยชน์ในการตรวจสอบชนิดของพืช ก็ควรเลือกเก็บส่วนที่ค่อนข้างมีอายุมาก เพื่อจะได้แถบไอโซไซม์ที่มีจำนวนและความเข้มคงที่แถบสีแยกกันชัดเจน และสามารถแยกความแตกต่างของพืชชนิดต่าง ๆ ได้ และตัวอย่างทั้งหมดควรจะอยู่ในช่วง developmental stage เดียวกัน (ยกเว้นในกรณีที่ต้องการศึกษา developmental study) และควรเลือกตัวอย่างที่มีสภาพแวดล้อมไม่แตกต่างกันมากนัก เพราะสภาพแวดล้อมอาจมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงในรูปแบบไอโซไซม์ ซึ่งอาจทำให้การตรวจสอบชนิดของพืชคลาดเคลื่อนได้

เมื่อเลือกตัวอย่างที่ต้องการได้แล้ว ต้องเลือกใช้ extract buffer ให้เหมาะสมกับตัวอย่างที่ใช้ด้วยซึ่งในห้องปฏิบัติการชีวเคมี ฝ่ายวนวัฒนวิจัย กรมป่าไม้ ปี 2530 มี extract buffer ที่ต่างกัน 8 สูตร ซึ่งแต่ละสูตรมีส่วนผสมที่แตกต่างกันไป ดังในภาคผนวก ข. ดังนั้นตัวอย่างที่นำมาศึกษา ต้องทดสอบกับ extract buffer ทั้ง 8 สูตรนั้นก่อน เพื่อดูว่าสูตรไหนเหมาะสม โดยการเปรียบเทียบแถบสีที่ได้จาก extract ทั้ง 8สูตรนั้นว่า extract buffer สูตรใดให้แถบสีไอโซไซม์ที่คมชัด แยกแถบได้ชัดเจน มีจำนวนแถบให้เห็นมากที่สุด ก็เลือก extract buffer ที่มีส่วนผสมนั้นใช้กับตัวอย่างที่ต้องการศึกษาในการทดสอบกับยาสูบ 2 ชนิด คือ N. tabacum ใช้ extract buffer สูตร C และ N. rustica ใช้ extract buffer สูตร d ถ้าตัวอย่างที่ใช้เปลี่ยนไป เช่น ใช้พืชคนละชนิด ก็จะใช้ extract buffer ต่างกันไปอีก ต้องทำการทดสอบก่อนทุกครั้ง