การเจริญเติบโตและปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและพัฒนาของเนื้อเยื่อ

การพัฒนาไปเป็นต้นพืช จะผ่านการพัฒนาอยู่ 2 วิถีทางคือ

1. ออร์แกนโนเจเนซิส (organogenesis) คือ การพัฒนาเป็นอวัยวะ ปกติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมักได้แคลลัส จากแคลลัสที่ได้ถ้ามีการสร้างอวัยวะขึ้นมา เช่น ราก ลำต้น ใบ หรือดอก เรียกว่า เกิดออร์แกนโนเจเนซิส การเกิดยอดและรากค่อนข้างง่ายกว่าอวัยวะอย่างอื่น ด้วยเหตุผลสองประการ คือ

1. ชิ้นส่วนพืชที่เอามาเลี้ยงเกิด เกิดการปลี่ยนแปลงกลับไปเป็นเนื้อเยื่อเจริญใหม่มีไซโทพลาสซึมเข้มข้นนิวเคลียสใหญ่เห็นได้ชัด

2. ในชิ้นส่วนพืชที่เพาะเลี้ยงมีจุดกำเนิดของยอดและรากอยู่แล้ว เช่น เอาข้อมาเลี้ยงตรงข้อมีตา เพราะฉะนั้นข้อจะเจริญให้ยอด ถ้าเอาปล้องมาเลี้ยงจะได้แคลลัส อวัยวะที่เกิดใหม่มีเนื้อเยื่อลำเลียงติดต่อกับชิ้นส่วนพืชที่เอามาเลี้ยงเซลล์เริ่มต้น ในการเกิดอวัยวะนั้นมีเพียงไม่กี่เซลล์ที่เกี่ยวข้อง อาจเจริญมาจากเซลล์เพียงเซลล์เดียว โดยที่หนึ่งเซลล์นั้นมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นส่วนต่าง ๆ เช่น ราก ยอด ใบ หรือเจริญมาจากกลุ่มเซลล์ข้างเคียงกัน โดยที่กลุ่มเซลล์เหล่านั้นมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นส่วนต่าง ๆ กระบวนการเกิดอวัยวะเหล่านี้เกิดไม่พร้อมกัน ทำให้บางครั้งไม่สามารถเดาได้ ปี ค.ศ. 1957 Skoog และ Miller แสดงให้เห็นว่าอัตราส่วนของออกซินและ ไซโทไคนินมีความสำคัญต่อการเกิดรากและยอดในแคลลัสยาสูบ คือ ถ้าอัตราส่วนของไซโทไคนินต่อออกซินต่ำกว่าระดับปกติของการเจริญของแคลลัสจะทำให้เกิดราก ถ้าอัตราส่วนเหมาะสมเกิดการแบ่งเซลล์ได้แคลลัสเรื่อย ๆ ถ้าอัตราส่วนสูงกว่าปกติทำให้เกิดยอด โดยทั่วไปการชักนำให้เกิดอวัยวะจากแคลลัส พบว่า รากเกิดได้ง่ายกว่าการเกิดยอด ราก จะเกิดในอาหารที่มีออกซินสูงและไซโทไคนินต่ำ และการชักนำให้เกิดรากมีต้องการปริมาณออกซินที่สูงกว่าการใช้ในการเจริญของราก การเกิดรากและยอดมักเกิดเป็นอิสระต่อกัน โดยมากรากมักเกิดตรงผิวแคลลัส เรียกว่าเป็น เอกโซจีนัสออริจิน (exogenous origin) นอกจากนี้ยังเป็นโมโนโพลาออร์แกน (monopolar organ) คือ เกิดเป็นรากหรือยอดอย่างใดอย่างหนึ่ง โครงสร้างภายในเหมือนรากที่เกิดตามธรรมชาติ กล่าวคือ มีเนื้อเยื่อเจริญและหมวกรากอยู่ที่ปลาย และตรงกลางของรากเป็นเนื้อเยื่อลำเลียงยอดเป็นอวัยวะที่เกิดง่ายรองจากราก จัดว่าเป็นโมโนโพลาออร์แกนเช่นกันปกติการเกิดรากและยอดจะเกิดขึ้นเมื่อใช้อาหารเพาะเลี้ยงต่างกัน แต่ไม่แน่นอนเสมอไป ขึ้นกับอัตราส่วนระหว่างออกซินและไซโทไคนิน การเกิดยอดจากแคลลัสนั้นเกิดได้ในอาหารที่มีออกซินต่ำและ ไซโทไคนินสูง BAP เป็นไซโทไคนินที่ให้ผลดีที่สุดตัวหนึ่งในการชักนำให้เกิดยอด การชักนำให้เกิดยอดจากแคลลัสนั้นมีปัจจัยอื่น ๆ เข้ามาเกี่ยวข้องมาก ในบางกรณีเกลือความเข้มข้นสูงสามารถชักนำการเกิดยอดได้ นอกจากนี้พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของแอมโมเนียมเสริมการเกิด ออร์แกโนเจนเนซิส และ พบว่ากระแสไฟฟ้าขนาด 1-2 ไมโครแอมแปร์กระตุ้นการเกิดยอดถึง 5 เท่าในยาสูบ และไม่เพียงมีการเจริญของยอดเท่านั้น การเจริญของรากถูกกระตุ้นโดยกระแสไฟฟ้าเช่นกัน ส่วนการเกิดดอกทำได้ยากจากการเพาะเลี้ยงก้านช่อดอกยาสูบและทำให้เป็นสภาวะวันสั้นพบว่าก้านช่อดอกนี้ออกดอกได้ และช่อดอกตรงปลายออกง่ายกว่าตรงโคน นอกจากช่วงแสงจะเป็นปัจจัยช่วยการออกดอกแล้ว ยังพบว่าความเยาว์วัย (vernalization) ช่วยในการออกดอกเช่นกัน เช่น เก็บส่วนต้นของ Cichorium intylous และ Lunaria annua ในตู้เย็นนาน 4 เดือน แล้วนำมาเพาะเลี้ยงปรากฏว่ามีดอกได้

2. เอ็มบริโอเจเนซิส (embryogenesis) คือ การพัฒนาเป็นต้นอ่อน เอ็มบริโอเจเนซิสหรือโซมาติกเอ็มบริโอเจเนซิสคือ การเกิดเอ็มบริโอจากเซลล์หรือเนื้อเยื่อร่างกาย เป็นคำตรงกันข้ามกับ zygotic embryogenesis ที่ได้จากการปฏิสนธิของเซลล์ไข่ในหนังสือแต่ละเล่มอาจใช้คำต่าง ๆ แทนโซมาติกเอ็มบริโอได้ เช่น embryoid, adventitious embryo, vegetative embryos, embryo-like structure และ กระบวนการที่เกิดอาจเรียกได้หลายชื่อ เช่น adventitious embryogenesis, asexual embryogenesis เป็นต้น ซึ่งมีการพัฒนาเป็นขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้ คือ จากเอ็มบริโอเปลี่ยนเป็นรูปกลม รูปหัวใจ รูปตอร์ปิโต และต้นกล้า ตามลำดับ โดยพบการเกิดเอ็มบริ

ออยด์เป็นครั้งแรกจากแคลลัสและเซลล์แขวนลอยของแครอท โดยพบว่าแคลลัสแครอทแสดงการเปลี่ยนสภาพเมื่อย้ายจากอาหารที่มีน้ำมะพร้าวไปยังอาหารสังเคราะห์ที่มีกรดอะมิโน วิตามิน และสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช เมื่อย้ายครั้งที่สองไปยังอาหารที่มีออกซินความเข้มข้นต่ำจะได้ต้นเล็ก ๆ จำนวนมากซึ่งก็คือ เอ็มบิรออยด์ เมื่อศึกษาเอ็มบริออยด์ระหว่างการเพาะเลี้ยงด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่าเป็นไบโพลาออร์แกน (bipolar organ) คือ มีด้านหนึ่งเจริญเป็นรากอีกด้านเจริญเป็นต้น การพบครั้งแรก ๆ นี้คิดว่าเป็นกรณียกเว้น แต่จากการทดลองในเวลาต่อมาพบว่าทำให้เกิดปรากฏการณ์เช่นนี้ได้ ดังเช่นการทดลองเลี้ยงเซลล์แขวนลอยในอาหารที่มีน้ำมะพร้าว พบว่าเซลล์เดี่ยวกลายเป็นเอ็มบิรออยด์ได้ และรูปแบบการเจริญของเอ็มบิรออยด์ในหลอดทดลองเหมือนกับ ไซโกติกเอ็มบริโอ เมื่อย้ายเอ็มบิรออยด์เหล่านี้ไปยังอาหารจะได้ต้นสมบูรณ์ขึ้นมา ต่อมาพบว่าไม่เฉพาะแต่เพียงน้ำมะพร้าวเท่านั้น สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่สังเคราะห์ขึ้นมาบางตัวก็ให้ผลเช่นกัน เช่น Halperins ทำให้เกิดเอ็มบริออยด์ได้โดยไม่ต้องอาศัยน้ำมะพร้าว โดยใช้ สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชและไนโตรเจนในความเข้มข้นระดับต่าง ๆ แทนการเกิดเอ็มบริออยด์ไม่จัดว่าเป็นออร์แกโนเจเนซิส ทั้งนี้เพราะเอ็มบริออยด์ที่ได้ไม่มีการต่อเชื่อมของเนื้อเยื่อลำเลียงติดกับชิ้นส่วนพืชที่เอามาเลี้ยงเลย เนื่องจากเอ็มบริออยด์ มีจุดกำเนิดมาจากเซลล์ร่างกาย ไม่ได้เกิดจากการผสมเกสร ดังนั้นการเจริญของเอ็มบริออยด์ มีจุดกำเนิดมาจากเซลล์ร่างกาย ไม่ได้เกิดจากการผสมเกสร ดังนั้นการเจริญของเอ็มบริออยด์จะไม่มีโครงสร้างที่เรียกว่า true suspensor เหมือนอย่างในเอ็มบริออยด์ เมื่อนำเซลล์ที่มีการเปลี่ยนแปลงเป็นเอ็มบริออยด์มาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่ามีออร์แกเนลล์ต่าง ๆ มากมายใน ไซโทพลาสซึมทำให้ดูทึบ มีเม็ดแป้ง นิวเคลียสขนาดใหญ่ และเห็นนิวคลีโอลัสย้อมติดสีชัดเจน จากการย้อมสีทำให้ทราบว่ามีโปรตีนและอาร์เอ็นเอในปริมาณสูง การเจริญของเอ็มบริออยด์อาจถูกขัดขวางได้โดยความสมดุลของสารเคมีในอาหารทำให้เกิดความผิดปกติที่เรียกว่า embryonal budding และ embryogenic clump ขึ้นมา

การเปลี่ยนสภาพของเอ็มบริออยด์เกิดได้ 2 แบบ คือ

1. ทางตรง ในกรณีนี้เอ็มบริออยด์เกิดขึ้นโดยตรงจากเซลล์หรือเนื้อเยื่อ โดยไม่ผ่านขั้นตอนการเกิดแคลลัส เซลล์ที่ให้การเจริญเป็นเอ็มบริออยด์เกิดขึ้น เรียกว่า pre-embryonic determined cells (PEDC)ตัวอย่างได้แก่ ส้ม

2. ทางอ้อม การเกิดเอ็มบริออยด์แบบนี้มาจากแคลลัส แคลลัสที่มีเอ็มบริออยด์เกิดขึ้นเรียกว่า embryogenically determined cells ซึ่งจะเกิดเอ็มบริออยด์ต่อเมื่อถูกชักนำโดยปัจจัยต่าง ๆ เรียกเซลล์ที่เกิดเอ็มบริออยด์แบบนี้อีกชื่อหนึ่งว่า induced embryogenically determined cells (IEDC) พบว่า การเกิดเอ็มบริออยด์แบบนี้เซลล์จะเกิดการเปลี่ยนแปลงก่อน และหลังจากเกิดการแบ่งเซลล์แล้วก็กลับเป็นเอ็มบริโอเจนนิกใหม่ บางครั้งออกซินและไซโทไคนินมีผลต่อการเกิดขบวนการนี้ ตัวอย่างได้แก่ แครอท กาแฟ หน่อไม้ฝรั่ง

การพัฒนาของเอ็มบริโอจากการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง

1. การพัฒนาของเอ็มบริโอจากไข่ที่ได้รับการผสมหรือไซโกต โดยเริ่มจากไซโกต แบ่งตัวออกเป็น 2 เซลล์ ที่มีขนาดไม่เท่ากัน เซลล์ที่มีขนาดเล็ก เรียกว่า apical cell ซึ่งอยู่ทางด้านบน ส่วนเซลล์ที่มีขนาดใหญ่กว่าอยู่ทางด้านล่าง เรียกว่า basal cell ส่วนที่จะพัฒนาเป็นเอ็มบริโอ ก็คือ ส่วนของ apical cell ซึ่งจะแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์มากขึ้นเรื่อย ๆ จนมีลักษณะเป็นก้อนกลม และเรียกระยะนี้ว่า ระยะ globular-shaped ต่อจากนั้นก็จะเปลี่ยนเป็นรูปหัวใจ จึงเรียกระยะนี้ว่า ระยะ heart-shaped จนสุดท้ายเมื่อเอ็มบริโอพัฒนาเจริญเต็มที่จะมีรูปร่างเหมือนตอร์ปิโต จึงเรียกระยะนี้ว่า torpedo-shaped ส่วนของ basal cell จะแบ่งตัวทางด้านขนาน (periclinal division)เท่านั้น จะได้เป็นเซลล์แถวยาว ที่เรียกว่า suspensor ซึ่งทำหน้าที่ช่วยยึดตัวเอ็มบริโอให้ฝังอยู่ใน mucellus และช่วยดูดซึมอาหารให้แก่เอ็มบริโอ เซลล์ที่อยู่ตรงรอยต่อระหว่างตัวเอ็มบริโอกับ suspensor เรียกว่า hypolysis cell ซึ่งทำหน้าเป็นจุดกำเนิดของราก (radicle) เมื่อเอ็มบริโอพัฒนาเจริญเต็มที่แล้ว ส่วนของ suspensor ก็จะหมดหน้าที่และ สลายตัวไป

2. การพัฒนาของเอ็มบริโอที่ได้จากเนื้อเยื่อของแคลลัส เริ่มจากเซลล์บางเซลล์ในก้อนของแคลลัสที่มีความตื่นตัวมากกว่าเซลล์อื่น ๆ สังเกตได้จาการทดสอบด้วยสีย้อม ซึ่งจะติด สีเข้มกว่าเซลล์อื่น ๆ และเมื่อตัดผ่านเซลล์และตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่า เซลล์เหล่านั้นมีไซโตพลาสซึมที่เข้มข้นและมีออร์แกนเนลหนาแน่น เซลล์ดังกล่าวนี้จะแบ่งตัวเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็วจนได้เป็นกลุ่ม และปูดยื่นออกมามีลักษณะคล้ายระยะ globular-shaped ต่อมาก็พัฒนาเป็นระยะ heart-shaped และ torpedo-sphaped

3. การพัฒนาของเอ็มบริโอจากเซลล์ผิว (epidermis cell) เซลล์ผิวของพืชจะพบได้ที่ใบ ก้านใบ และลำต้นที่ยังอ่อนอยู่ แต่เซลล์ผิวที่นิยมนำมาทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใหญ่ จะใช้จากส่วนของใบ เพราะใบมีลักษณะเป็นแผ่นบาง มีพื้นที่ผิวมาก มีเซลล์ผิวทั้งด้านบน (upper epidermis) และด้านล่าง (lower epidermis) การพัฒนาของเอ็มบริโอจะเริ่มจากเซลล์บางเซลล์จากเซลล์ผิว มีการตื่นตัว เปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์เจริญ ซึ่งมีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็ว ในขณะที่เซลล์อื่น ๆ ข้างเคียงไม่มีการแบ่งตัว จนต่อมาก็จะเกิดเป็นลักษณะ globular-shaped และพัฒนาต่อไปเป็น heart-shaped จนในที่สุดก็เป็นเอ็มบริโอที่สมบูรณ์ รูปร่างแบบ torpedo-shaped อนึ่งจากการศึกษาการพัฒนาของเอ็มบริโอจีนีซิสของแผ่นใบ พบว่า นอกจาก เซลล์ชั้นผิวแล้ว เซลล์ชั้นอื่น ๆ คือ palisade cell และ spongy cell ก็สามารถที่จะชักนำให้เกิดเอ็มบริโอจีนีซิสได้เหมือนกัน

4. การพัฒนาของเอ็มบริโอจากการเลี้ยงเซลล์เดี่ยว (single cell culture) เซลล์เดี่ยวอาจได้มาจากการย่อยเนื้อเยื่อด้วยเอ็มไซม์ (pectinase enzyme) หรือได้จากการแยกเซลล์จากแคลลัส การเพาะเลี้ยงกระทำในอาหารเหลวจึงเรียกวิธีการเลี้ยงเซลล์แบบนี้ว่าการเลี้ยงเซลล์แขวนลอย การพัฒนาของเอ็มบริโอเริ่มจากเซลล์เดี่ยว ๆ แบ่งตัวออกเป็น 2, 4 เซลล์ และทวีคูณไปเรื่อย ๆ จนได้เป็นกลุ่มเซลล์ ต่อมาพัฒนาเป็นก้อนกลม ๆ (globular-shaped) เจริญต่อไปเป็น heart-shaped และ torpedo-shaped ในที่สุด

ข้อแตกต่างระหว่าง organogenesis และ embryogenesis มีดังนี้คือ

1. การเชื่อมต่อระหว่างยอดและราก (shoot-root connection) ในการเกิดออร์แกนโนเจเนซิสนั้นการเกิดยอดและรากจะเป็นอิสระต่อกัน คือ การเกิดยอดและรากอาจจะไม่ติดต่อกันก็ได้ รากอาจจะเกิดจากบริเวณหนึ่ง ส่วนยอดจะเกิดอีก บริเวณหนึ่ง แม้บนแคลลัสก้อนเดียวกัน แต่ในบางครั้งอาจจะพบว่า เนื้อเยื่อที่เกิดยอดและรากอยู่ใกล้กันอาจจะเจริญติดกันได้ หรือเนื้อเยื่อส่วนยอดด้านโคน อาจจะสามารถเกิดรากขึ้นมาจนเกิดเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้ ส่วนในเอ็มบริโอเจเนซิสส่วนยอดและรากจะต้องติดต่อกัน เนื่องจากพัฒนามาจากเซลล์ ๆ เดียวกัน

2. Polarity การเกิดยอดหรือรากในแคลลัสนั้น ขึ้นอยู่กับปัจจัยภายนอกหรือสิ่งที่จะมากระตุ้นให้เกิดเป็น meristematic cell และ meristematic cell เหล่านี้จะพัฒนาไปเป็นยอดหรือรากก็ได้ ดังนั้นจึงเชื่อว่า polarity ของออร์แกนโนเจเนซิส เสียไป หรือ ไม่มี polarity ส่วนใน เอ็มบริโอเจเนซิสนั้นจะมี polarity ซึ่งเป็นแบบ bipolar เนื่องจากการพัฒนาจากเซลล์ ๆ เดียวเป็นกลุ่มเซลล์ขึ้น ด้านหนึ่งของกลุ่มเซลล์เหล่านี้จะพัฒนาไปเป็นยอดเจริญขึ้นไปบนอากาศอีกด้านหนึ่งพัฒนาเป็นราก เจริญลงสู่แนวดิ่ง เหมือนต้นพืชที่เจริญทั่ว ๆ ไป

3. การเชื่อมต่อระหว่างท่อน้ำท่ออาหาร (Vascular bundle connection) ท่อน้ำท่ออาหารของยอดและรากในขบวนการออร์แกนโนเจเนซิสอาจจะต่อหรือไม่ต่อกันก็ได้ แต่โดยทั่ว ๆ ไป มักจะต่อถึงกัน โดยจะต่อผ่านเนื้อเยื่อเดิม แต่ในขบวนการเอ็มบริโอเจเนซิส ท่อน้ำและท่ออาหารของยอดและรากจะเชื่อมต่อกัน

การพัฒนาของแคลลัส

การพัฒนาไปเป็นยอดและ/หรือรากของแคลลัส อาจจะผ่านขบวนการ ออร์แกนโนเจเนซิส หรือ เอ็มบริโอเจเนซิส ก็ได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับลักษณะของเซลล์ เช่น ถ้าหากเกาะตัวเป็นกลุ่ม การพัฒนาไปเป็นต้นและ/หรือรากจะผ่านขบวนการออร์แกนโนเจเนซิส ถ้าเป็นเซลล์เดี่ยว การพัฒนาไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์จะผ่านขบวนการเอ็มบริโอเจเนซิสคล้ายกับ เอ็มบริโอ จึงเรียกว่า somatic embryogenesis

การกำหนดการพัฒนาของแคลลัส (Determination in Callus)

แคลลัสเป็นกลุ่มเซลล์ที่สามารถชักนำให้เจริญเติบโตได้จากหลาย ๆ ทาง ขึ้นกับสารควบคุมการเจริญเติบโตและสารเคมีอื่น ๆ ที่เติมลงในอาหาร พืชหลายชนิดโดยเฉพาะยาสูบสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสจากการเปลี่ยนแปลงพัฒนาของราก และ/หรือ ลำต้น ขึ้นกับสัดส่วนของออกซินต่อไซโตไคนิน แคลลัสบางชนิดกลับไม่เป็นเช่นนี้เพราะไม่มีการตอบสนองเชื่อกันว่าการที่เซลล์มีความสามารถแรกเริ่มที่จะเปลี่ยนแปลงไปได้เป็นสิ่งจำเป็นอันดับแรก และอาจต้องมีการจัดสภาพเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส จากนั้นเซลล์จะมีความสามารถ (competent) ที่จะเปลี่ยนแปลงการพัฒนาหรือกำเนิดพัฒนาการอื่น ๆ กล่าวได้ว่าเซลล์มีความพร้อมและมีการกำหนดพัฒนาแล้ว กระบวนการทั้งสองนี้จำแนกได้จากเซลล์ที่มีขั้นตอนการพัฒนาอย่างใหม่เกิดขึ้น แต่ไม่ใช่แปลกแยกออกมาจากขั้นตอนการพัฒนาเดิมที่เป็นอยู่ แคลลัสของพืชบางชนิดการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการเหล่านี้สามารถชักนำและทดสอบได้ ตัวอย่างเช่น แคลลัสของถั่วอัลฟัลฟา(Medicago sative) มีการเจริญเติบโตอย่างต่อเนื่อง และยังคงสภาพเป็นแคลลัสต่อไปเมื่อเลี้ยงในอาหารที่เติม 2,4-D และไคเนตินแต่เมื่อย้ายไปไว้ในอาหารที่ปราศจากสารกระตุ้นการเจริญเติบโตแล้วจะมีการเปลี่ยนแปลงและกำเนิดเป็นรากหรือลำต้น ทั้งนี้ขึ้นกับสัดส่วนของออกซินและไซโตไคนินที่ได้รับมาก่อน ถ้าได้รับสัดส่วนที่มีค่าสูง (ออกซิน > ไซโตไคนิน) มักเกิดเป็นยอด แต่ถ้ามีค่าต่ำ (ออกซิน < ไซโตไคนิน) มักเกิดเป็นราก การทำ pre-tretmentโดยการเลี้ยงในอาหารชักนำการเกิดแคลลัส (induction medium) เป็นเวลา 3 - 4 วัน ก่อนย้ายไปไว้ในอาหารที่ปราศจาก สารควบคุมการเจริญเติบโตต้องใช้ระยะเวลาที่พอเหมาะ เพราะถ้านานเกินไปจะไปยับยั้งไม่ให้มีการเปลี่ยนแปลงพัฒนาเพื่อกำเนิดอวัยวะ การตอบสนองมากที่สุดพบในกรณีใช้ชิ้นส่วนแคลลัสขนาดใหญ่ (ประมาณ 200 - 800 mm)อย่างไรก็ตามการชักนำการเกิดแคลลัสเองเกิดขึ้นมากในชิ้นส่วนขนาดใหญ่ที่มีนำมาเลี้ยงซึ่งต่อมาจะถูกแยกและเลี้ยงในจานหรือขวดแยกกันเพื่อตรวจสอบความสามารถในการกำเนิดเป็นอวัยวะ ดังนั้น ในทางปฏิบัติจะทราบแต่เพียงผลสุดท้ายของตอบสนอง ว่าต้องใช้แคลลัสที่ควรมีจำนวนเซลล์ไม่ต่ำกว่า 12 เซลล์ (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 105 mmเป็นอย่างน้อย) การศึกษาดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า

1. แคลลัสมีความสามารถ (competent) ตอบสองต่อการชักนำของออกซิน และ ไซโตไคนิน
2. มีการชักนำเกิดเป็นอวัยวะ ซึ่งชี้ว่าเซลล์มีการกำหนดพัฒนาเกิดขึ้นขณะทำ pre-treatment ก่อนที่จะสร้างอวัยวะนั้นๆ และต้องการสภาพเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกันไป
3. ความสามารถในการตอบสนองของเซลล์ ขึ้นกับขนาดของแคลลัสที่มีจำนวนเซลล์ที่เหมาะสมดังนั้นแคลลัสนั้นมีลักษณะที่ไม่มีการกำหนดพัฒนา และสามารถพัฒนาไปเป็นราก ลำต้น หรือพืชทั้งต้นได้ ขณะเดียวกันก็มีแคลลัสบางชนิดที่มีการกำหนดพัฒนาไว้แล้วว่าจะมี การสร้างเป็นส่วนต่าง ๆ ของพืชที่สมบูรณ์ครบถ้วนได้ด้วยเช่นกันแคลลัสในกรณีที่มีการกำหนดพัฒนา (Callus as Determined Cells) แม้ว่าการกำหนดพัฒนาของเซลล์เป็นสิ่งจำเป็นในการกำเนิดเป็นโครงสร้างต่าง ๆ ก็ตาม การทดลองโดยใช้แคลลัสชี้ว่าการกำหนดพัฒนาเกิดขึ้นได้ในเซลล์ที่ยังไม่มีการพัฒนาเป็นอวัยวะ ในรากปม (crown gall) ซึ่งเซลล์จะอยู่เป็นกลุ่มคล้ายแคลลัส และไม่มีการพัฒนาเป็นอย่างอื่น หรือในกรณีเกิดสภาพเป็นกระบวนการที่แคลลัสซึ่งปกติต้องการ สารควบคุมการเจริญเติบโตบางอย่างที่จำเพาะกลับไม่ต้องการสารดังกล่าว หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งเป็นอิสระต่อสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ได้รับจากภายนอก จึงสามารถเจริญเติบโตต่อไปได้แม้จะไม่ได้รับสารเหล่านั้นก็ตาม ลักษณะดังกล่าวเท่าที่พบคือ ในกรณีออกซินและไซโตไคนิน สำหรับสารอื่น ๆ โดยปกติไม่จำเป็นต้องเติมลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงแม้ในบางกรณีอาจจำเป็นต้องเติมลงไปเพื่อยับยั้งการเกิดอวัยวะ หรือไปกระตุ้นการเจริญเติบโตของคัพภะเซลล์ที่ไม่ต้องการสารควบคุมการเจริญเติบโตดังกล่าวสามารถชักนำให้เกิดได้ แต่ความต้องการเฉพาะเซลล์ที่ได้จากลูกผสมที่มีการสร้างรากปมจะเจริญเติบโตในอาหารที่ไม่ต้องเติมสารควบคุม การเจริญเติบโต จึงกล่าวได้ว่ามีความสามารถเกิดรากปมได้เองแคลลัสที่สามารถสังเคราะห์ออกซินและไซโตไคนินได้เองพบได้ในพืชหลายชนิดการกำหนดพัฒนาของแคลลัสเพื่อกำเนิดคัพภะ(Determination in Callus : Embryogenesis) การสร้างคัพภะจากเซลล์ร่างขณะเพาะเลี้ยง

(somatic embryo หรือนิยมเรียกว่า embryoids เพื่อให้ต่างจากzygotic embryos ที่เกิดจากการปฏิสนธิของเซลล์เพศ) เกิดขึ้นได้ในแคลลัสบางชนิดเท่านั้นกล่าวคือ เฉพาะแคลลัสและบางเซลล์เท่านั้นที่มีความสามารถสร้างคัพภะโดยไม่ต้องผ่านกระบวนการสร้างเซลล์เพศมารวมกันตามปกติ การกำเนิดคัพภะในกรณีนี้เกิดโดยตรงจากเซลล์ที่มีความพร้อมซึ่งเรียกว่า pre-embryonic determined cells(PEDC)เมื่อเซลล์เหล่านี้เกิด dedifferentiation และเพิ่มจำนวนเป็นแคลลัสก่อนที่จะมีสภาพเป็น PEDC เรียกเซลล์เหล่านี้ว่า induced embryogenic determined cell (IEDC) สมมติฐานที่เกี่ยวข้องคือ PEDCนั้นมีความสามารถในการเกิดคัพภะและต้องการสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมเพื่อการกำหนดพัฒนาไปเป็นเซลล์คัพภะ ขณะที่ IEDC นั้นต้องการชักนำให้มีความสามารถเสียก่อนที่จะเริ่มมีการกำหนดพัฒนาเป็นเซลล์คัพภะ เซลล์ PEDC นั้นรวมไปถึงแคลลัสที่สามารถสร้างคัพภะได้โดยตรง เช่นกรณีของ epidermis cells ของ Ranunculus celeratus และ nucellar cells ของผลส้ม (citrus) ซึ่งสามารถสร้างคัพภะได้โดยไม่ต้องใช้เพศ ข้อสังเกตที่พบเสมอคือ แคลลัสที่มีสภาพเป็นเซลล์คัพภะนั้นแรกสุดต้องได้รับออกซินสังเคราะห์ 2,4-D จากนั้นจึงย้ายไปไว้ในอาหารที่ปราศจาก 2,4-D จะชักนำให้เกิดคัพภะได้ แคลลัสดังกล่าวเชื่อว่าเป็น IEDC และการได้รับ 2,4-D ทำให้เกิดความสามารถพัฒนาเป็นคัพภะเมื่อย้ายสูงอาหารที่แตกต่างไปจากเดิม แคลลัสที่เลี้ยงจาใบถั่วอัฟฟัลฟา (Medicago sp.) และ Convolvulus sp. พบว่าความสามารถในการกำเนิด คัพภะ ถูกชักนำในอาหารชนิดหนึ่ง และการกำเนิดอวัยวะ จะเกิดขึ้นในอาหารอีกชนิดหนึ่ง

ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและพัฒนาของเนื้อเยื่อ

1. ปัจจัยทางด้านเคมี ธาตุอาหาร พืชแต่ละชนิดหรือแต่ละอวัยวะต้องการอาหารที่แตกต่างกันทั้งชนิดและปริมาณ ฉะนั้นจึงมีความจำเป็นในการเลือกสูตรอาหารให้เหมาะสมกับพืชที่จะทำการเพาะเลี้ยง ซึ่งผู้คิดค้นไว้มากมายหลายสูตร ต่อไปนี้จะขอกล่าวถึงธาตุอาหารบางตัวที่มีบทบาทอย่างสำคัญใน การชักนำให้เกิดเอ็มบริโอเจเนซิสเพื่อเป็นแนวทางในการปรับใช้ควบคู่ไปกับการเลือกสูตรอาหาร

- ธาตุโพแทสเซียม (K) ช่วยส่งเสริมให้เกิดเอ็มบริโอเจเนซิส
- การลดปริมาณของไนโตรเจน(N)ให้ต่ำกว่าระดับปกติในสูตรอาหารช่วยส่งเสริมให้เกิดเอ็มบริโอเจเนซิสดีขึ้น
- น้ำมะพร้าวส่งเสริมการเกิดเอ็มบริโอเจเนซิส
- น้ำตาลแซคคาโรส (saccharose) ที่ระดับความเข้มข้น 2 - 3 % ช่วยส่งเสริมให้เกิดเอ็มบริโอเจเนซิส
- ธาตุแคลเซียม (Ca) ในปริมาณสูง จะยับยั้งการเกิดเอ็มบริโอเจเนซิส สารควบคุมการเจริญเติบโต(plant growth regulators) ซึ่งมีทั้งส่งเสริมและยับยั้งในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชส่วนควบคุมการเจริญเติบโตมีความสำคัญอย่างยิ่งเพื่อเป็นแนวทางในการเลือกใช้ที่มีผลต่อการชักนำให้เกิดเอ็มบริโอเจเนซิส
- 2,4-D มีความสำคัญในการชักนำให้เกิดเอ็มบริโอเจเนซิส
- จิบเบอเรลลิค แอซิด ยับยั้งการเกิดเอ็มบริโอเจเนซิส
- 7 aza-indole เป็นสารที่ยับยั้งการสังเคราะห์ออกซิน จึงมีผลในด้านยับยั้งต่อเอ็มบริโอเจเนซิส
- เอททีลีน ยับยั้งการเกาะกลุ่มของเซลล์ในระยะเริ่มแรก
- BAP, IAA, IBA และไคนีติน ยับยั้งเอ็มบริโอเจเนซิส
- เซอิติน และ ALAR (succinic acid 2,7-methyl-hydrazide) ส่งเสริมการเกิดเอ็มบริโอเจเนซิส

2. ปัจจัยทางด้านพืช ลักษณะทางพันธุกรรม (genetic factor) การเจริญและพัฒนาไปเป็นและ/หรือราก ของพืชแต่ละชนิดจะมีความสามารถเจริญและพัฒนาได้ไม่เหมือนกัน พืชบางชนิดสามารถเจริญและพัฒนาไปเป็นต้นและ/หรือรากได้ง่าย บางชนิดก็ยาก แม้ว่าได้เลี้ยงบนหรือในอาหารที่เหมาะสมแล้วก็ตาม พืชบางชนิดการเจริญและพัฒนาไปเป็นต้นและ/หรือราก โดยผ่านขบวนออร์แกนโนเจเนซิสบางชนิดก็ผ่านขบวนการ เอ็มบริโอเจเนซิส เช่นการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของยาสูบจะพัฒนาเป็นต้นยาสูบที่สมบูรณ์ได้โดยการพัฒนาผ่านออร์แกนโนเจเนซิสในขณะที่แครอทจะผ่าน เอ็มบริโอเจเนซิส ส่วนเนื้อเยื่อ รังไข่ และอับละอองเกสรพัฒนาผ่านขบวนการ เอ็มบริโอเจเน

ซิส มากกว่าขบวนการ ออร์แกนโนเจเนซิสฮอร์โมน (Hormones) ที่มีอยู่ภายในพืช มีบทบาทอย่างมากกับขบวนการเกิด การเกิดลักษณะรูปร่าง จากทฤษฎีของโฮบ ได้มีผู้พยายามพิสูจน์ว่า การเกิดลักษณะรูปร่าง ควบคุมด้วยชนิดและระดับของฮอร์โมน ดังนั้นภายในเนื้อเยื่อพืชที่นำมาเลี้ยงจึงมีฮอร์โมนบางชนิดส่งเสริมการเกิด การเกิดลักษณะรูปร่าง และมีฮอร์โมนอีกบางชนิดที่ยับยั้งการเกิดขบวนการนี้ นอกจากนี้พบว่าชนิด (kinds) และระดับ (levels) ของฮอร์โมนภายในชิ้นส่วนของพืชจะแตกต่างกันไปดังนี้

ก. ชนิดของพืช ภายในเนื้อเยื่อพืชแต่ละชนิดจะมีปริมาณฮอร์โมนชนิดแตกต่างกันออกไป เช่น พืชบางชนิดอาจจะมีออกซินในปริมาณที่สูง เมื่อนำเนื้อเยื่อของพืชชนิดนี้ไปเลี้ยงเนื้อเยื่อก็สามารถพัฒนาไปเป็นแคลลัสและรากได้ดีพืชบางชนิดอาจจะมีไซโตไคนินเนื้อเยื่อของพืชชนิดนี้เมื่อนำไปเลี้ยงจะพัฒนาไปเป็นหน่อได้ดี เป็นต้น

ข. ชนิดของเนื้อเยื่อ ในพืชชนิดเดียวกันหรือต้นเดียวกัน ปริมาณฮอร์โมนในแต่ละส่วนของต้นพืชจะไม่เหมือนกัน เช่น ส่วนปลายยอดจะมีออกซินปริมาณสูงกว่าส่วนต้น ในรังไข่ก็มีปริมาณออกซินค่อนข้างสูงส่วนในเมล็ดนอกจากจะมีออกซินค่อนข้างสูงแล้ว ปริมาณของ จิบเบอริลลินด์ยังสูงด้วย เป็นต้น ฮอร์โมนของพืชในพืชแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน ซึ่งส่งผลต่อการพัฒนาของเนื้อเยื่อพืช เนื้อเยื่อพืชชนิดเดียวกันแต่ต่างกันที่ชิ้นส่วนเช่น ยอด ใบ ราก ก็จะมีฮอร์โมนที่อยู่ ภายในแตกต่างกัน สภาพของเนื้อเยื่อ เช่น เนื้อเยื่อที่กำลังเจริญเติบโตกับเนื้อเยื่อที่มีการพักตัวจะมีสารควบคุมการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันซึ่งส่งผลต่อการพัฒนาของเนื้อเยื่อพืชหลัง จากนำมาเพาะเลี้ยงสภาพของเนื้อเยื่อ เนื่องจากเนื้อเยื่อพืชมีการเจริญและพัฒนาอยู่เสมอ ดังนั้นชนิดและระดับของฮอร์โมนที่มีอยู่ในเนื้อเยื่อจึงมีการเปลี่ยนแปลงไปตามสภาพของเนื้อเยื่อในระยะนั้น ๆ เป็นที่เชื่อกันว่าการเปลี่ยนแปลงชนิดและระดับของฮอร์โมนภายในเนื้อเยื่อ เป็นสาเหตุให้เนื้อเยื่อ มีการเปลี่ยนแปลงทางสรีระ จึงทำให้การเปลี่ยนชนิดและระดับฮอร์โมนกับการเปลี่ยนแปลงทางสรีระเกิดควบคู่กันไปเสมอ เช่น หัวลิลี่ (lily) และซ่อมกลิ่นฝรั่ง (gladiolus) ขณะที่เก็บเกี่ยวมาใหม่จะมีสารยับยั้งการเจริญเติบโต (Inhibitor) เช่น abscissic acid (ABA) ในปริมาณค่อนข้างสูง ดังนั้นถ้านำเนื้อเยื่อในระยะนี้มาเลี้ยงจะไม่ค่อยประสบความสำเร็จในการเกิดหัวย่อย (bulblets หรือ cormels) แต่ถ้านำหัวลิลี่หรือซ่อนกลิ่นฝรั่งนี้เก็บไว้สักระยะหนึ่ง ปริมาณ ABA ก็จะลดลง ขณะที่จิบเบอริลลิเพิ่มขึ้นเมื่อนำหัวระยะนี้ไปเลี้ยงโอกาสที่จะประสพความสำเร็จในการเกิดหัวย่อยก็มีสูงขึ้น

3. ปัจจัยทางด้านกายภาพ

แสง (light) แสงที่ให้กับพืชเป็นปัจจัยที่สำคัญ พืชที่เจริญในแปลงปลูกกับที่เจริญในหลอดทดลองจะมีความต้องการแสงที่แตกต่างกัน พืชที่เจริญในหลอดทดลองยังไม่มีการสังเคราะห์แสงเนื่องจากได้รับคาร์โบไฮเดรตจากน้ำตาล อย่างไรก็ตามแสงยังมีความจำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของพืชในหลอดทดลองเช่น ช่วยในการสร้างรากการสร้างต้นใหม่จากแคลลัสเป็นต้นและต้นพืชที่อยู่ในช่วงย้ายออกจากหลอดทดลองจำเป็นต้องมีการสังเคราะห์แสงเพื่อเตรียมพร้อมออกสู่ภายนอกหลอดทดลอง แต่ถ้าความเข้มแสงมากเกินไปอาจทำให้พืชตายได้ ลักษณะของแสงที่เกี่ยวข้องได้แก่ ความเข้มแสง (light intensity) ช่วงแสง (photoperiod) และคุณภาพของแสง (light quality)

ก. ความเข้มแสง (light intensity) มีรายงานความเข้มแสงที่มีผลต่อ การเจริญเติบโตของพืชในสภาพหลอดแก้วมากกว่าทางด้านช่วงแสง ถ้าหากพืชในสภาพหลอดแก้วได้รับความเข้มแสงสูงเท่าในแปลงปลูกพืชอาจเป็นอันตรายได้ เนื่องจากทำให้พืชได้รับอุณหภูมิสูงไปด้วย ควรเลี้ยงภายใต้สภาพแสงประมาณ 1,000-4,000 ลักซ์ (lux)(1 ฟุตกำลังเทียน = 10.75 ลักซ์) การที่พืชต้องการความเข้มแสงต่ำ สันนิษฐานว่าการสังเคราะห์แสงในสภาพหลอดแก้วถูกจำกัดด้วยปริมาณของคาร์บอนไดออกไซด์ที่ต่ำ ในหน่อไม้ฝรั่ง เยอบีร่าและสับปะรด ความเข้มแสงที่เหมาะสมในระยะเพิ่มจำนวนคือ 1,000 ลักซ์ ส่วนในระยะที่ต้องการให้ต้นพืชเจริญเตรียมออกรากต้องการความเข้มแสงคือ 1,000-3,000 ลักซ์ โดยให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวันการให้แสงที่มีความเข้มในระดับนี้จะมีเปอร์เซ็นต์การรอดตายสูงเมื่อย้ายปลูกลงดิน

ข.ระยะเวลาในการให้แสง (light duration) ไม่ค่อยมีนักวิจัยทดลองด้านช่วงแสง กับการเจริญของเนื้อเยื่อในสภาพหลอดแก้วมากนัก โดยทั่วไปมักเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้ได้รับแสง 14-16 ชั่วโมง บางครั้งได้รับตลอด 24

ชั่วโมงหรือเลี้ยงในที่มืดเช่น การเลี้ยงแคลลัส การเพาะเมล็ดกล้วยไม้โดยหลักการแล้วช่วงแสงที่เหมาะสมควรเป็นช่วงแสงที่พืชนั้นเจริญอยู่ในธรรมชาติ ช่วงแสงมีอิทธิพลต่อการพัฒนาของเนื้อเยื่อ ในการเจริญเป็นรากและยอดของเนื้อเยื่อแคลลัสยาสูบและเนื้อเยื่อส่วนปลายยอดของหน่อไม้ฝรั่ง ช่วงแสงที่เหมาะสมคือ 16 ชม.ต่อวัน โดยใช้ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกะหล่ำเพื่อให้สร้างยอดจะใช้ความเข้มแสง 4,000 ลักซ์ โดยรับช่วงแสง 9 ชม.ต่อวัน การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อลำต้นขององุ่นพันธุ์ที่เป็นวันสั้นจะเกิดรากเมื่อได้รับวันสั้นแต่ถ้าเพาะเลี้ยงองุ่นวันยาวจะออกรากเมื่อพืชได้รับวันยาวอย่างไรก็ตามระยะเวลาในการให้แสงกับความเข้มของแสงจะมีความสัมพันธ์กัน เช่น ถ้าให้แสงที่มีความเข้มสูงอาจจะใช้ระยะเวลาในการให้แสงน้อยลง เป็นต้น

ค.คุณภาพของแสง (light quality) จากการทดลองพบว่าแสงสีแดง (red light) และแสงสีน้ำเงิน (blue light) เป็นต้นกระตุ้นให้เกิดยอดของพืชหลายชนิด เช่น ในการเลี้ยงส่วนใบของพิทูเนีย เนื้อเยื่อจะเกิดยอดเป็นปริมาณมากเมื่อได้รับแสงสีแดงและเนื้อเยื่อจะเกิดยอดน้อย เมื่อได้รับแสงชนิดไหนหลังสุด ก็จะมีผลตามแสงชนิดนั้น

ตัวอย่างต่อไปนี้

เนื้อเยื่อที่ไดรับ Red light จะเกิดยอดปริมาณมาก

เนื้อเยื่อที่ไดรับ F-Red light จะเกิดยอดน้อย

เนื้อเยื่อที่ไดรับ Red.....F-Red light จะเกิดยอดน้อย

เนื้อเยื่อที่ไดรับ F-Red light .....Red light จะเกิดยอดมาก

จากผลอันนี้จึงได้มีสมมุติฐานว่า การเกิดลักษณะรูปร่าง ถูกควบคุมด้วยระบบ phytochrome จึงทำให้นิยมใช้หลอดฟลูออเรสเซนต์ (fluorescent lamp) เหมาะที่จะใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ หลอดไฟที่ให้แสงอัลตราไวโอเลต จะยับยั้งการสร้างยอด การใช้แสงสีแดงจะ ดีกว่าสีน้ำเงินในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อยาสูบ แสงสีแดง (660 nm.) ยังทำให้เกิดการสร้างราก มีรายงานว่าแสงสีขาวและสีน้ำเงินจะทำให้การเจริญของแคลลัสดีกว่าแสงสีเขียวและสีแดงหรือเมื่อเพาะเลี้ยงในที่มืดโดยทั่วไปแสงสีแดงและอินฟราเรดจะกระตุ้นการเกิดยอด มีเพียงบางรายงานที่พบว่าแสงสีแดงยับยั้งการเกิดยอดในมอส(Pohlia nutans) การสร้างตายอดต้องการแสงทั้งแสงสีแดงและสีน้ำเงินโดยถ้าได้รับแสงสีแดง 11 ชั่วโมงตามด้วยสีน้ำเงิน 6 ชั่วโมงทุกวันจะทำให้เกิดตายอดจำนวนสูงสุด แต่ถ้าให้แสงชนิดเดียวจะไม่ช่วยในการสร้างยอด จากตัวอย่างแสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อเป็นอวัยวะส่วนต่าง ๆ ของพืชต้องการคุณภาพแสง ความเข้มแสง และช่วงแสงที่เหมาะสม อุณหภูมิ (temperature) อุณหภูมิที่ใช้มักคงที่ประมาณ 24-26 oซในการทดลองอาจเลี้ยงในห้องควบคุมอุณหภูมิ 17 oซ หรือสูงถึง 30 oซ อุณหภูมิที่เหมาะสมเพื่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืช มักต่ำกว่าในธรรมชาติจึงควรเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ต่ำกว่าธรรมชาติ อุณหภูมิที่ต่ำมากเกินไปเช่นเย็นจัดถึง 4 oซ ทำให้พืชหยุดการเจริญเติบโต บางครั้งพืชต้องการอุณหภูมิต่ำสลับการอุณหภูมิสูง เช่น การสร้างรากของทานตะวันจะดีขึ้นถ้าเพาะเลี้ยงให้ได้รับอุณหภูมิกลางวัน 26 oซ กลางคืน 15 oซ การเลี้ยงแคลลัสของพืชบางชนิดให้ผลเช่นเดียวกัน อุณหภูมิทำให้พืชเกิดการพ้นระยะการพักตัว (break dormancy) ใน gladiolushortulans หัวหรือต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะพัฒนาเป็นต้นพืชที่ปลูกลงดินได้ต้องเลี้ยงที่อุณหภูมิ 2 oซ นาน 4-6 สัปดาห์ก่อนการย้ายลงดินเช่นเดียวกับลิลี่ต้นจะพักตัวจึงต้องทำให้พ้นระยะการพักตัวโดยเลี้ยงที่ในที่มืดอุณหภูมิ 5 oซ นาน 4 สัปดาห์ก่อนย้ายปลูกความชื้น (humidity) เนื่องจากความชื้นในหลอดแก้วค่อนข้างสูง ถ้าความชื้นในห้องเพาะเลี้ยงต่ำ ก็จะเกิดการสูญเสียน้ำภายในหลอดส่งผลทำให้อาหารแห้งเร็ว แต่ถ้าความชื้นในห้องเพาะเลี้ยงสูงเกิดไปก็จะเอื้ออำนวยให้เชื้อจุลินทรีย์เจริญได้ดีเกิดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ได้ง่าย และในบางครั้งถ้าความชื้นภายในหลอดทดลองสูงมากจะทำให้พืชเกิดอาการฉ่ำน้ำออกซิเจน (oxygen) เป็นปัจจัยที่มีความสำคัญ การเลี้ยงบนอาหารเหลวอาจใช้วิธีเพาะเลี้ยงบนสะพานกระดาษ หรือ วางบนเครื่องเขย่าคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) แม้ว่าจะเป็นแหล่งพลังงานของพืชซึ่งเกิดการสังเคราะห์แสงแต่ถ้าเกิดการสะสมมากเกินไปก็จะเป็นอันตราย

สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth regulators)

สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่เติมลงในอาหารเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญเป็นอย่างมากที่จะกระตุ้นให้พืชเกิดการเจริญของเนื้อเยื่อสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่เติมจากภายนอกจะต้องเกิดการสมดุลย์กับสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีอยู่ภายในเนื้อเยื่อพืชจึงจะกระตุ้นให้เนื้อเยื่อพืชเกิดการเจริญไปในทิศทางที่ต้องการ จำเป็นต้องมีการทดลองเพื่อหา จุดสมดุลย ซึ่งพอจะแยกบทบาทของสารควบคุมการเจริญเติบโตแต่ละชนิดได้ดังนี้ คือ

ก. ออกซิน บทบาทที่มีต่อเนื้อเยื่อที่เลี้ยง ได้แก่

- ส่งเสริมให้เนื้อเยื่อที่นำมาเลี้ยงเกิดแคลลัส เพื่อประโยชน์ในการที่จะนำแคลลัส นี้ไปชักนำให้เป็นต้นพืชต่อไป
- กระตุ้นให้ต้นอ่อนที่ได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อเกิดราก

ข. ไซโตไคนิน บทบาทที่มีต่อการเนื้อเยื่อที่เลี้ยง ได้แก่

- ส่งเสริมการเจริญเติบโตของใบ
- ยับยั้งการเจริญเติบโตของราก
- เร่งให้ชิ้นส่วนของพืชเกิดหน่อเป็นจำนวนมากบทบาทของออกซินและไซโตไคนินรวมกัน มีผลในการเลี้ยงเนื้อเยื่อถ้าหากเติม ออกซินและไซโตไคนินรวมกันจะมีผลทำให้การเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อดีกว่าการใช้ออกซินหรือไซโตไคนินอย่างใดอย่างหนึ่งแต่เพียงอย่างเดียว

ค. สารกลุ่มอื่น ๆ เช่น จิบเบอริลลิน พบว่า ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อถ้าหากในอาหารมี GA เป็นปริมาณมากจะไปยับยั้งการเกิด การเกิดลักษณะรูปร่าง แต่ในพืชบางชนิด เช่น มันฝรั่ง GA มีความสำคัญมากในการที่ให้เนื้อเยื่อมันฝรั่งเกิดเป็นหน่อ ส่วนพวก ABA จะไปยับยั้งการเกิดต้นและ/ หรือราก จะไปยับยั้งการเกิดเอ็มบริโอเจเนซิสในแครอทและยับยั้งการงอกของสปอร์เฟิร์น สำหรับสารพวกอนุพันธ์เพียวรีน (purine derivative) เช่น adenine หรือ guanine จะมีผลคล้าย ๆ กับสารในกลุ่มไซโตไคนิน คือ ช่วยในการกระตุ้นให้เกิดหน่อ

4. ปัจจัยอื่น ได้แก่

- ขนาดของชิ้นส่วนที่นำมาเลี้ยง (size of explant) ขนาดของชิ้นส่วนมีความสำคัญต่อการประสพความสำเร็จในการเลี้ยงเนื้อเยื่อหรือการเกิด การเกิดลักษณะรูปร่างมาก การใช้ชิ้นส่วนขนาดใหญ่จะมีโอกาสประสพความสำเร็จมากกว่าการใช้ชิ้นส่วนขนาดเล็ก

- สภาพของการเลี้ยงเนื้อเยื่อ (culture condition) หมายถึงสภาพภายในภาชนะที่เลี้ยงเนื้อเยื่อ เช่น สภาพของอาหารเป็นอาหารแข็งหรืออาหารเหลว เนื้อเยื่อบางชนิดจะเกิด การเกิดลักษณะรูปร่าง ได้บนอาหารกึ่งแข็งหรืออาหารวุ้นแต่จะไม่เกิด การเกิดลักษณะรูปร่าง ในอาหารเหลว เช่น กล้วยไม้ แต่เนื้อเยื่อบางชนิดสามารถเกิด การเกิดลักษณะรูปร่างได้ทั้งบนอาหารกึ่งแข็ง และในอาหารเหลว หรือถ้าปริมาณออกซิเจนภายนภาชนะที่ใช้เลี้ยงมาก คาร์บอนไดออกไซด์น้อยเนื้อเยื่อจะเจริญเป็นราก แต่ถ้าปริมาณออกซินน้อย คาร์บอนไดออกไซด์มากเนื้อเยื่อจะเจริญเป็นยอด

- การเปลี่ยนอาหาร (subculture) การย้ายเนื้อเยื่อจากอาหารเก่าไปยังอาหารใหม่หลาย ๆ ครั้ง จะมีผลทำให้การเกิด การเกิดลักษณะรูปร่าง ลดลง ทั้งนี้อาจจะเป็นเพราะว่าเกิด การเปลี่ยนแปลงชุดโครโมโซมขึ้น ซึ่งสาเหตุที่แท้จริงยังไม่ทราบแน่ชัด

- ส่วนประกอบอาหารอื่น ๆ (medium component) นอกเหนือจากสารควบคุม- การเจริญเติบโตของพืช อาหารบางชนิดจะมีผลต่อการเกิดลักษณะรูปร่าง เช่น ถ้ามีฟอสเฟตในอาหารเป็นปริมาณสูงจะเกิดยอดได้ดีกว่าที่มีฟอสเฟตในปริมาณต่ำ ถ้าให้ไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียม (NH4+) ในปริมาณมาก เนื้อเยื่อจะเกิดเอ็มบริโอเจเนซิสมากกว่าการเกิดออรแกนโนเจนเนซิสนอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณน้ำตาลก็เป็นตัวควบคุมการเกิดลักษณะรูปร่างเหมือนกันเช่น ถ้าในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่ออ้อยมีน้ำตาล 2 % จะช่วยให้เนื้อเยื่ออ้อยเกิดยอด ถ้า 3 % จะยับยั้ง

การเกิดยอด ส่วนในการเลี้ยงลิลลี่พบว่า น้ำตาล 2 % จะทำให้เกิดท่อน้ำ ในก้อนแคลลัส และ 4 % จะทำให้เกิดท่ออาหาร ส่วนน้ำตาล 3 % จะชักนำให้เกิดทั้งท่อน้ำและท่ออาหาร

(ที่มา : หลักการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อการขยายพันธุ์ โดย ผศ.ดร.อภิชาติ ชิดบุรี
สถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา)