

บทปฎิบัติการที่ 9

เรื่อง การเลี้ยงเชลล์แขวนลอย

รูปแบบของอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงพืชในสภาพปลอดเชื้อ มีทั้งที่เป็นอาหารแข็ง อาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว และอาหารเหลว และในบางครั้งสามารถใช้ร่วมกันทั้งอาหารแข็งและอาหารเหลว (thin layer) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ในการเพาะเลี้ยง

การเลี้ยงเชลล์แขวนลอย (suspension culture) คือการนำแคลลัสที่มีลักษณะเป็นแบบ friable มาเลี้ยงในอาหารเหลว การเขย่าจะช่วยให้เซลล์เกิดการแยกตัวออกจากกันเป็นเซลล์เดียวๆ หรือกลุ่มเซลล์ขนาดเล็ก 2-3 เซลล์ แขวนลอยอยู่ในอาหาร ซึ่งวิธีการเลี้ยงเชลล์แขวนลอยมีอัตราการเพิ่มปริมาณเซลล์สูงจึงได้มีการพัฒนาระบบการเพาะเลี้ยงที่มีขนาดใหญ่จนถึงระดับอุตสาหกรรมเพื่อการผลิตสารทุติยภูมิที่มีประโยชน์ในด้านการแพทย์ เครื่องสำอางค์และอาหาร แม้ว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวจะทำงานได้ยาก เนื่องจากต้องมีการควบคุมปริมาณอากาศให้กําชະนະเพาะเลี้ยงให้เหมาะสม นอกจํานี้สัดส่วนของอาหารต่อปริมาณเซลล์หรือเนื้อเยื่อของพืชก็มีส่วนสำคัญต่อการอัตราการเจริญเติบโตของพืชด้วย แต่ย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวนั้นเป็นวิธีการที่เซลล์พืชจะสัมผัสถกับอาหารได้โดยตรง อย่างทั่วถึงจึงเป็นเทคนิคการเพาะเลี้ยงที่พืชสามารถใช้หาดูอาหารได้อย่างเต็มที่และสม่ำเสมอ จึงมีอัตราการเจริญเติบโตสูง นอกจํานี้สารประกอบบางชนิดที่พืชปล่อยออกมายังเพาะเลี้ยงจะไม่มีการสะสมอยู่ในบริเวณรอบขึ้นส่วนพืช เป็นการช่วยลดอันตรายจากสารดังกล่าวได้อีกด้วยหนึ่งและยังเหมาะสมในการประยุกต์ใช้เพื่อคัดเลือกพืชลักษณะพิเศษต่างๆ

เนื่องจากเซลล์พืชมีการตอบสนองต่ออาหารได้รวดเร็ว สะดวกในการตรวจสอบคุณภาพของเชลล์ สำหรับการเพาะเลี้ยงในระดับห้องปฏิบัติการนิยมใช้วัสดุปูชมพู่ โดยวังนนเครื่องเขย่าเป็นเพื่อเป็นการเดินอากาศในอาหารด้วยความเร็วประมาณ 40 – 120 รอบต่อนาที

วัตถุประสงค์

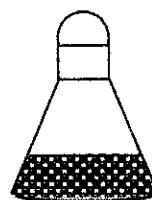
1. เพื่อศึกษารูปแบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและเซลล์พืชในอาหารเหลว
2. เพื่อฝึกเทคนิคการเพาะเลี้ยงเชลล์แขวนลอย
3. เพื่อศึกษาผลของการควบคุมการเจริญเติบโตที่มีต่อเซลล์พืชในอาหารเหลว

อุปกรณ์

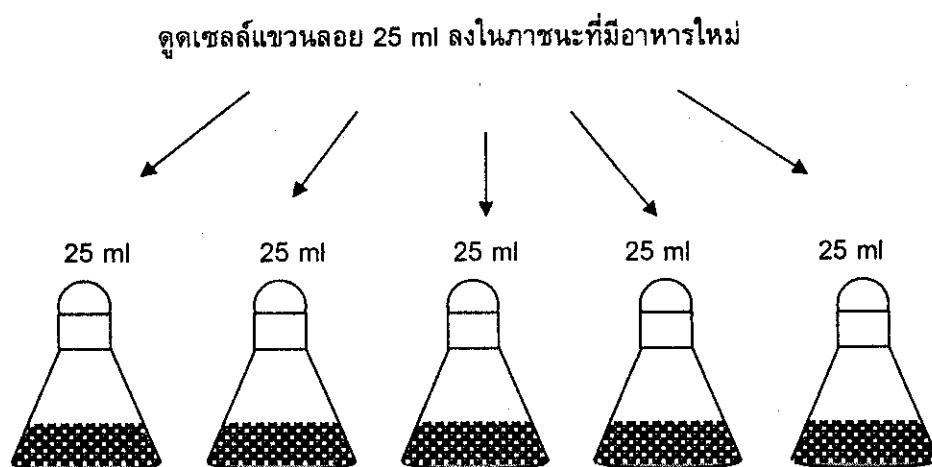
1. แคลลัสของแครอกและมันฝรั่ง จากบทปฏิบัติการที่ 6
2. อุปกรณ์ในดูปปลодเชื้อ ได้แก่ มีดผ่าตัด ปากคีบ จานแก้ว ผ้า ตะเกียงและซอฟ์
3. อาหารเหลวสูตร MS ที่เติม IAA ความเข้มข้น 1 mg/l

วิธีการ

1. ตัดแบ่งแคลลัส ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 เซนติเมตร ประมาณ 20 ชิ้น ต่อบริมาตรอาหาร 15 มิลลิลิตร
2. นำแคลลัสลงเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม IAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร
3. นำไปวางบนเครื่องขยาย ที่ความเร็ว 125 รอบต่อนาที ในห้องที่มีอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส สภาพมีด
4. เปลี่ยนถ่ายอาหารทุก 7-10 วัน โดยใช้ไปเปตที่มีปลายขนาดใหญ่ดูดเซลล์แขวนลอยไปใส่ในอาหารใหม่ ในอัตราส่วน 1 : 4



อาหาร ปริมาตร 125 ml
แคลลัส 2 cm³ 20 ชิ้น



5. นำเซลล์แขวนโดยมารองด้วยกระดาษกรองแล้วซึ่งน้ำหนักสด จากนั้นนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ประมาณ 12 ชั่วโมง แล้วซึ่งน้ำหนักแห้ง
6. เก็บข้อมูลน้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์

บันทึกผลการทดลอง

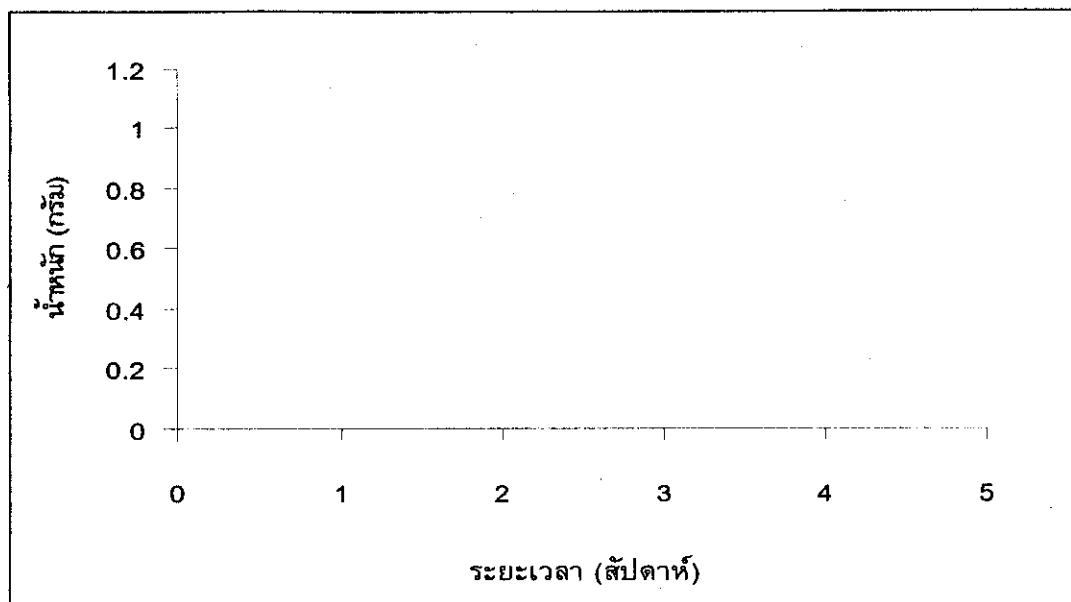
1. การป่นเปื้อน ลักษณะและสาเหตุของการป่นเปื้อน
2. อัตราการเดินโดยของเซลล์แขวนโดย
3. ลักษณะทั่วไปเซลล์แขวนโดย

หมายเหตุ บันทึกผลการทดลองทุกวันจนครบ 4 สัปดาห์

ผลการเลี้ยงเซลล์แขวนลอย

พิชตัวอักษร : ชื่อวิทยาศาสตร์.....ชื่อสามัญ.....
 ขั้นส่วนเริ่มต้นสูตรอาหาร.....
 วันที่ทำการทดลอง.....ผู้ทดลอง.....

สัปดาห์ ที่	การปนเปื้อน		การเติบโต		ลักษณะทั่วไป
	(%)	สาเหตุ	น้ำหนักสด	น้ำหนักแห้ง	
1					
4					
3					
4					



กราฟแสดงการการเติบโตของแคลลัสแครอท

สรุปผลการทดสอบ

คำถ้ามท้ายบท

1. ลักษณะการปนเปื้อนเชื้อจุลทรรศ์ที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว หนึ่งชนิดหรือ
แตกต่างจากอาหารแข็งอย่างไร มีวิธีการสังเกตอย่างไร ?

2. รูปร่างของเซลล์แขวนลอยเป็นอย่างไร เมื่อคนหรือแทกต่างจากแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งอย่างไร จงอธิบาย ?

3. อัตราการเดินทางของเซลล์แขวนลอยแตกต่างกันแค่ไหนที่เลี้ยงบนอาหารแข็งอย่างไร จงเปรียบเทียบผลจากการเพาะเลี้ยงแต่ละแบบมีข้อดีและข้อเสียอย่างไร ?
