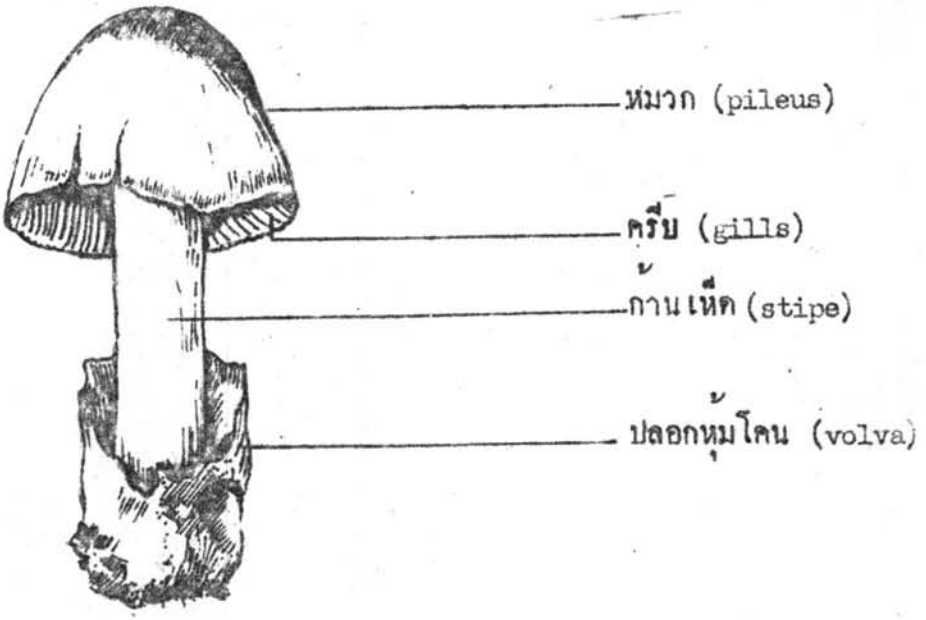
บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

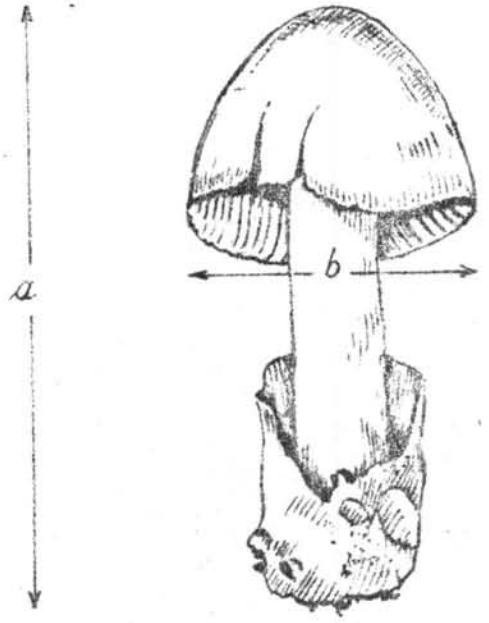
ลักษณะของเห็ดฟาง เมื่อยังเล็กจะมีเยื่อหรือปลอก (universal veil) คลุมอยู่ เมื่อโตขึ้นปลอกจะถูกดันแตกออก เห็นก้านเห็ด (stipe) และหมวก (pileus) ชัดเจน ใต้หมวกเป็นครีบ (gills) ซึ่งเป็นที่เกิดของสปอร์ เมื่อเห็ดฟางเจริญเต็มที่ ส่วนหมวกจะกางออก ส่วนของปลอกที่เหลือ (volva) จะคลุมอยู่ที่โคน (รูปที่ 1) เห็ดฟางที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นเห็ดฟางชนิดที่หมวกมีสีค่อนข้างขาว



รูปที่ 1 แสดงส่วนประกอบของเห็ดฟาง

2.1 การเจริญเติบโตของเห็ดฟางในกองแปลงเห็ด

การศึกษาการเจริญเติบโตของเห็ดฟางในกองแปลงเห็ดนั้น ได้ศึกษาจากการเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างของเห็ดฟางระหว่างการเจริญเติบโต และได้แบ่งการเจริญเติบโตของเห็ดฟางออกเป็นระยะต่าง ๆ กัน โดยพิจารณาลักษณะรูปร่าง ประกอบกับขนาดของ fruiting body มีการวัดความสูง และความกว้างในแต่ละระยะ (รูปที่ 2)



รูปที่ 2 แสดงการวัดความสูง (a) และความกว้างของร่ม (b)

วิธีกองแปลงเห็ด

วิธีกองแปลงเห็ดได้เลียนแบบของอาจารย์ ดีพร้อม ไชยวงศ์เกียรติ (ดีพร้อม ไชยวงศ์เกียรติ, 2513) แต่ได้มาดัดแปลงบางเพื่อให้เหมาะสมกับพื้นที่ที่ใช้เพาะเห็ด เพราะว่าการเพาะเห็ดในครั้งนี้ได้ทำในเรือนตนไม้ แผนกวิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์

ก่อนกองแปลงเห็ด แช่ฟอนฟางตอซังข้าวเจ้าในน้ำโดยพลิกฟอนฟางให้เปียกน้ำทั่วถึงกันเป็นเวลาประมาณ 3 ชั่วโมง เมื่อซังข้าวเปียกชุ่มดีแล้ว ยกขึ้นวางเรียงตามขนาดของแปลง คือ กว้าง 1 เมตร ยาว 2 เมตร สูง 50 เซนติเมตร การวางเรียงซังข้าวให้วางเรียงโคนซังข้าวตามขวางแปลงก่อนชั้นที่หนึ่ง เรียงโคนซังข้าวตามขวางให้สม่ำเสมอจากหัวแปลงไปท้ายแปลงให้ปลายซังข้าวหันเข้าตามในของแปลง ซึ่งชั้นที่หนึ่งนี้เรียงซังข้าวให้สูงจากพื้นดิน 20 เซนติเมตร รดน้ำพร้อมกับขึ้นไปย่ำเพื่อให้ฟางแน่น โรยเชื้อเห็ดฟางทางตามหัวแปลงไปจนถึงท้ายแปลงให้ห่างจากโคนฟางประมาณ 10 เซนติเมตร ต่อไปเรียงฟางชั้นที่สองให้สูง 30 เซนติเมตร สลับเอาโคนซังข้าวไว้อีกด้านหนึ่งโดยให้ปลายทับปลายซังข้าวของฟางชั้นที่หนึ่ง รดน้ำพร้อมกับขึ้นไปย่ำ โรยเชื้อเห็ดฟางแบบครั้งแรก ใช้ฟางเกลี่ยกระจาย ๆ กลบไว้ รดน้ำพร้อมกับขึ้นไปย่ำ (เชื้อเห็ดฟางซื้อจากร้านผลิตผลเกษตร หน้ามหาวิทยาลัยเกษตรกลางบางเขน กรุงเทพมหานคร)

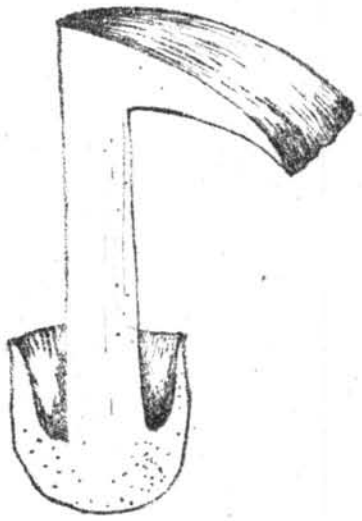
2.2 ครีบควบคุมการเจริญเติบโตของก้านและหมวกของเห็ดฟาง

การทดลองครั้งนี้ใช้เห็ดฟางที่มีหมวก ก้านเห็ด และครีบ อยู่ภายในปลอกหุ้ม (ระยะที่ II) ซึ่งได้ปลูกขึ้นเองในกะบะไม้ซึ่งใส่ ขี้ม้า เปลือกบัว และฟาง ผสมกันเพื่อให้เป็นอาหารแก่เห็ดฟาง เลือกเห็ดที่มีก้านตรง แล้วย้ายเห็ดนั้นพร้อมทั้งอาหารมาไว้ใน beaker ขนาด 250 มิลลิลิตร beaker ละ 1 ดอก ทำการทดลอง 2 ชุด แต่ละชุดใช้เห็ดฟาง 10 ดอก

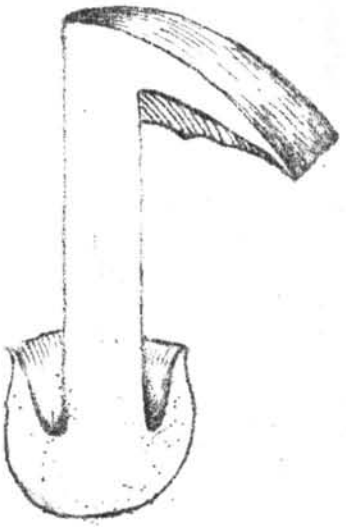
ชุดที่ 1 ใช้ใบมีดโกนตัดหมวกและครีบออกครั้งหนึ่ง และเอาส่วนครีบใต้หมวกของส่วนที่เหลือที่จะทำการทดลองออก (รูปที่ 3) เก็บไว้ในห้องมืดซึ่งมีอุณหภูมิประมาณ 29 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 ชั่วโมง

ชุดที่ 2 ทำเหมือนกับชุดที่ 1 ต่างกันตรงไม่ได้เอาส่วนครีบใต้หมวกของส่วนที่เหลือที่จะทำการทดลองออก (รูปที่ 4)

ดูการเจริญเติบโตของก้านและหมวก ด้วยการสังเกตการขยายตัวของหมวก และการยืดตัวกับการโค้งงอของก้านเห็ดของการเบนของก้านเข็กลัดจากรูปร่าย



รูปที่ 3 ดอกเห็ดที่ตัดส่วนครีบใต้หมวก



รูปที่ 4 ดอกเห็ดที่มีครีบใต้หมวก

2.3 การสกัด crude extract

ในการสกัด crude extract จากส่วนครีบของเห็ดฟาง ได้ทดลองใช้ solvent หลายอย่าง เช่น petroleum ether acetone และ 80% methanol แต่ไม่สามารถทำให้ solvent ระเหยออกไปหมดได้ด้วยเครื่อง Rotary Evaporator ต่อมาจึงได้ทดลองใช้น้ำเป็น solvent ในการสกัด และได้ crude extract ออกมาตามวิธีการข้างล่าง

ซื้อเห็ดฟางในระยะที่ II ซึ่งส่งมาจากฟาร์มที่อำเภอกระทุ่มแบน จังหวัดสมุทรสาคร ใช้ใบมีดโกนกรีดตรงกลางของปลอกให้รอบ ๆ แล้วลอกปลอกออก ตัดเอาเฉพาะส่วนครีบมา 130 กรัม ปั่นในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร ด้วย Waring Blendor 2 นาที โดยใช้ความเร็วสูงสุด ใสของผสมนี้ลงในหลอด centrifuge นำไป centrifuge ด้วยเครื่อง Servall Refrigerated Automatic Centrifuge ด้วยแรงเหวี่ยง 10,000 X g เป็นเวลา 20 นาที นำ supernatant ที่ได้ 280 มิลลิลิตรมาทำให้แข็งที่อุณหภูมิต่ำ โดยแช่ในเครื่อง Methanol Cooling ที่อุณหภูมิ –35 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 20 นาที แล้วนำไปใส่ในเครื่อง lyophilizer เพื่อระเหิดน้ำแข็งออกไปในสูญญากาศ ก็จะได้ crude extract ที่มีลักษณะเป็นเกร็ดเล็ก ๆ สีนวล

2.4 การวิเคราะห์ crude extract ในขั้นต้น

2.4.1 การวิเคราะห์สารใน crude extract โดยวิธี Infra red spectrophotometry และโดยปฏิกริยาทางเคมี

ดร. เพริศพรรณ คณาธารณา และ อาจารย์ สิทธิชัย ลีพิพัฒน์ไพบูลย์ แผนกวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ได้ตรวจหา functional group ใน crude extract ด้วยเครื่อง Pye Unicam Model SP 200 G Grating Infra red Spectrophotometer โดยใช้ KBr pellets และใช้ IR spectrum ของ polystyrene เป็น wave number calibration และได้ยืนยัน functional group นี้อีกทีโดยใช้ Biuret test และ Xanthoproteic test รายละเอียด

เกี่ยวกับวิธีทำอยู่ในภาคผนวก

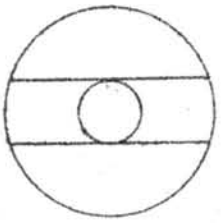
2.4.2 การตรวจสอบสารใน crude extract โดยวิธี ascending two - dimensional paper chromatography

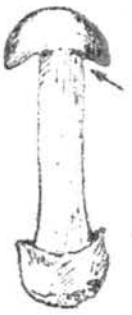
solvent ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ใช้ 2 ชนิด ชนิดที่หนึ่งคือ 2 - butanol : 3% ammonia = 150 : 50 และชนิดที่สองคือ 2 butanol: formic acid : distilled water = 150 : 30 : 20 กระดาษที่ใช้คือกระดาษกรอง Whatman No. 1 ขนาดกว้าง 20 เซนติเมตร ยาว 20 เซนติเมตร ในการ run solvent ชนิดที่หนึ่งและชนิดที่สองใช้เวลาเท่ากันคือ 5 ชั่วโมง spraying agent คือ 0.2 % ninhydrin (ใน 95 % ethanol)หลังจาก spray แล้วนำกระดาษกรองไปแขวนในตอบที่มีอุณหภูมิประมาณ 80 - 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 - 3 นาที แล้วตรวจดูตำแหน่งจุดสีม่วงที่เกิดขึ้น

2.5 การศึกษาผลของ crude extract และ indoleacetic acid (IAA) ที่มีต่อการยืดตัวของกานเห็ดฟาง

การทดลองนี้ได้ทำตามวิธีของ Hagimoto and Konishi (1959) ต่างกันตรงให้ crude extract แก่กานเห็ดโดยตรง ไม่ได้ให้ crude extract แก่กานเห็ดโดยผาน agar block

เห็ดที่ใช้ในการทดลองนี้ได้ทำการปลูกเอง และเลือกใช้เห็ดระยะที่มีก้านเห็ด หมวก และครีบ อยู่ภายในปลอกหุ้ม (ระยะที่ II) เมื่อลอกปลอกหุ้มออกแล้วตัดหมวกออกทั้งสองกานของกานเห็ดให้ขนานกันและให้หางจากแกนกลางของกานเท่าๆ กัน จะได้เห็ดรูปตัว T และตัดส่วนครีบใต้หมวกออกให้หมด (รูปที่ 5 และรูปที่ 6) การทดลองนี้ทำ 3 ชุด





รูปที่ 5 แสดงการตัดหมวกสองด้านให้ขนานกัน (Top veiw)

รูปที่ 6 เห็ดรูปตัว T

↗ = ตำแหน่งที่ให้ crude extract แก่ก้านเห็ด

ชุดที่ 1 ให้ crude extract (5 มิลลิกรัม ต่อน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร) แก่ก้านเห็ดข้างหนึ่งประมาณ 0.1 มิลลิลิตร โดยใช้ ไมโครปิเปต ขนาด 100 ไมโครลิตร

ชุดที่ 2 ให้ IAA ความเข้มข้น 10 p.p.m. แทน crude extract วิธีการเช่นเดียวกับชุดที่ 1

ชุดที่ 3 ให้น้ำกลั่น เพื่อใช้เป็น control วิธีการ เช่นเดียวกับชุดที่ 1

หลังจากให้สารต่าง ๆ แล้ว เก็บไว้ในห้องมืดอุณหภูมิประมาณ 29 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน โดยคอยเติมสารให้แก่ก้านเห็ดในปริมาณเท่าเดิมทุกๆ 12 ชั่วโมง เปรียบเทียบการทดลองทั้ง 3 ชุด โดยการสังเกตการเบนของก้านเห็ด และวัดองศาของการเบนของก้านเห็ดจากรูปถ่าย

2.6 การศึกษาผลของ crude extract ที่มีต่อการยืดตัวของ coleoptile ของข้าวโพดเปรียบเทียบกับ indoleacetic acid (IAA)

ในการทดลองศึกษาผลของ crude extract ที่มีต่อการยืดตัวของ coleoptile ของข้าวโพดเทียบกับ IAA โดยใช้น้ำเป็น control ได้ทำการทดลอง 3 ชุดดังนี้

ชุดที่ 1 ใช้ IAA ความเข้มข้น 0.001, .01 .1 1 10 และ 100 ppm

ชุดที่ 2 ใช้ crude extract ความเข้มข้น .001 .01 .1 1 10^{1} 10^{2} 10^{3} และ 10^{4} ppm

ชุดที่ 3 ใช้น้ำกลั่นเป็น control

การทดลองนี้ได้ทำตามวิธีการของ Wright (1961) โดยทำตามลำดับดังนี้

1. แช่เมล็ดข้าวโพดพันธุ์พระพุทธบาท 5 ในน้ำกลั่น 4 ชั่วโมงแล้วเพาะใน humidity box ในห้องมืดอุณหภูมิประมาณ 29° c เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

2. เตรียม IAA และ crude extract ที่มีความเข้มข้นต่างๆ กันดังกล่าวมาแล้ว ใส่ในหลอดทดลองขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.25 เซนติเมตร สูง 7.5 เซนติเมตร หลอดละ 0.6 มิลลิลิตร แต่ละความเข้มข้นทำ 4 หลอด สวนน้ำกลั่นก็ทำเช่นเดียวกัน คือใส่น้ำกลั่นในหลอดทดลอง 4 หลอด หลอดละ 0.6 มิลลิลิตร

3. ตัด coleoptile ของข้าวโพดที่มีอายุ 72 ชั่วโมงภายใต้แสงสีเขียวในห้องมืด โดยใช้ใบมีดโกนที่คมตัดให้มีความยาวเท่ากันคือ 0.5 เซนติเมตร แล้ววาง coleoptile จำนวน 5 อันบนกระดาษกรอง Whatman No. 1 ขนาดกว้าง 1.25 เซนติเมตร และยาว 5 เซนติเมตร แล้วสอดเข้าไปในหลอดทดลองที่ใส่ test solution ที่เตรียมไว้ แล้วปิดหลอดด้วยจุกคอร์ก

4. นำหลอดทั้งหมดเข้าเครื่อง Clinostat หมุนด้วยความเร็ว 1 รอบต่อนาที ในห้องมืดอุณหภูมิประมาณ 29 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง

5. วัดความยาวของ coleoptile หลังจากการทดลองด้วยไมบรรทัด เปรียบเทียบการยืดตัวของ coleoptile ของข้าวโพดหลังจากได้รับ IAA และ crude extract โดยเทียบกับน้ำ กลางก็อวัดความยาวของ coleoptile ชุดที่ 1 และชุดที่ 2 ไว้เปรียบเทียบกับความยาวของ coleoptile ในชุดที่ 3 โดย

ถือว่าความยาวของ coleoptile ในชุดที่ 3 เป็นการยืดตัวที่เพิ่มขึ้นตามปกติ และถือว่าการยืดตัวของ coleoptile ในชุดที่ 1 และชุดที่ 2 จะมีความยาวเพิ่มมากขึ้นกว่ากันหรือไม่เมื่อเทียบกับชุดที่ 3

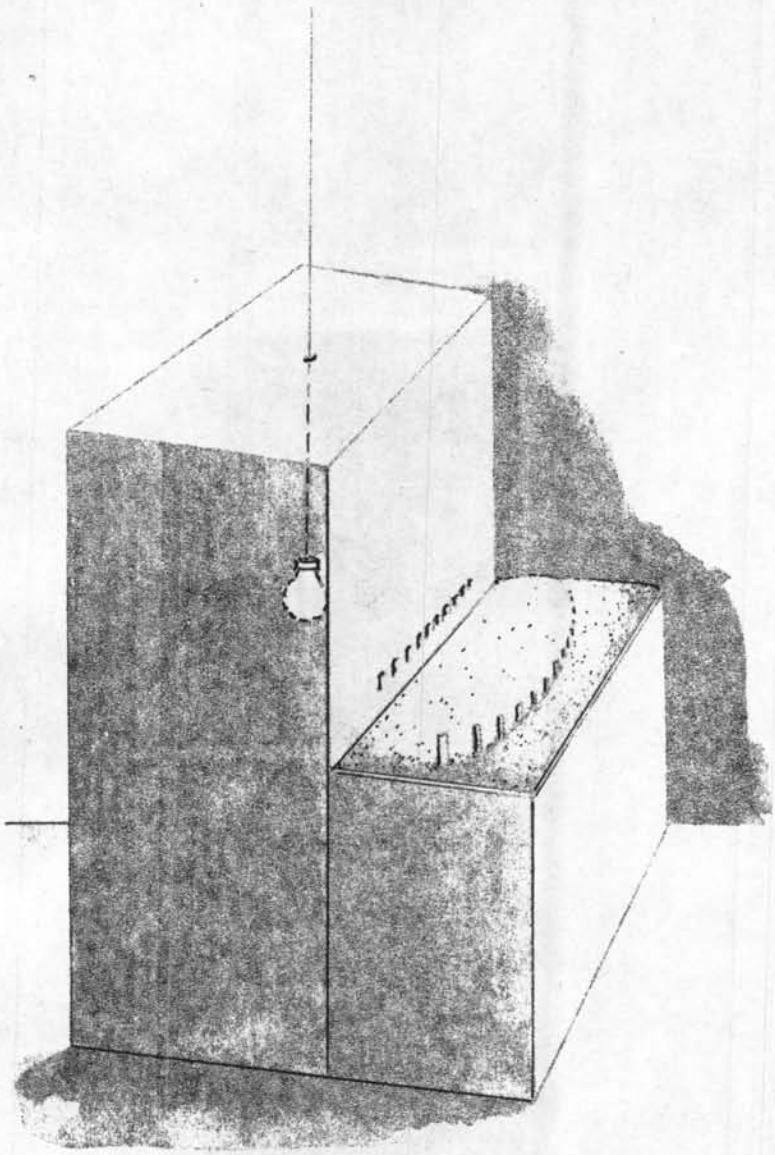
2.7 <u>การตอบสนองของกานเห็ดที่มีต่อแสง</u>

ในการทดลองนี้ใช้เห็ดฟางซึ่งปลูกเอง เลือกเห็ดที่ปลอกเริ่มปริ (ระยะที่ III) ได้ทำเป็น 2 ชุด แต่ละชุดใช้เห็ดฟาง 15 ดอก

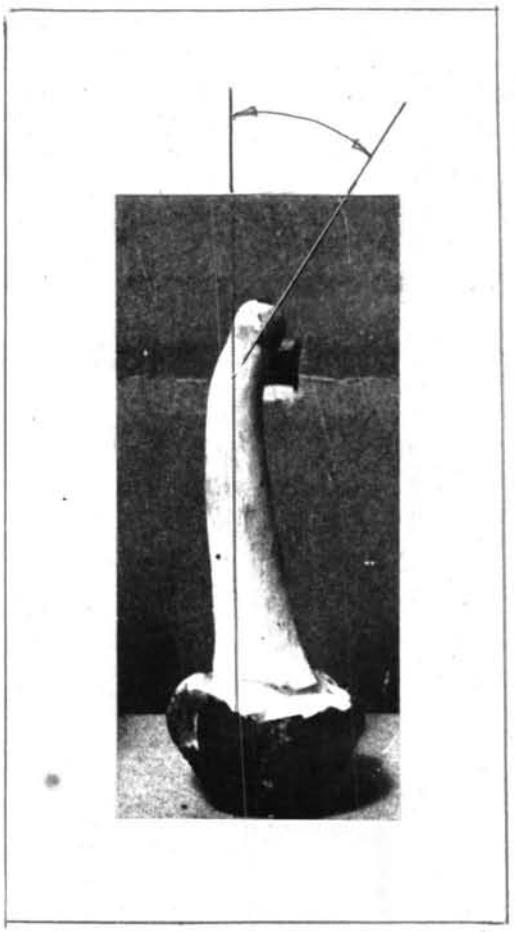
ชุดที่ 1 ตัดส่วน หมวก ครีบ และบางส่วนของปลอกเห็ดออก แล้ววางเรียงเป็นแถวในกล่อง ตั้งดวงไฟ 40 ฟุต – กำลังเทียนห่างจากเห็ด 1 ฟุต ให้แสงผ่านรูสี่เหลี่ยมขนาดกว้าง 0.3 เซนติเมตร ยาว 0.3 เซนติเมตร ไปตกลงบนส่วนยอดของกานเห็ดเนื้อที่ประมาณ 1 ตารางเซนติเมตร โดยถูกแสงเพียงด้านเดียวเป็นเวลา 5 ชั่วโมง (รูปที่ 7)

ชุดที่ 2 ทำเหมือนกับชุดที่ 1 แต่ไม่ตัดส่วนหมวกและครีบ

การวัดมุมที่เบนของกานเห็ดวัดจากรูปที่ถ่ายหลังจากการทดลองได้สิ้นสุดลงแล้ว (ภาพที่ 1)



รูปที่ 7 แสดงเครื่องมือตรวจสอบการตอบสนองของก้านเห็ดต่อแสง



ภาพที่ 1 แสดงการวัดมุมที่เบนของก้านเห็ดเข้าหาแสง

001753

2.8 ผลของ crude extract ที่มีต่อการสร้าง fruiting body ของเห็ดฟาง

ในการทดลองครั้งนี้ ได้เลี้ยงเห็ดฟางในอาหารเลี้ยงเชื้อสามชนิด เพื่อดูว่าอาหารชนิดไหนที่เห็ดฟางเจริญได้น้อยที่สุด เพื่อจะได้ให้ crude extract และดูผลของสารไคชัดเจน อาหารเลี้ยงเชื้อสามชนิดคือ Potato Dextrose Agar (PDA) Hay medium (- glucose) และ Hay medium (+ glucose) ดังมีส่วนประกอบและวิธีเตรียม ดังนี้

Potato Dextrose Agar

มันฝรั่ง	200	กรัม
glucose	15	กรัม
Bacto agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ต้มมันฝรั่ง 200 กรัม ที่หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ กับน้ำกลั่น $\frac{1}{2}$ ลิตร ประมาณ 15-20 นาที กรองน้ำมันฝรั่งด้วยผ้าขาวบาง ต้มน้ำกลั่น $\frac{1}{2}$ ลิตร กับ Bacto agar 15 กรัม คนจนละลายเข้ากันดีแล้ว ผสมวุ้นที่ละลายนี้กับน้ำมันฝรั่ง เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร เติม glucose 15 กรัมคนให้ละลายเข้ากันดีแล้ว ก็กรองอีกครั้งหนึ่งด้วยผ้าขาวบาง แล้วเทใส่หลอดทดลองขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 เซนติเมตร สูง 17 เซนติเมตร หลอดละ 10 มิลลิลิตร อุดจุกสำลี นำไปนึ่งในหม้อนึ่งความดันที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 20 นาที เสร็จแล้ววางหลอดเอียงลง (slant)

Hay medium (+ glucose)

ฟางข้าวเจ้า	50	กรัม
glucose	15	กรัม
K_2HPO_4	2	กรัม
Bacto agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

นึ่งฟางข้าวเจ้า 50 กรัมกับน้ำกลั่น 1 ลิตร ด้วยหม้อนึ่งความดันที่ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว 20 นาที กรองน้ำฟางด้วยผ้าขาวบาง แล้วเติมน้ำกลั่น

จนปริมาตร ครบ 1 ลิตร ตั้งไฟ ใส่ Bacto agar 15 กรัม คนให้ละลายเข้ากันใส่ glucose 15 กรัม (ได้ใช้ glucose 5 และ 10 กรัมด้วย ตามที่ระบุไว้ในการทดลองนั้น ๆ) และ potassium diphosphate 2 กรัม คนให้ละลายเข้ากัน ทิ้งไว้ให้อุ่น ปรับ pH ของอาหารให้เป็น 6 - 6.5 ด้วย 0.1 N HCL โดยใช้กระดาษวัด pH เทอาหารใส่หลอดทดลองขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 เซนติเมตร สูง 17 เซนติเมตร หลอดละ 10 มิลลิลิตร อุดด้วยจุกสำลี นำไปนึ่งด้วยหม้อนึ่งความดันที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 20 นาที เสร็จแล้ววางหลอดเอียงลง

Hay medium (- glucose)

ฟางข้าวเจ้า	50	กรัม
K_2HPO_4	2	กรัม
Bacto agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

เตรียมเช่นเดียวกันกับ Hay medium (+ glucose) แต่ไม่ใส่ glucose

วิธีเลี้ยงเห็ดฟางในหลอดอาหาร

ซื้อเห็ดตูมในระยะที่ II ซึ่งส่งมาจากฟาร์มกระทุ่มแบน เช็ดบริเวณภายนอกของเห็ดให้สะอาดด้วยสำลีชุบอัลกอฮอร์ 75 % หมา.. ๆ ใช้มีดคมจุ่มอัลกอฮอร์ 75 % ลนไฟกรีดลงตรงกลางของปลอกให้รอบ ๆ แล้วลอกปลอก หมวก และครีบออก ใช้สวนก้านเห็ดที่อยู่ต่ำจากยอดลงมาประมาณ 1 เซนติเมตร ตัดสวนก้านเห็ดตามขวางให้เป็นชิ้นบาง ๆ หนาประมาณ 1 มิลลิเมตร ด้วยมีดคมที่ลนไฟแล้ว inoculate ชิ้นเห็ดนี้ลงบนอาหารในหลอด ๆ ละ 1 ชิ้น ทั้งหมดที่กล่าวมานี้ทำในตู้ถ่ายเชื้อ นำหลอดทั้งหมดไปเก็บไว้ใน incubator ที่อุณหภูมิประมาณ 29 องศาเซลเซียส ซึ่งดำรง ติยวลีย์ (2505) รายงานว่า เป็นอุณหภูมิที่พอเหมาะกับการเจริญเติบโตของเห็ดฟาง พร้อมกับให้แสง 5 ฟุต - กำลังเทียน เป็นเวลา 14 วัน เปรียบเทียบการเจริญของเส้นใยและการสราง fruiting body ในอาหารทั้งสามชนิดโดยสังเกตด้วยตา

ศึกษาผลของ crude extract ที่มีต่อการเจริญเติบโต

crude extract ที่ใช้มีปริมาณต่าง ๆ กัน คือ .0005 .005 .05 .5 และ 5 มิลลิกรัมต่อหลอด ซึ่งเตรียมสารละลาย crude extract ได้โดยละลาย crude extract ในน้ำ แล้วให้สารละลายที่ปราศจากเชื้อตรงกลางกลุ่มเส้นใยอายุ 7 วัน ซึ่งกำลังเจริญอยู่บนอาหาร Hay medium (+ glucose 15 กรัมต่อลิตร) ในหลอดทดลองหลอดละ 0.5 มิลลิลิตร (กลุ่มเส้นใยมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2 เซนติเมตร) โดยผ่านหลอดฉีดยาขนาด 2 มิลลิลิตรซึ่งสวมต่อกับ sterilized millipore adaptor ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.5 เซนติเมตร ภายในมี millipore filter ขนาด 0.45 ไมครอน นำหลอดทั้งหมดไปเก็บไว้ใน incubator ที่อุณหภูมิ 29 องศาเซลเซียส พร้อมกับให้แสง 5 ฟุต – กำลังเทียน เป็นเวลา 14 วัน สังเกตความหนาแน่นของเส้นใย และนับจำนวน fruiting body ที่เกิดขึ้น

2.9 การศึกษาผลของ yeast extract ที่มีต่อการสร้าง fruiting body ของเห็ดฟาง

การทดลองนี้ทำกับกลุ่มเส้นใยอายุ 7 วัน ซึ่งเจริญอยู่บนอาหาร Hay medium (+ glucose 15 กรัมต่อลิตร) ปริมาณของ yeast extract ที่ใช้ต่าง ๆ กันคือ .05 .5 และ 5 มิลลิกรัมต่อหนึ่งหลอด การใส่ yeast extract แก่เส้นใยที่เจริญอยู่ในหลอดทดลองนั้นทำเช่นเดียวกันกับการใส่สารละลาย crude extract แก่กลุ่มเส้นใยในหลอดทดลอง หลังจากให้สารละลาย yeast extract แล้วนำไปเก็บไว้ใน incubator ที่อุณหภูมิประมาณ 29 องศาเซลเซียส ให้แสง 5 ฟุต– กำลังเทียน เป็นเวลา 14 วัน สังเกตความหนาแน่นของเส้นใยและนับจำนวน fruiting body ที่เกิดขึ้น