บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

เห็ดหอมที่ใช้ในการทดลองมี 2 สายพันธุ์คือ สายพันธุ์ T เรียกชื่อใหม่ว่า L1 เป็นสายพันธุ์ที่ออกดอกเมื่อได้รับอุณหภูมิต่ำ ดอกเห็ดมีคุณภาพดี คือ มีสีซีด ดอกหนา ก้านดอกสั้น สายพันธุ์ C เรียกชื่อใหม่ว่า L2 เป็นสายพันธุ์ที่ทนร้อนสามารถออกดอกได้เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นกว่าปกติ แต่คุณภาพของดอกไม่ดี คือ มีสีน้ำตาล ดอกบาง ก้านดอกค่อนข้างยาว ทั้งสองสายพันธุ์ได้มาจากกรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 1 ระดับความเป็นกรดเป็นด่างของอาหารที่ใช้เลี้ยงเส้นใยที่มีอายุที่ต่างกัน

การทดลองที่ 1.1 อัตราการเจริญเติบโตของเส้นใยนิวเคลียสคู่ (dikaryotic mycelium) ของเห็ดหอมสายพันธุ์ L1 และ L2 ที่เลี้ยงในอาหารวุ้นที่มีระดับความเป็นกรดเป็นด่างต่างกัน

<u>การวางแผนการทดลอง</u>

แบบ 2 x 3 factorial experiment in CRD จำนวน 5 ซ้ำ มี 2 ปัจจัย

ปัจจัย 1 สายพันธุ์ คือ L1, L2

ปัจจัย 2 ระดับความเป็นกรดเป็นด่าง 3.5, 5.0, 6.5

<u>อุปกรณ์</u>

1. เส้นใยนิวเคลียสคู่ (dikaryon = เส้นใยขั้นที่ 2) ของเห็ดหอม L1 และ L2
2. petri- dish
3. NaOH
4. Citric acid
5. หม้อนึ่งความดัน
6. อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (potato dextose agar)
7. ไม้บรรทัด
8. ปากกาเขียนแก้ว
9. พาราฟิน (parafin)

10. หลอดหยด

11. เครื่องวัด pH

12. ขวดกลมขนาดปริมาตร 325 cm^3

<u>วิธีการ</u>

1. เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 เตรียมอาหารเลี้ยง PDA จาก

มันฝรั่งปอกเปลือกหั่นเป็นรูปสี่เหลี่ยม 200 กรัม

กลูโคส 20 กรัม

ผงวุ้น 13 กรัม

น้ำ 1 ลิตร

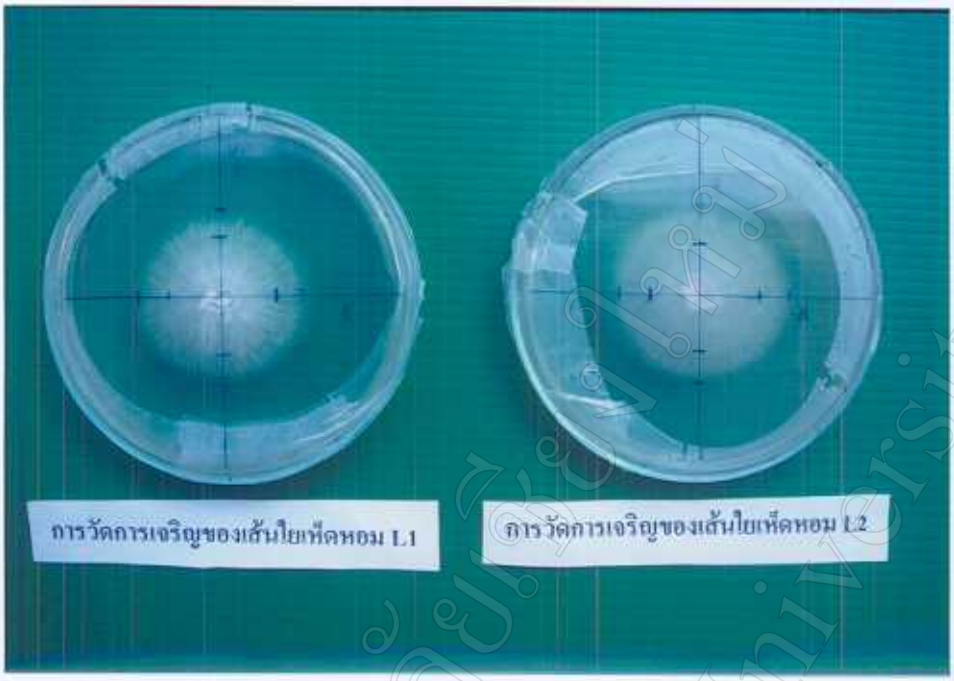
เตรียมใส่ในขวดกลม

1.2 ปรับความเป็นกรดเป็นด่าง ปรับก่อนนำอาหารเลี้ยงเชื้อในขวดกลมไปนึ่ง มีอยู่ 3 ระดับ 3.5 , 5.0 , 6.5 โดยใช้ NaOH และ citric acid แล้วนำไปนึ่งในหม้อนึ่งความดัน

1.3 เทอาหารเลี้ยงเชื้อลง petri-dish ทิ้งไว้ให้เย็น

2. การถ่ายเชื้อ ถ่ายจากหลอดเลี้ยงเชื้อเส้นใยนิวเคลียสคู่ของ L1 และ L2 ลงไปใน petri-dish ที่เตรียมไว้ โดยใช้เข็มเขี่ยลนไฟให้ร้อน ใช้พาราฟินปิด petri-dish ให้แน่น

3. การวัดการเจริญเติบโตของเส้นใย วัดการเจริญในแต่ละ petri-dish เป็น มิลลิเมตร/วัน โดยแบ่งเป็นแกน x และแกน y วัดทั้งแกน x และ y นำค่าทั้งสองมาบวกกันหารด้วย 2 ทำการวัดทุก 3 วัน เป็นเวลา 9 วัน แล้วนำค่าที่วัดได้ใน 3 วันแรกหารด้วยจำนวนวัน 3 วัน ค่าที่วัดได้ใน 3 วันที่สองหารด้วยจำนวนวัน 6 วัน ค่าที่วัดได้ใน 3 วันสุดท้ายหารด้วยจำนวนวัน 9 วัน แล้วนำค่าที่ได้จากการหารของทั้ง 3 ครั้ง มาบวกกันแล้วหารด้วย 3 เพื่อหาอัตราการเจริญเติบโตของเส้นใย (มิลลิเมตร/วัน)



ภาพที่ 2 แสดงการวัดการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดหอม

<u>การบันทึกข้อมูล</u>

1. อัตราการเจริญเติบโตของเส้นใย (มิลลิเมตร/วัน)
2. ลักษณะการเจริญเติบโตของเส้นใย ความสม่ำเสมอของเส้นใย ความหนาของเส้นใย

การทดลองที่ 1.2 ไซโมแกรมของเส้นใยนิวเคลียสคู่ (dikaryotic mycelium) ของเห็ดหอมสายพันธุ์ L1 และ L2 ที่เลี้ยงเป็นเวลาต่างกัน และเลี้ยงในระดับความเป็นกรด-ด่างต่างกัน

ใช้เทคนิคทางอิเล็กโตรโฟรีซีส โดยเลี้ยงเส้นใยของเห็ดทั้งสองสายพันธุ์ที่ระดับความเป็นกรดเป็นด่าง 3.5, 5.0, 6.5 เป็นเวลา 20 และ 30 วัน ศึกษาไซโมแกรมของไอโซไซม์ esterase เพื่อนำระดับความเป็นกรดเป็นด่างและอายุของเส้นใย ที่ทำให้เห็นไซโมแกรมชัดที่สุดมาใช้ในการทำไซโมแกรมในการทดลองต่อไป

อุปกรณ์

1. เส้นใยนิวเคลียสคู่ (dikaryotic mycelium) ของเห็ดหอมสายพันธุ์ L1 และ L2
2. เครื่องชั่งอย่างละเอียด
3. เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter)
4. เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge)
5. โกร่งบด
6. eppendrop tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
7. ชุดทำอิเล็กโตรโฟรีซีสแบบ slab gel
8. เครื่องจ่ายกระแสไฟ
9. เครื่องทำความเย็น (cooling unit)
10. ตู้เช่ที่อุณหภูมิ 4 และ 20 องศาเซลเซียส
11. ถุงมือยาง
12. อุปกรณ์เครื่องแก้วต่างๆ
13. กระดาษกรอง
14. extraction buffer
15. ส่วนประกอบของเจล
16. electrode buffer
17. สีย้อมที่ใช้ตรวจจับการเคลื่อนที่ของ esterase isozyme
18. ขวดกลมขนาดปริมาตร 325 cm^3
19. กลูโคส
20. มันฝรั่ง

หมายเหตุ : การเตรียมสารดูจากภาคผนวก

วิธีการ

1. การเตรียมตัวอย่างพืช

นำเส้นใยนิวเคลียสคู่ของเห็ด (dikaryotic mycelium) มาเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีระดับความเป็นกรดเป็นด่าง 3.5 , 5.0 และ 6.5 ตามลำดับ เป็นเวลา 20 และ 30 วัน โดยอาหารเหลวมีสูตรดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

มันฝรั่งหั่นเป็นลูกเต๋า 200 กรัม

กลูโคส 20 กรัม

น้ำ 1 ลิตร

นำเส้นใยมาชั่งน้ำหนัก 3 กรัม เก็บไว้ในตู้แช่ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

2. การสกัดเอนไซม์

นำเส้นใยที่เก็บไว้ในตู้แช่มาบดในโกร่งที่แช่เย็นไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน แล้วเติม extraction buffer 5 มิลลิลิตร นำไปแยกส่วนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ 10,285.6 G ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ดูดของเหลวที่ลอยอยู่ข้างบน (supernatant) ไปเก็บไว้ในหลอด eppendrop ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส จากนั้นรอนำไปทำอิเล็กโตรโฟรีซิส

3. การประกอบชุดอิเล็กโตรโฟรีซิส

ประกอบชุดอิเล็กโตรโฟรีซีส โดยเติม electrode buffer ลงใน chamber ดังภาพ

ภาพที่ 3 แสดงชุดอิเล็กโตรโฟรีซิสที่ประกอบแล้ว

1. เครื่องทำน้ำเย็น
2. electrode chamber
3. power supply (จากซ้ายมาขวา)

4. การเตรียมเจล

4.1 การเตรียมแผ่นกระจกสำหรับใส่เจล (gel mould) แผ่นกระจกที่ใช้มี 2 แผ่น ประกบกันขนาดของทั้ง 2 แผ่นจะมีความสูงไม่เท่ากัน

4.2 ทำความสะอาดแผ่นกระจกโดยเช็ดด้วย acetone นำแผ่นกระจกทั้งสองแผ่นมาประกบกันแล้วใช้แผ่นยางขั้นระหว่างกระจกทั้งสองข้างของแผ่นกระจก นำไปตั้งบน stand ในแนวตั้งฉากกับฐานของ stand ยึดให้แน่นด้วยตัวยึดเพื่อให้กระจกประกบกันสนิท

4.3 ใส่ running gel ที่เตรียมไว้สูงประมาณ 12 เซนติเมตร แล้วใส่น้ำกลั่นเพื่อให้ผิวหน้าของเจลเรียบ ทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง เพื่อรอให้เกิด polymerization ใส่ stacking gel พร้อมกับ comb ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที นำ comb ออกล้างผิวหน้าเจลด้วยน้ำกลั่น

5. การหยอดตัวอย่าง

นำตัวอย่างที่เก็บไว้ในตู้แช่เย็น มาหยอดลงบนเจลแต่ละช่อง ช่องละหนึ่งตัวอย่าง ปริมาตร 70 ไมโครลิตร ระวังอย่าให้ตัวอย่างฟุ้งกระจาย

6. ดำเนินการผ่านกระแสไฟ

ผ่านกระแสไฟต่ำกว่า 75 mA ที่มีความต่างศักย์ที่ 275 Volt ควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส ตลอดเวลาที่ผ่านกระแส โดยการควบคุมของเครื่องควบคุมอุณหภูมิแบบน้ำเย็นหมุนเวียนเข้าออก chamber เป็นเวลา 2-5 ชั่วโมง จนกระทั่งระดับของ marker solution อยู่ห่างจากขอบล่างของแผ่นเจล 1 นิ้ว

7. ปฏิกริยาเอนไซม์

แกะแผ่นกระจกที่ประกบกันออก ตัดขอบล่างทางซ้ายของแผ่นเจล เพื่อให้ทราบลำดับของหมายเลขตัวอย่างที่หยอด นำเจลลงแช่ในสารละลายที่ประกอบด้วย phosphate buffer , α- naphthyl acetate และ fast blue B-salt ที่มีความจำเพาะกับเอนไซม์ที่ต้องการตรวจสอบ

8. หยุดปฏิกริยา

หลังสิ้นสุดปฏิกริยา นำแผ่นเจลล้างน้ำไหลช้าๆ แช่น้ำสารละลาย acetic acid 7% ที่ผสมด้วย glycerol 10% เพื่อหยุดปฏิกริยาและละลายสีส่วนเกินออก

<u>การบันทึกข้อมูล</u>

บันทึกการแสดงออกของไอโซไซม์โดยการถ่ายภาพ และวาดภาพไซโมแกรม แสดงตำแหน่ง จำนวน และขนาดของแถบสี วัดค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของแถบสี

$$\text{ค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (Rf)} = \frac{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของแถบสี}}{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของ marker solution}}$$

การทดลองที่ 2 การผสมพันธุ์

การทดลองที่ 2.1 การแยกและการคัดเลือกเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว

อุปกรณ์

1. ดอกเห็ดหอมสายพันธุ์ L1 และ L2
2. petri-dish
3. กระดาษสีตัดเป็นวงกลมให้พอดีกับ petri-dish , กระดาษสีเข้มตัดเป็นชิ้นเล็กๆ
4. เข็มเขี่ยเชื้อ
5. น้ำกลั่น
6. อาหารวุ้น PDA
7. กล้องจุลทรรศน์
8. สีย้อมฟล็อกซิน (Phoxin)
9. สไลด์
10. cover slip

วิธีการ

1. นำกระดาษสีที่ตัดเป็นวงกลมวางใน petri-dish แล้วใช้กระดาษสีชิ้นเล็กๆ วางลงบนกระดาษวงกลมใน petri-dish ปิดฝา ห่อด้วยกระดาษนำไปนึ่งด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 30-35 นาที ปล่อยให้เย็น

2. นำดอกเห็ดหอมมาเช็ดด้วยแอลกอฮอล์ทั้งที่หมวกดอกและก้านดอก นำดอกเห็ดวางลงใน petri-dish ทิ้งไว้ 1 คืน จึงนำเห็ดออก ทุกขั้นตอนทำในตู้เขี่ยเชื้อ

ภาพที่ 4 แสดงการดักสปอร์ของเห็ด

3. นำกระดาษชิ้นเล็กๆ ที่มีสปอร์ของเห็ดมาผสมกับน้ำกลั่น 10 cc. ในหลอดทดลองที่นึ่งแล้ว ประมาณ 1 ชิ้น จะได้สารละลายสปอร์ ลดความหนาแน่นของสปอร์โดยเติมน้ำกลั่นที่นึ่งแล้วลงในหลอดทดลอง 5 หลอด ที่นึ่งแล้ว หลอดละ 9 cc. นำสารละลายสปอร์ 1 cc. จากหลอด 1 มาใส่ในหลอด 2 เขย่า ทำแบบเดิมในหลอดที่ 3 , 4 และ 5 ในหลอดที่ 5 มีสปอร์ของเห็ดอยู่เจือจางที่สุด

4. ใช้ loop แตะสารละลายสปอร์หลอดที่ 5 มาลากแบบซิกแซกบนอาหารวุ้นเอียงทิ้งไว้ประมาณ 6-8 วัน สปอร์เริ่มงอก ทุกขั้นตอนทำในตู้ปลอดเชื้อ

5. ใช้เข็มเขี่ยตัดอาหารวุ้นที่มีเส้นใยสปอร์ที่เพิ่งงอกออกมาใส่ในอาหารวุ้นหลอดใหม่ ซึ่งเส้นใยนี้มีหลายจุด จึงได้เส้นใยหลายตัว ทิ้งไว้ 6-8 วัน เส้นใยก็เจริญในอาหารใหม่ให้เห็นชัดขึ้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

6. ตรวจเส้นใย นำเส้นใยที่เลี้ยงไว้มาตรวจ โดยนำมาย้อมสีแล้วนำไปส่องดูโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ ถ้าไม่พบข้อยึดระหว่างเซลล์ (clamp connection) ในขั้นนี้ถือว่า เป็นเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว

การทดลองที่ 2.2 การวัดอัตราการเจริญเติบโตของเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว (monokaryotic mycelium) ที่ได้จากเห็ดสายพันธุ์ L1 และ L2

เมื่อได้เส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวแล้ว นำเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวที่ได้จากสายพันธุ์ L1 และสายพันธุ์ L2 มาผสมแบบพบกันหมดให้ได้ลูกผสมที่มีข้อยึดระหว่างเซลล์ นำคู่ผสมที่สามารถผสมแล้วได้ลูกผสมที่มีข้อยึดระหว่างเซลล์ไปวัดอัตราการเจริญเติบโต

นำเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวที่ได้จาก L1 และ L2 ที่เมื่อจับคู่ผสมกันแล้วได้ลูกผสมที่มีข้อยึดระหว่างเซลล์มาเลี้ยงใน petri-dish ที่มีอาหารวุ้นอยู่เพื่อวัดการเจริญเติบโตของเส้นใย ที่ระดับความเป็นกรดเป็นด่างของอาหารตามผลการทดลองที่ 1

<u>อุปกรณ์และวิธีการ</u>

เหมือนการทดลองที่ 1.1

<u>บันทึกผลการทดลอง</u>

เหมือนการทดลองที่ 1.1

การทดลองที่ 2.3 ไซโมแกรมของเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว (monokaryotic mycelium) ที่ได้จากเห็ดหอมสายพันธุ์ L1 และ L2

เลี้ยงเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวที่ได้จากสายพันธุ์ L1 และ L2 ที่จับคู่ผสมกันแล้วได้ลูกผสมที่มีข้อยึดระหว่างเซลล์โดยใช้ระดับความเป็นกรดด่างและอายุของเส้นใยตามการทดลองที่ 1.2

<u>อุปกรณ์และวิธีการ</u>

เหมือนการทดลองที่ 1.2

การทดลองที่ 2.4 การคัดเลือกลูกผสม

<u>อุปกรณ์</u>

1. เส้นใยนิวเคลียสเดี่ยว (monokaryotic mycelium) ของ L1 และ L2 ที่คัดไว้จากการทดลองที่ 2.1
2. กล้องจุลทรรศน์
3. สีย้อมฟล็อกซิน (phloxin) , สไลด์ , cover slip

4. อาหารวุ้น PDA ในหลอดทดลอง

5. เข็มเขี่ยเชื้อ

วิธีการ

1. นำ เส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวของ L1 และ L2 ที่ได้จากการดักสปอร์ในการทดลองที่ 2.1 มาผสมกันแบบพบกันหมด โดยใช้เข็มเขี่ยตัดเส้นใยของคู่ผสมมาวางใกล้กัน ทิ้งไว้ประมาณ 8-10 วัน เส้นใยทั้งสองจะเจริญชนกัน ทำในตู้ปลอดเชื้อ

2. สะกิดเอาเส้นใยที่เกิดการชนกันออกมา ทำในตู้ปลอดเชื้อ

3. นำไปตรวจหาข้อยึดระหว่างเซลล์ ถ้ามีข้อยึดระหว่างเซลล์ให้คัดเก็บไว้

4. นำไปดัดอีกครั้งโดยดูจากลักษณะการเจริญของเส้นใย ถ้าการเจริญของเส้นใยไม่สม่ำเสมอคัดทิ้งและเก็บเฉพาะเส้นใยที่เจริญดีไว้

การทดลองที่ 2.4.1 การวัดอัตราการเจริญเติบโตของเส้นใยลูกผสม

นำลูกผสมที่ได้ไปเลี้ยงใน petri-dish ที่มีอาหารวุ้น เพื่อวัดการเจริญเติบโต โดยใช้ระดับความเป็นกรดเป็นด่างของอาหารวุ้นจากการทดลองที่ 1.1

อุปกรณ์และวิธีการ

เหมือนการทดลองที่ 1.1

การบันทึกผล

เหมือนการทดลองที่ 1.1

การทดลองที่ 2.4.2 ไซโมแกรม esterase ของลูกผสม

อุปกรณ์และวิธีการ

เหมือนการทดลองที่ 1.2

การทดลองที่ 2.4.3 เปรียบเทียบอัตราการเจริญของเส้นใยและไซโมแกรมของสายเชื้อคู่ผสมกับของลูกผสม

1. นำลักษณะการเดินของเส้นใยของสายเชื้อคู่ผสม กับลูกผสมมาเปรียบเทียบกัน

2. นำค่าเฉลี่ยของอัตราการเจริญของเส้นใยนิวเคลียสคู่ของลูกผสมมาเปรียบเทียบกับเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวที่เป็นสายเชื้อคู่ผสม และนำไปวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ correlation และ regression

3. นำผลของไซโมแกรมที่ได้มาเปรียบเทียบกัน โดยเปรียบเทียบสายเชื้อคู่ผสม กับลูกผสมที่ได้ทั้งจำนวนแถบและตำแหน่งแถบ

การทดลองที่ 2.4.4 การทดสอบผลผลิต

คัดลูกผสมที่ได้จากการผสมระหว่างเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวของ L1 และ L2 ที่คัดไว้มาทดสอบผลผลิต โดยนำลูกผสมทั้งหมดที่คัดไว้ไปเพาะลงถุง 1 สายเชื้อต่อ 4 ถุง โดยใช้ตู้ปลูก (growth chamber) ที่ควบคุมอุณหภูมิ แสงให้เหมาะสมและคงที่

<u>อุปกรณ์</u>

1. ขี้เลื่อยยางพารา
2. รำละเอียด
3. $MgSO_4$
4. ปูนขาว
5. น้ำตาลทราย
6. ยิปซั่ม
7. ถุงพลาสติกทนร้อนขนาด 6.5 x 12.5 นิ้ว
8. จุกสำลี
9. คอขวดพลาสติก
10. หม้อนึ่งความดัน
11. หม้อนึ่งลูกทุ่ง
12. หัวเชื้อข้าวฟ่างลูกผสม
13. ตู้ปลูก (growth chamber)

<u>วิธีการ</u>

1. ผสมวัสดุเพาะเห็ด โดยมีสูตรอาหารดังนี้

ขี้เลื่อย	100	กิโลกรัม
รำละเอียด	10	กิโลกรัม
ปูนขาว	2.5	กิโลกรัม
ยิปซั่ม	1.5	กิโลกรัม
$MgSO_4$	200	กรัม
น้ำตาลทราย	300	กรัม

ผสมให้เข้ากันแล้วปรับความชื้นให้ได้ประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ ผสมให้ความชื้น กระจายสม่ำเสมอ

2. นำส่วนผสมบรรจุในถุงพลาสติกขนาด 6.5 x 12.5 นิ้ว ใส่ถุงละ 800 กรัม อัดให้แน่น ใส่คอขวดใช้ยางรัด ปิดจุกด้วยจุกสำลี หุ้มด้วยกระดาษใช้ยางรัด

3. นำถุงเพาะไปนึ่งด้วยหม้อนึ่งลูกทุ่ง ประมาณ 4 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็น

4. ต่อเชื้อโดยใช้หัวเชื้อข้าวฟ่างที่เป็นลูกผสม ใส่ลงไปในถุงเพาะเชื้อประมาณ 5-10 เมล็ด ทำในห้องต่อเชื้อ

5. ย้ายไปไว้ในตู้ปลูก (growth chamber) รอจนกว่าเชื้อจะเจริญเต็มถุงและรัดตัวเกิดสีน้ำตาลใช้เวลาประมาณ 4 เดือน

6. ทำการกระตุ้นให้เกิดดอกเห็ดโดยให้ก้อนเชื้อที่รัดตัวได้รับความกระทบกระเทือนและเริ่มให้น้ำแก่ก้อนเห็ด

7. เมื่อเห็ดเกิดดอกให้บันทึกข้อมูล

8 หาความสัมพันธ์ระหว่างเส้นใยนิวเคลียสเดี่ยวของสายเชื้อคู่ผสม และเส้นใยนิวเคลียสคู่ของลูกผสมที่เกิดดอกกับผลผลิตของลูกผสมที่ได้

ภาพที่ 5 แสดงตู้ growth chamber

<u>การบันทึกข้อมูล</u>

1. เวลาที่ใช้ในการเจริญของเส้นใยในถุงขี้เลื่อย
2. ลักษณะการเจริญของเส้นใย
3. คุณภาพของดอก
4. ผลผลิต
5. จำนวนถุงต่อสายพันธุ์ที่ออกดอก

สถานที่ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัยและรวบรวมข้อมูล

1. โรงปฏิบัติการเห็ดของภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2. ห้องปฏิบัติการภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย

ตั้งแต่ กรกฎาคม 2543 – มีนาคม 2544

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University