บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. ศึกษาลักษณะอาการของโรครากเน่าและโคนเน่าของสตรอเบอรี่

ทำการเก็บตัวอย่างต้นสตรอเบอรี่ที่แสดงอาการเหี่ยวจากแหล่งปลูกสตรอเบอรี่ของเกษตรกรภายใต้การดูแลของมูลนิธิโครงการหลวง จำนวน 5 แหล่ง คือ

1. ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงแม่แฮ อำเภอสะเมิง จังหวัดเชียงใหม่
2. แปลงปลูกสตรอเบอรี่ของเกษตรกร หมู่บ้านบ่อแก้ว อำเภอสะเมิง จังหวัดเชียงใหม่ (ภายใต้การดูแลของศูนย์วิจัยโครงการหลวงแม่แฮ)
3. สถานีเกษตรหลวงหลวงปางดะ อำเภอสะเมิง จังหวัดเชียงใหม่
4. สถานีวิจัยโครงการหลวงอินทนนท์ อำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่
5. ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงห้วยน้ำริน อำเภอเวียงป่าเป้า จังหวัดเชียงราย

เริ่มต้นด้วยการสำรวจต้นสตรอเบอรี่ที่แสดงอาการเหี่ยวในแปลงปลูกสตรอเบอรี่บันทึกอาการของโรคที่เห็นพร้อมทั้งถ่ายรูป จากนั้นจึงเก็บตัวอย่างของต้นที่แสดงอาการโดยใช้พลั่วมือขุดต้นสตรอเบอรี่ขึ้นมาโดยให้มีรากและดินติดอยู่ด้วย จึงนำมาล้างรากในน้ำสะอาด ตรวจสอบความผิดปกติของราก บริเวณโคนต้น (crown) และผ่าดูภายในลำต้น บันทึกอาการผิดปกติที่เห็น

2. การแยกและจำแนกเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าและโคนเน่าของสตรอเบอรี่

2.1. การแยกเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าและโคนเน่าของสตรอเบอรี่

นำต้นสตรอเบอรี่ที่แสดงอาการเหี่ยวซึ่งได้ล้างทำความสะอาดบริเวณราก และโคนต้นแล้วซับให้แห้งด้วยการวางบนกระดาษกรองที่ปลอดเชื้อ ตัดส่วนที่เป็นโคนต้น แลรากจุ่มในอัลกอฮอล์ 70% แล้วซับให้แห้งอีกครั้งหนึ่งด้วยกระดาษกรองที่ปลอดเชื้อแล้ว นำมาตัดเอาส่วนรากและโคนต้นที่แสดงอาการให้ติดกับเนื้อเยื่อส่วนที่ปกติขนาด 2-3 มิลลิเมตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย 10% Clorox (sodium hypochorite) นาน 3 นาที แล้วนำไปวางบนอาหาร PDA (Potato Dextrose Agar) จำนวน 4 ชิ้น ต่อ 1 จาน โดยขั้นตอนที่กล่าวมาทำภายในตู้ถ่ายเชื้อ (transfer chamber) บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง (เฉลี่ยกลางวัน 30 องศาเซลเซียส กลางคืนประมาณ 25 องศาเซลเซียส) จากนั้นจึงทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์ โดยทำการตัดปลายเส้นใยที่เจริญเร็วกว่า เส้นใยเส้นอื่น ๆ

(Hyphal Tip Isolation Technique) เมื่อเชื้อเจริญเต็มที่ จึงทำการเก็บเชื้อราสาเหตุที่แยกได้ไว้ในหลอดอาหารเอียง (PDA slant) เพื่อทำการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค และจำแนกเชื้อราสาเหตุของโรคต่อไป

2.2. การจำแนกและศึกษาลักษณะเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าและโคนเน่าของสตรอเบอรี่

ศึกษาการเจริญเติบโตของเส้นใย และการสร้างสปอร์โดยเตรียมแผ่นสไลด์แก้ว (glass slide) ที่อยู่ในจานอาหารที่มียางรัดวงเล็กรองแผ่นสไลด์ และมี กระดาษกรองรองที่ก้นจาน 1 แผ่น โดยอุปกรณ์ทั้งหมดผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นตัดชิ้นวุ้นอาหาร PDA ขนาด 0.5 x 0.5 เซนติเมตร ลงบนแผ่นสไลด์แก้ว ปลูกเชื้อราสาเหตุที่แยกได้ ในข้อ 2.1 ลงบนชิ้นวุ้นทั้ง 2 ด้าน ปิดด้วยแผ่นปิดสไลด์ (cover slide) เติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วลงบนกระดาษกรองในจานอาหารพอชุ่ม จาก นั้นปิดฝาจานอาหารบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 3-5 วัน จึงนำมาตรวจดูลักษณะการเจริญของเชื้อโดยย้อมสีด้วย crystal violet เข้มข้น 0.1% ใน lactophenol ตรวจสอบลักษณะของเส้นใย conidiophore และ conidia ภายใต้ กล้องจุลทรรศน์ พร้อมทั้งจำแนกเชื้อสาเหตุ

2.3 การย้อมนิวเคลียสเชื้อราสกุล *Rhizoctonia*

การย้อมนิวเคลียสของเชื้อ *Rhizoctonia* spp. โดยวิธีย้อมด้วยสี Giemsa ทำการเตรียมเชื้อ *Rhizoctonia* spp. บนแผ่นสไลด์แก้วที่เทอาหาร PDAบาง ๆ เป็นเวลา 3 วัน เมื่อเจริญได้ระยะที่ต้องการแล้วทำตามขั้นตอนดังนี้ คือหยด Giemsa บนเชื้อทิ้งไว้นาน 1 นาที ล้างออกด้วย KOH 3% 1 ครั้ง แล้วล้างออกด้วย KOH 3% อีกครั้ง และล้างด้วยน้ำกลั่นหลาย ๆ ครั้ง ปิด cover slide ตรวจดูการติดสีโดยใช้น้ำกลั่นเป็น mounting medium (นิพนธ์, 2544)

3. การแยกเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์จากดิน

เก็บตัวอย่างดินจากแหล่งปลูกสตรอเบอรี่จำนวน 5 แหล่ง ดังที่กล่าวมาแล้วในข้อ 1 โดยเก็บจากบริเวณรอบรากพืชที่ความลึกจากผิวหน้าดิน 15-50 เซนติเมตร จำนวน 5 จุด ประมาณ 200 กรัม นำดินที่เก็บมาได้ผสมคลุกเคล้าให้เข้ากันแล้วนำมาแยกเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธี Soil Dilution Plate บนอาหาร PDA อย่างเดียว และ PDA ที่เติม Rose Bengal 50 ไมโครกรัม /มิลลิลิตร โดยชั่งดินมา 10 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ (Flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้ว 90 มิลลิลิตร เขย่าดินให้เข้ากับน้ำนาน 15 นาที แล้วทำให้เจือจางความเข้มข้นตั้งแต่ 10^{-1} ถึง 10^{-5} แล้วนำเฉพาะ ความเข้มข้น 10^{-3} และ 10^{-5} มาแยกโดยใช้ปิเปตดูดสารละลายดินแขวนลอย (soil suspension) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร หยดลงบนอาหารที่เตรียมไว้ แล้วใช้แท่งรูป

ตัวแอล (L) เกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหารบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3-5 วัน เมื่อพบการเจริญของเชื้อออกเป็นโคโลนีเดี่ยว ๆ จึงย้ายเชื้อจากแต่ละโคโลนีไปเลี้ยงและทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีแยกแบบ Hyphal Tip เพื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อสาเหตุของโรครากเน่าและโคนเน่าที่แยกได้จากข้อ 2.1 ต่อไป

4. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าและโคนเน่าของสตรอเบอรี่

นำเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่แยกได้ จากข้อ 3 มาทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุที่แยกและจำแนกไว้แล้วจาก ข้อ 2.1 และ 2.2 คือ เชื้อ bunucleate *Rhizoctonia* sp., *Fusarium oxysporum* และเชื้อ *Colletotrichum fragariae* โดยนำจาก stock culture มาเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน แล้วใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ตัดบริเวณโคโลนีรอบนอกของในส่วนที่มีการเจริญของเชื้อสม่ำเสมอ แล้วย้ายไปวางบนอาหาร PDA ที่อยู่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (Petri dish) ขนาด 9 เซนติเมตร ทำการทดสอบโดยใช้วิธี Bi-culture (Dual Culture) ภายใต้สภาพปลอดเชื้อ โดยทำในตู้ transfer chamber จากนั้นใช้ loop ที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้วย้าย culture disc ของเชื้อราสาเหตุ วางห่างจากขอบจานอาหาร 2.5 เซนติเมตร จากนั้นใช้ loop ที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้วย้าย culture disc ของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ มาวางห่างจากขอบจานอีกด้านหนึ่ง 2.5 เซนติเมตร วางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) โดยทำ 5 ซ้ำ (จาน) ในแต่ละกรรมวิธี บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องสังเกตุและบันทึกผลการเจริญของเชื้อราสาเหตุโดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีของเชื้อราสาเหตุ โดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของเชื้อราสาเหตุโรคจากชุดควบคุม และการทดสอบ Bi-culture แล้วคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อเชื้อสาเหตุโรคตามสูตร $\frac{(R1 - R2)}{R1} \times 100$ ดังภาพที่ 6

การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง

$$\% \text{ inhibition} = \frac{(R1 - R2) \times 100}{R1}$$

โดย R1 = เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราในชุดควบคุม

R2 = เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราสาเหตุในจานอาหารเลี้ยงร่วม

โดยประมาณค่าดังนี้ (เกษม, 2532)

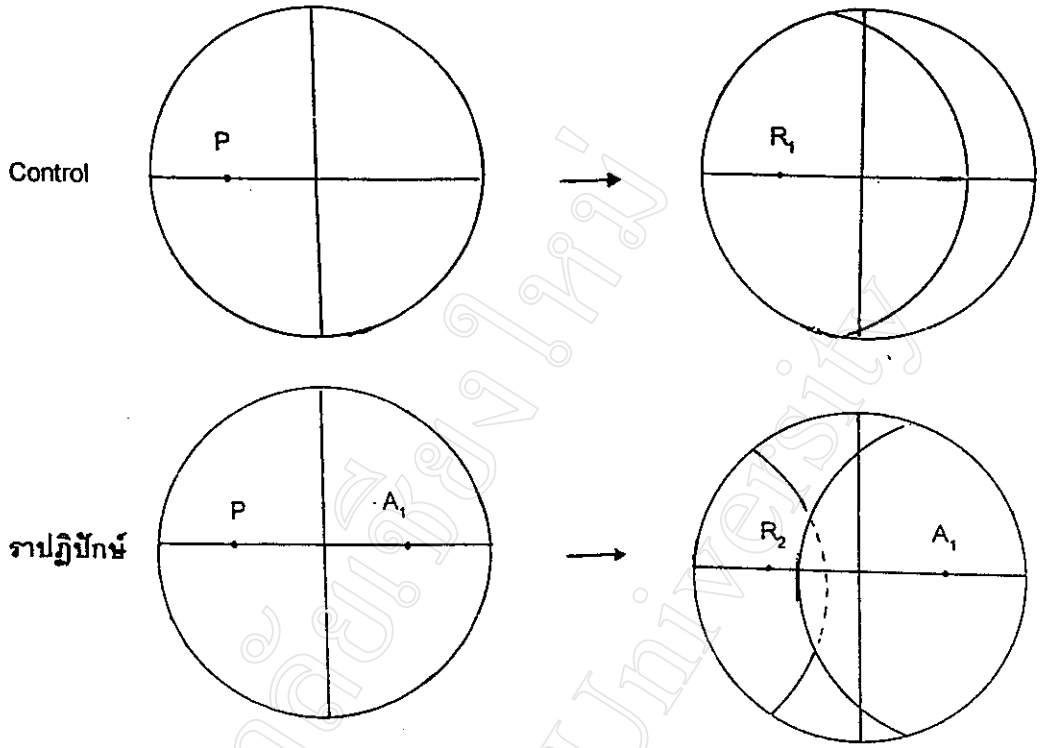
>75% = มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงมาก (very high antagonistic activity)

61-75% = มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูง (high antagonistic activity)

51-60% = มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลาง (moderate antagonistic activity)

<50% = มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำ (low antagonistic activity)

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University



P = เชื้อราสาเหตุโรคพืช (pathogen)

A = เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (antagonist)

R1 = เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราในชุดควบคุม

R2 = เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราสาเหตุในจานอาหารเลี้ยงร่วม

ภาพที่ 6 ลักษณะการเลี้ยงเชื้อด้วยวิธี Bi-culture (Dual Culture)

5. การจำแนกเชื้อ *Trichoderma* ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าและโคนเน่าของสตรอเบอรี่

จำแนกเชื้อ *Trichoderma* ที่ทำการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ binucleate *Rhizoctonia* sp., *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* และ *Colletotrichum fragariae* ตามข้อ 4 พบว่ามีเชื้อ *Trichoderma* spp. 15 ไอโซเลท (isolate) ที่มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมเชื้อสาเหตุทั้ง 3 ชนิด จึงทำการ จำแนกเชื้อ *Trichoderma* spp. โดยเลี้ยงเชื้อบนอาหาร PDA นาน 7 วัน จึงนำมาตรวจลักษณะของ conidiophore วัดขนาดและบันทึกรูปร่างของ phialide และ phialospore โดยวัดด้วย ocular micrometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (compound microscope) รวมทั้งบันทึกรูปร่าง (shape) และ ผนัง (wall) และบันทึกการเจริญสีของโคโลนีของเชื้อด้วย

6. การศึกษากลไกการเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อ *Trichoderma* ต่อเชื้อรา binucleate *Rhizoctonia* sp.

ศึกษาลักษณะการเข้าทำลายของเชื้อ *Trichoderma* ต่อ binucleate *Rhizoctonia* sp. โดยวิธี Dual Slide Culture ดังข้อ 2.2 แต่จะทำการปลูกเชื้อสาเหตุ และเชื้อ *Trichoderma* บนชิ้นวุ้นคนละด้านกัน จากนั้นปิดด้วยแผ่นปิดสไลด์ บ่มไว้ในจานอาหารที่ให้ความชื้นเพียงพอ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 3 วัน จากนั้นจึงตรวจดูโดยนำแผ่นสไลด์ที่มีการเจริญของเชื้อ ใช้ loop ที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้วยกแผ่นปิดสไลด์ออกพร้อมทั้งตักชิ้นวุ้นออกด้วยย้อมสีด้วย 0.1% crystal violet ใน lactophehol แล้วนำแผ่นสไลด์แผ่นใหม่มาปิดทับลงไป ส่วนแผ่นปิดสไลด์ที่มีเส้นใยของเชื้อราเจริญอยู่ นำแผ่นสไลด์แผ่นใหม่ที่สะอาดมาหยดด้วย หยด 0.1% crystal violet ใน lactophenol ลงไปก่อนปิดทับด้วยแผ่นสไลด์ดังกล่าว นำไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ศึกษาถึงลักษณะและปฏิกิริยาของเชื้อ *Trichoderma* ที่มีต่อเชื้อราสาเหตุ

7. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* ในการควบคุมโรครากเน่าและโคนเน่าของสตรอเบอรี่ในโรงเรือน

7.1 การเพิ่มปริมาณเชื้อสาเหตุ และ *Trichoderma* ในเมล็ดข้าวฟ่าง

การเพิ่มปริมาณของเชื้อสาเหตุ และ *Trichoderma* ใช้วิธีเลี้ยงแบบเดียวกันคือ เลี้ยงบนเมล็ดข้าวฟ่างที่ต้มสุกและนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว โดยเริ่มจากต้มเมล็ดข้าวฟ่างให้สุกโดยสังเกตุจากเมล็ดจะเริ่มปริแตกออกประมาณ 4-5 เมล็ด กรองน้ำทิ้ง ล้างด้วยน้ำสะอาดอีกประมาณ 2-3 ครั้ง ผึ่งให้พอแห้งหมาด ๆ จากนั้นบรรจุลงถุงพลาสติกทนร้อน 250 กรัม/ถุง ปิดปากถุงให้สนิท จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นนำเชื้อที่ต้องการขยายปริมาณ ซึ่งได้ทำการเลี้ยงเชื้อไว้บนอาหาร PDA นาน 7 วัน ใช้เข็มเขี่ยที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้วตัดชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยและสปอร์ของเชื้อเจริญอยู่ ใส่ลงในถุงที่บรรจุเมล็ดข้าวฟ่าง โดยทำภายใต้สภาพปลอดเชื้อ เขย่าถุงเบา ๆ เพื่อให้สปอร์ของเชื้อกระจายลงสู่ข้าวฟ่างในถุง แล้วบ่มเชื้อไว้ในห้องที่ร่มและเย็น อากาศถ่ายเทสะดวก ไม่มีมดและแมลงรบกวน หลังบ่มเชื้อ 2 วัน เขย่าถุงอีกครั้งเพื่อให้เส้นใยกระจายตัว เมื่อเชื้อราเจริญเต็มถุง จึงนำไปใช้ทดลองต่อไป

7.2 การเตรียมดินปลูก

การเตรียมดินปลูกโดยนำดินที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ผสมวัสดุปลูกในสัดส่วนดังนี้ ดิน 5 ส่วน :แกลบ 1 ส่วนและปุ๋ยหมัก 1 ส่วน คลุกเคล้าให้เข้ากัน จากนั้นบรรจุกระถางปลูกขนาด 5x7 นิ้ว ปริมาณ 800 กรัม ต่อกระถาง

7.3 การทดสอบประสิทธิภาพของ *Trichoderma* ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรครากเน่าและและโคนเน่าในโรงเรือน

ทำการปลูกเชื้อโดยการผสมเชื้อราสาเหตุ และเชื้อราปฏิปักษ์ที่เตรียมไว้ในข้อ 7.1 โดยผสมราสาเหตุซึ่งมี 3 ชนิดต่าง กันคือ binucleate *Rhizoctonia* sp., *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* และ *Colletotrichum fragariae* โดยนำเชื้อราสาเหตุอย่างละ 40 กรัม และ *Trichoderma* 40 กรัม เทลงในถุงพลาสติกที่มีดินปลอดเชื้อ (ข้อ 7.2) ปลูกผสมคลุกเคล้าให้เข้ากันอย่างดีแล้วจึงเทลงในกระถางปลูก จากนั้นจึงปลูกกล้าสตรอเบอรี่พันธุ์พระราชทาน 70 ซึ่งได้ต้นกล้าสตรอเบอรี่มาจาก สถานีวิจัยโครงการหลวงอินทนนท์ อำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่ ดังรายละเอียดของแผนงานทดลองดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ชุดควมคุม หรือ Control (ไม่ปลูกเชื้อ ไม่ใส่ *Trichoderma*)
กรรมวิธีที่ 2 ปลูกเชื้อสาเหตุเพียงอย่างเดียว
กรรมวิธีที่ 3 ปลูกเชื้อสาเหตุ + *T. hamatum* (T200-2)
กรรมวิธีที่ 4 ปลูกเชื้อสาเหตุ + *T. viride* (T2000-5)
กรรมวิธีที่ 5 ปลูกเชื้อสาเหตุ + *T. harzianum* (T2000-6)
กรรมวิธีที่ 6 ปลูกเชื้อสาเหตุ + *T. koningii* (T2000-10)
กรรมวิธีที่ 7 ปลูกเชื้อสาเหตุ + *T. pseudokoningii* (T2000-14)

วางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) โดยทำการทดลองกรรมวิธีละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ต้น ดูแลรดน้ำเป็นประจำทุกวัน สังเกตุการเกิดอาการของโรคบันทึกผลและประเมินการเกิดโรคของพืชแต่ละต้น โดยให้ระดับต่าง ๆ คือ

ระดับที่ 0 = ไม่แสดงอาการของโรค
ระดับที่ 1 = ใบแสดงอาการเหี่ยว 1 ใบ
ระดับที่ 2 = ใบแสดงอาการเหี่ยว 2-3 ใบ
ระดับที่ 3 = ทุกใบแสดงอาการเหี่ยว ยกเว้นใบที่ส่วนยอด
ระดับที่ 4 = ทุกใบแสดงอาการเหี่ยว
ระดับที่ 5 = พืชเหี่ยวแห้ง ตายทั้งต้น

การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค ดังนี้ (สืบศักดิ์, 2540)

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค} = \frac{\text{ผลรวมของการเป็นโรคแต่ละระดับ}}{\text{จำนวนต้นพืชที่สุ่ม}} \times \frac{100}{\text{ระดับสูงสุดของการเป็นโรค}}$$

8. การทดสอบประสิทธิภาพของ *Trichoderma* ในการควบคุมโรครากเน่าและโคนเน่าของสตรอเบอรี่ในแปลงปลูก

8.1 การเตรียมเชื้อ *Trichoderma*

ขยาย *Trichoderma* ในเมล็ดข้าวฟ่าง เหมือนกับข้อ 7.1 เมื่อเชื้อรา*Trichoderma* เจริญสร้างสปอร์สีเขียวเต็มถุงแล้ว นำมาขยายเชื้อต่อเพื่อที่จะนำไปรองก้นหลุมก่อนปลูกต้นสตรอเบอรี่ โดยนำหัวเชื้อที่เตรียมไว้มาผสมกับรำและปุ๋ยหมักในอัตราส่วน *Trichoderma* 1 ส่วน: รำ 10 ส่วน และปุ๋ยหมัก 40 ส่วนโดยน้ำหนักนำมาคลุกเคล้าให้ผสมกันโดยรดน้ำขณะผสมให้กองปุ๋ยหมักที่ผสมนี้ชื้นพอดี จึงเกลี่ยกองปุ๋ยหมักเป็นกองสี่เหลี่ยมเตี้ย ๆ แล้วใช้พลาสติกคลุมไว้ประมาณ 1 สัปดาห์ *Trichoderma* มีเส้นใยเจริญทั่วกองปุ๋ยหมัก จึงพร้อมที่จะไปผสมดินรองก้นหลุมก่อนปลูกสตรอเบอรี่ต่อไป

8.2 การเตรียมแปลงปลูกสตรอเบอรี่

ใช้แปลงปลูกสตรอเบอรี่ที่สถานีวิจัยโครงการหลวงอินทนนท์ อำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่ เป็นสถานีทดลองโดยทำการขุดดินตากแดดไว้ประมาณ 5-7 วัน และทำการวัด pH ของดินได้เท่ากับ 6.5 และเตรียมแปลงโดยผสมปุ๋ยหมักอัตรา 1 กิโลกรัมต่อตารางเมตร และใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 16-16-16 อัตรา 50 กรัมต่อตารางเมตรผสมคลุกเคล้าดินให้ทั่ว จากนั้นขึ้นแปลงปลูกขนาดกว้าง x ยาว x สูง เท่ากับ 0.5 x 4 x 0.3 เมตร ระยะห่างระหว่างแปลง 50 เซนติเมตร จำนวน 12 แปลง และคลุมแปลงด้วยใบตองตึง เจาะหลุมปลูกให้มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 เซนติเมตร จำนวน 30 หลุมต่อแปลง โดยมีระยะห่างระหว่างหลุม 30 x 30 เซนติเมตร แล้วรองก้นหลุมด้วยเชื้อ *Trichoderma* ที่เตรียมไว้ในข้อ 8.2 ผสมกับดินในหลุมปลูกลึกประมาณ 10 เซนติเมตร ในอัตรา 20 กรัม (1 ช้อนแกง) ต่อหลุม ตามกรรมวิธีต่าง ๆ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ชุมควบคุม หรือ Control
กรรมวิธีที่ 2 *T. hamatum* (T2000-2)
กรรมวิธีที่ 3 *T. viride* (T2000-5)
กรรมวิธีที่ 4 *T. harzianum* (T2000-6)
กรรมวิธีที่ 5 *T. koningii* (T2000-10)
กรรมวิธีที่ 6 *T. pseudokoningii* (T2000-14)

ทำการปลูกต้นสตรอเบอรี่พันธุ์พระราชทาน 70 ลงในแปลงทำการวางแผนการทดลองแบบ RCBD (Randomized Complete Block Design) โดยทำ 2 การทดลอง การลดลองละ 3 ซ้ำ ๆ ละ 10 ต้น ตรวจแปลงปลูกสตรอเบอรี่สังเกตการเกิดโรคบันทึกอาการทุก ๆ 2 สัปดาห์ รวม 8 สัปดาห์ บันทึกอาการและประเมินความรุนแรงของโรคดังที่อธิบายไว้ในข้อ 7.3