บทที่ 4
สรุปผลการทดลอง

1. <u>ตรวจสอบ และ แยกราเอคโตไมคอร์ไรซ่า จากรากของกล้าสน</u> จากการแยกราเอคโตไมคอร์ไรซ่าจากรากของกล้าสนเขาจากแหล่งต่างๆของประเทศ โดยการตัดส่วนของรากที่มีราเอคโตไมคอร์ไรซ่าและวางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MMN ชนิดแข็ง พบว่ามีการปนเปื้อนจากราในกลุ่ม *Penicilium* spp. และ ราในกลุ่ม *Aspergillus* spp. เป็นจำนวนมาก และเนื่องจากราเอคโตไมคอร์ไรซ่าเจริญได้ช้ากว่าราที่ปนเปื้อนตามธรรมชาติ จึงทำให้ไม่สามารถแยกราเอคโตไมคอร์ไรซ่าให้บริสุทธิ์ได้ ดังนั้นจึงต้องทำการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมที่จะทำลายเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนที่ผิวของรากแต่ไม่มีผลต่อราเอคโตไมคอร์ไรซ่า เพื่อแยกราเอคโตไมคอร์ไรซ่าจากรากกล้าสนให้บริสุทธิ์ตามต้องการ จากการทดลองพบว่าเมื่อทำการล้างชิ้นส่วนของรากสนที่ตัดออกมาในขั้นแรกด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่ผสมด้วย Tween 80 โดยใช้อัตราส่วน Tween 80 จำนวน0.2 มล.ต่อน้ำ 1 ลิตร และใช้เมอร์คิวริคคลอไรด์ (mercuric chloride)เข้มข้น 100 ppm เป็นสารใช้ฆ่าเชื้อที่บริเวณผิวของรากโดยใช้เวลาฆ่าเชื้อนาน 3 นาที จะทำให้เชื้อที่ปนเปื้อนลดจำนวนลง และสามารถที่จะแยกราเอคโตไมคอร์ไรซ่าออกจากรากกล้าสนให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ตามต้องการ Marx(108) และ Zak (134) ได้ใช้น้ำผสมสารที่ช่วยลดแรงตึงผิวเช่น Tween 80 จำนวนเล็กน้อย ล้างชิ้นส่วนรากก่อนที่จะทำการแยกราเอคโตไมคอร์ไรซ่าโดย Tween 80 จะช่วยให้เชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนที่ผิวของรากหลุดออกจากรากได้มากขึ้น ซึ่งมีผลทำให้การฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนที่ผิวของรากด้วยสารฆ่าเชื้อที่บริเวณผิวของราก มีประสิทธิภาพมากขึ้น สำหรับสารที่ใช้ในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนที่ผิวของรากนั้น Marx(108) ได้ทำการทดลองเพื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติของสารหลายชนิด และได้แนะนำให้ใช้ 100 ppm Mercuric chlorie , 5 % Sodium hypochlorite และ 30 % Hydrogenperoxide เป็นสารที่ใช้ในการฆ่าเชื้อที่บริเวณผิวของราก ซึ่งในการใช้สารดังกล่าวนี้จำเป็นที่จะต้องทำการทดลองหาเวลาที่เหมาะสมในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนเสียก่อน เนื่องจากสารที่ใช้ในการฆ่าเชื้อแต่ละชนิดจะให้ผลดีที่เวลาแตกต่างกัน(108) ทั้งนี้หลังจากที่ได้ทำการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนที่

ผิวรากแล้วในการแยกเชื้อบริสุทธิ์จะสนใจแยกเฉพาะราที่เจริญจากชิ้นส่วนของรากสนหลังจากทำการบ่มนานหนึ่งสัปดาห์ไปแล้วเนื่องจากราเอคโตไมคอร์ไรซ่าสามารถเจริญได้ช้าบนอาหารเลี้ยงเชื้อดังที่ได้กล่าวมาแล้วในข้างต้น จากการศึกษาลักษณะภายนอกของราเอคโตไมคอร์ไรซ่าที่แยกได้สามารถแยกราเอคโตไมคอร์ไรซ่าออกได้เป็น 5 กลุ่ม ดังแสดงในตารางที่ 7 และได้คัดเลือกตัวแทนราเอคโตไมคอร์ไรซ่าจากทั้ง 5กลุ่ม ได้แก่ Surin 1, Pisanulok 2 , Saraburi 3 , Tak 4 และ Ubolrachathani 3 สำหรับที่จะใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป

2.การเตรียม Inoculum ของราเอคโตไมคอร์ไรซ่าที่แยกได้ การที่จะทำให้รากพืชติดเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซ่านั้น สิ่งสำคัญประการหนึ่งที่ต้องคำนึงถึงคือการเตรียม Inoculum และการเตรียมจำเป็นต้องใช้ Inoculum medium เพื่อให้ได้เชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซ่าที่บริสุทธิ์จำนวนมากพอ Inoculum medium ที่ใช้ในการทดลองนี้ประกอบด้วย ดินพรุ เวอร์มิคิวไลท์ และ อาหารเลี้ยงเชื้อ MMN ชนิดเหลว ซึ่งเป็น Inoculum medium ชนิดที่เสนอแนะโดย Marx(108) ซึ่งMarx ได้รายงานถึงการทดลองเตรียม Inoculum medium สำหรับราเอคโตไมคอร์ไรซ่า เพื่อใช้ในการทดลอง โดยการใส่ราเอคโตไมคอร์ไรซ่าใน Inoculum medium ที่ประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ MMN เหลว เวอร์มิคิวไลท์ และ พีท บ่มเก็บที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ถึง 4 เดือน เนื่องจากองค์ประกอบต่างๆของ Inoculum medium ที่ใช้ในการทดลองนี้มีค่าความเป็นกรดด่างที่แตกต่างกัน โดยดินพรุมีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 4.05 เมื่อละลายทั้งในน้ำกลั่นซึ่งมีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.0 และในอาหารเลี้ยงเชื้อ MMN ชนิดเหลวซึ่งมีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.2 ในขณะที่เวอร์มิคิวไลท์มีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6.2 เมื่อละลายในน้ำกลั่นซึ่งมีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.0 และมีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.9 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MMN ชนิดเหลวซึ่งมีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.2 ดังนั้นการศึกษาจึงมุ่งที่จะหาอัตราส่วนที่เหมาะสมขององค์ประกอบของ Inoculum medium ที่จะทำให้ Inoculum medium มีค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมที่จะทำให้ราที่แยกได้มีอัตราการเจริญสูงสุด จากตารางที่ 9 แสดงให้เห็นว่ามีอัตราส่วนที่มีค่าความเป็นกรดด่างใกล้เคียงกับค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ MMN เริ่มต้น คือ

5.0 ถึง 5.5 อยู่ 4 อัตราส่วน ได้แก่อัตราส่วนของ ดินพรุ ต่อ เวอร์มิคิวไลท์เท่ากับ 1:30 ,1:40 ,1:50 และ 1:60 เมื่อทำการวัดการอัตราการเจริญเติบโตของราเอคโตไมคอร์ไรซ่าที่แยกได้ที่ได้จากข้อ 1 ทั้ง 5 ชนิด ซึ่งเลี้ยงในInoculum medium ทั้ง 4 อัตราส่วน โดยอาศัยปริมาณของ เอ็นอะซิทิลกลูโคซามีน ซึ่งเป็นส่วนประกอบในผนังเซลของราเอคโตไมคอร์ไรซ่ามาเป็นดัชนีเปรียบเทียบพบว่าInoculum medium ที่มีอัตราส่วนของ ดินพรุ ต่อ เวอร์มิคิวไลท์เท่ากับ 1 ต่อ 50 ซึ่งมีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.34 มีกลูโคซามีนในในปริมาณมากที่สุด คือราเอคโตไมคอร์ไรซ่า Surin 1, Pisanulok2 , Saraburi 3 , Tak 4 และ Ubolrachathani 3 มีปริมาณกลูโคซามีนเท่ากับ 2.50,2.55,2.50, 2.70 และ 2.60 มก. ต่อ ก. ของ Inoculum medium ได้มีนักวิจัยหลายๆท่านใช้ Inoculum medium ที่มีองค์ประกอบหลักเป็นเวอร์มิคิวไลท์ในการทดลอง (113,114,115 ,116,117,118,119) โดยมีรา *P. tincthorius* เป็นราเอคโตไมคอร์ไรซ่า พบว่า Inoculum medium ชนิดนี้ให้ผลดีในการสร้างเอคโตไมคอร์ไรซ่ากับพืชเช่น พืชตระกูลสนเขา พีแคน(pecan) และโอ๊ค Marx(135) ทำการทดลองปลูกพืชตระกูลสนโดยวิธี Bare-root nurseries ในรัฐ Georgia, Florida, North Carolina, Verginia(136), Oklahoma(137) และ Mississippi(108) โดยใช้ Inoculum medium ชนิดเดียวกันนี้ พบว่าราเอคโตไมคอร์ไรซ่าที่ใช้สามารถสร้างเอคโตไมคอร์ไรซ่ากับพืชตระกูลสนได้เป็นอย่างดี และพืชที่มีการสร้างเอคโตไมคอร์ไรซ่าดังกล่าว มีอัตราการเจริญที่สูงกว่าพืชชุดควบคุมซึ่งไม่มีการสร้างเอคโตไมคอร์ไรซ่าอย่างเห็นได้ชัด นอกจากนี้ยังได้มีการทดลองใช้ Inoculum medium ที่มีเวอร์มิคิวไลท์เป็นองค์ประกอบหลักและมี *P. tincthorius* เป็นราเอคโตไมคอร์ไรซ่าโดยให้มีการสร้างเอคโตไมคอร์ไรซ่ากับพืชในภาชนะเพาะปลูก (Container-grown tree seedling) ซึ่ง Marx(121) Marx และ Barnett(138) Ruehle และ Marx(122) Molina(123) Dixon และคณะ(124) Maronek และ Hendrix(125) Pawuk และคณะ(126) และ Ruehle(139) ได้รายงานว่า ราเอคโตไมคอร์ไรซ่าที่ใช้สามารถสร้างเอคโตไมคอร์ไรซ่ากับพืชที่ใช้ในการทดลองได้เป็นอย่างดี และพืชที่มีการสร้างเอคโตไมคอร์ไรซ่าดังกล่าวมีอัตราการเจริญที่สูงกว่าพืชชุดควบคุมซึ่งไม่มีการสร้างเอคโตไมคอร์ไรซ่าอย่างเห็นได้ชัดอีกด้วย

3. <u>หาสภาวะที่เหมาะสมต่อการฆ่าเชื้อที่ผิวของเมล็ดสนสามใบ</u> จากการทดลองเพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการฆ่าเชื้อที่ปนเปื้อนที่ผิวของเมล็ดสนสามใบ โดยใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารฆ่าเชื้อพบว่าระยะเวลาที่ให้ผลดีที่สุดในการฆ่าเชื้อที่ผิวของเมล็ดสนสามใบ คือเวลา 3 นาที ขึ้นไป ซึ่งจากการทดลองไม่พบการปนเปื้อนของเชื้ออื่นๆ ดังแสดงในตารางที่ 15 และ 16 ทั้งนี้สำหรับสารเคมีที่จะนำมาใช้เป็นสารฆ่าเชื้อนั้น Marx(108) ได้แนะนำให้ใช้สารเคมีหลายชนิดเช่น 100 ppm mercuric chloride ,5 % sodium hypochlorite และ 30% Hydrogenperoxide ซึ่งในการใช้สารเหล่านี้จำเป็นที่จะต้องทำการทดลองหาเวลาที่เหมาะสมในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนเสียก่อนที่จะนำไปใช้ เนื่องจากสารเคมีแต่ละชนิดจะให้ผลดีในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในเวลาที่แตกต่างกัน และเมล็ดพืชที่ใช้ในการทดลองแต่ละครั้งก็จะมีจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนที่แตกต่างกัน เมล็ดพืชต่างชนิดกันก็จะมีความยากง่ายในการฆ่าเชื้อที่ปนเปื้อนอยู่ที่ต่างกัน ซึ่งจะทำให้เวลาที่เหมาะสมที่จะใช้ในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนที่ผิวของเมล็ดแตกต่างกันออกไปด้วย จากตารางที่ 16 พบว่าไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่มีความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีผลต่อการงอกของเมล็ดสนสามใบเนื่องจากเมื่อทำการทดลองชุดควบคุมโดยเพาะเมล็ดสนสามใบซึ่งแช่ในน้ำประปาในเวลาต่างๆกัน พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดสนสามใบใกล้เคียงกับเมื่อแช่เมล็ดสนสามใบในไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ โดยในชุดควบคุมที่แช่เมล็ดสนสามใบในน้ำประปาเป็นเวลา 0.5,1,2,3 และ 4 นาที มีเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดสนสามใบที่ได้เท่ากับ 81.82 % , 81.82 % , 80.00 % , 81.82 % และ 83.60 % ตามลำดับ ในขณะที่เมล็ดสนสามใบที่แช่ในสารละลาย ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่มีความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 0.5, 1, 2, 3, 4 นาที มีเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดสนสามใบที่ได้เท่ากับ 83.64 %, 80.00 %, 83.60 % , 85.45 % และ 81.82 % ตามลำดับ เมื่อทำการทดสอบทางสถิติพบว่าเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดสนสามใบที่ได้จากชุดการทดลองทั้งสองไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากรายงานของพิณ เกื้อกูล(2) ซึ่งได้ทำการทดลองเพาะเมล็ดไม้สนเขา ที่ศูนย์เพาะชำกล้าไม้บ่อแก้วจังหวัดเชียงใหม่พบว่าการงอกของเมล็ดไม้สนเขาโดยทั่วไปจะงอกหลังจากทำการเพาะแล้วประมาณ 7-10 วัน และมีอัตรางอกโดยเฉลี่ยของเมล็ดเท่ากับ 90 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การทดลองนี้มีอัตราการงอกโดยเฉลี่ยของเมล็ดเท่ากับ 80.00 เปอร์เซ็นต์

4. <u>เปรียบเทียบอัตราการเจริญของสนสามใบ ที่ใส่ราเอคโตไมคอร์ไรซ่าที่แยกได้กับชุดควบคุมที่ไม่ได้ใส่ราเอคโตไมคอร์ไรซ่า</u> จากการเปรียบเทียบการเจริญของสนสามใบที่ใส่ราเอคโตไมคอร์ไรซ่าที่แยกได้ ซึ่งได้แก่ Surin 1, Pisanulok 2, Saraburi 3, Tak 4 และ Ubolrachathani 3 กับชุดควบคุมซึ่งไม่ได้ใส่ราเอคโตไมคอร์ไรซ่าจะเห็นได้ว่าสนสามใบที่ปลูกโดยใส่ราเอคโตไมคอร์ไรซ่าที่แยกได้ในทุกชุดการทดลองมีอัตราการเจริญที่สูงกว่าสนสามใบซึ่งปลูกโดยไม่ได้ใส่ราเอคโตไมคอร์ไรซ่า ในแง่ของ parameter ต่างๆได้แก่ความยาวของลำต้น ความยาวของราก น้ำหนักแห้งของต้น น้ำหนักแห้งของราก เส้นผ่าศูนย์กลางของลำต้น และ ปริมาณธาตุไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโปแตสเซี่ยม พบว่าทุกชุดการทดลองซึ่งใส่ราเอคโตไมคอร์ไรซ่าที่แยกได้ มีค่าที่ได้โดยเฉลี่ยมากกว่าชุดการทดลองซึ่งไม่ได้ใส่ราเอคโตไมคอร์ไรซ่า และ เมื่อทำการทดสอบทางสถิติโดยการทดสอบสมมติฐานของผลต่างระหว่างค่าเฉลี่ยประชากร (Duncan multiple range test) จากข้อมูลที่มีอยู่พบว่าค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลองมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจากการเปรียบเทียบการเจริญของพืชตระกูลสนที่ใช้ในการทดลองโดยการวัด parameter ต่างๆเหล่านี้อาทิเช่นการวัดความยาวของลำต้น ความยาวของราก น้ำหนักแห้ง และน้ำหนักสดของลำต้น น้ำหนักแห้งและน้ำหนักสดของราก ซึ่งรายงานโดย Marx และ Artman(118) Marx และ Ruehle(122) การวัดเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดซึ่งรายงานโดย Marx(117) Marx และ Artman(118) Marx และ Bryan(140) Medve (119) และ Ruehle (139) การวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของลำต้นซึ่งรายงานโดย Marx และArtman(118) และRuehle(139) และ การวัดปริมาณธาตุ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโปแตสเซี่ยมซึ่งรายงานโดย Marx และ Artman (118) ในพืชตระกูลสนซึ่งใส่ราเอคโตไมคอร์ไรซ่า พบว่ามีค่าที่ได้สูงกว่าชุดควบคุมซึ่งไม่ได้ใส่ราเอคโตไมคอร์ไรซ่าและแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นกัน คุณสมบัติที่สำคัญประการหนึ่งของราเอคโตไมคอร์ไรซ่าที่อาศัยอยู่ที่บริเวณรากพืช คือจะช่วยเพิ่มเนื้อที่ในการดูดซับและช่วยเพิ่มอัตราการดูดซับแร่ธาตุและสารอาหารที่จำเป็นแก่การเจริญเติบโตของพืชให้แก่พืช ซึ่งจะทำให้พืชมีอัตราการเจริญที่สูงขึ้น เมื่อพิจารณาถึงผลการทดลองที่ได้ในข้อ 4.4.8 จากตารางที่ 24 ซึ่งแสดงให้เห็นถึงเปอร์เซ็นต์การติดราเอคโตไมคอร์ไรซ่าที่รากกล้าสนสนสามใบ ซึ่งจะพบว่าในชุดการทดลองซึ่งไม่ได้ใส่ราเอคโตไมคอร์ไรซ่านั้น ไม่พบการติดราเอคโตไมคอร์ไรซ่าที่บริเวณรากของกล้าสนสามใบชุดดังกล่าว ในขณะที่ทุกชุดการทดลองที่ใส่ราเอคโตไมคอร์ไรซ่า

สามารถตรวจพบการติดราไมคอร์ไรซ่าที่บริเวณรากของกล้าสนสามใบได้ในเปอร์เซ็นต์ที่สูงใกล้เคียงกัน ซึ่งจากการที่มีราเอคโตไมคอร์ไรซ่าอาศัยร่วมอยู่กับรากของกล้าสนสามใบเท่ากับเป็นการเพิ่มพื้นที่ในการดูดซับแร่ธาตุ และ สารอาหารให้แก่กล้าสนสามใบเป็นผลประการหนึ่งที่ทำให้กล้าสนสามใบในชุดการทดลองที่ใส่ราเอคโตไมคอร์ไรซ่า มีอัตราการเจริญสูงกว่ากล้าสนสามใบในชุดการทดลองที่ไม่ได้ใส่ราเอคโตไมคอร์ไรซ่า ทั้งนี้ความแตกต่างกันของการเจริญเติบโตของกล้าสนสามใบ ระหว่างชุดการทดลองที่ปลูกโดยการใส่ราเอคโตไมคอร์ไรซ่าต่างๆจะขึ้นกับความเหมาะสม และคุณสมบัติเฉพาะตัวของราเอคโตไมคอร์ไรซ่าแต่ละชนิดที่มีต่อกล้าสนสามใบที่ใช้ในการทดลอง

เมื่อพิจารณาถึงผลการวิเคราะห์หาปริมาณธาตุไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโปแตสเซี่ยมที่พบในกล้าสนสามใบดังแสดงในตารางที่ 26 จะเห็นได้ว่าปริมาณฟอสฟอรัส และโปแตสเซี่ยมในชุดการทดลองซึ่งปลูกโดยการใส่ราเอคโตไมคอร์ไรซ่า จะสูงกว่าที่พบในชุดการทดลองซึ่งปลูกโดยไม่ได้ใส่ราเอคโตไมคอร์ไรซ่า ซึ่งแสดงให้เห็นว่าราเอคโตไมคอร์ไรซ่าช่วยให้การดูดซับสารอาหาร และ แร่ธาตุโดยกล้าสนสามใบเป็นไปได้ดีขึ้น อันเป็นผลทำให้อัตราการเจริญของกล้าสนสามใบสูงขึ้น สำหรับปริมาณไนโตรเจนที่มีในกล้าสนสามใบทุกชุดการทดลองซึ่งปลูกโดยการใส่ราเอคโตไมคอร์ไรซ่าที่แยกได้ พบว่ามีปริมาณธาตุไนโตรเจนที่วิเคราะห์ได้มากกว่าในกล้าสนสามใบชุดการทดลองซึ่งปลูกโดยไม่ได้ใส่ราเอคโตไมคอร์ไรซ่าโดยแตกต่างกันมากกว่า 1000 เปอร์เซ็นต์ นอกจากจะเป็นผลอันเนื่องมาจากคุณสมบัติของราเอคโตไมคอร์ไรซ่าที่ช่วยให้พืชมีการดูดซับสารอาหาร และ แร่ธาตุได้ดีขึ้นแล้ว ยังอาจเป็นเพราะมีการปนเปื้อนของ แบคทีเรียอิสระที่สามารถตรึงไนโตรเจนในอากาศได้ (free-living nitrogen fixer) ที่มีในอากาศ และเกิดการอาศัยอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกันกับราเอคโตไมคอร์ไรซ่าที่บริเวณรากของกล้าสนสามใบทำให้กล้าสนสามใบที่มีการสร้างเอคโตไมคอร์ไรซ่ามีธาตุไนโตรเจนในปริมาณที่สูง มีนักวิจัยหลายท่านได้ทำการศึกษาถึงการอยู่ร่วมกันของราเอคโตไมคอร์ไรซ่า แบคทีเรียอิสระที่สามารถตรึงไนโตรเจนในอากาศได้และพืช และสาเหตุที่ทำให้พืชที่มีการอยู่ร่วมกันของราเอคโตไมคอร์ไรซ่า และ แบคทีเรียอิสระที่สามารถตรึงไนโตรเจนในอากาศได้ มีปริมาณธาตุไนโตรเจนในปริมาณที่สูง(141,

142) อาจเนื่องมาจากราเอคโตไมคอร์ไรซ่าทำให้บริเวณรากพืช(rhizosphere) ที่มีการสร้างเอคโตไมคอร์ไรซ่ามีการเปลี่ยนแปลงไปจากเมื่อไม่มีการสร้างเอคโตไมคอร์ไรซ่า ทั้งทางด้านกายภาพเนื่องมาจากการสร้างแผ่นแมนเทิล และทางด้านเคมีเนื่องจากราเอคโตไมคอร์ไรซ่าสามารถใช้ สร้าง หรือกระตุ้นให้พืชสร้างสารอาหารและสารเคมีบางชนิดขึ้นมาได้ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวอาจมีผลทำให้เกิดสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมกับจุลินทรีย์บางชนิดอาทิ เช่น แบคทีเรียอิสระที่สามารถตรึงไนโตรเจนในอากาศได้ ได้แก่ *Azotobactor* sp. *Pseudomonas* sp. และ *Azospirillum* sp.(142) Bowen และ Theodorou(62) สามารถแยกแบคทีเรียดังกล่าวได้จากบริเวณรากพืชที่มีการสร้างเอคโตไมคอร์ไรซ่า Tilak และRao(143) สามารถแยก *Azospirillum* sp.ได้จากเซลในชั้นคอร์เทคของรากพืชที่มีการติดเชื้อราเอคโตไมคอร์ไรซ่า แบคทีเรียอิสระที่สามารถตรึงไนโตรเจนในอากาศได้ และตรึงไนโตรเจนและส่งผ่านให้พืช โดยอาจจะส่งผ่านให้โดยตรงหรือส่งผ่านราเอคโตไมคอร์ไรซ่าไปสู่รากพืช ทำให้พืชที่มีการสร้างเอคโตไมคอร์ไรซ่ามีปริมาณธาตุไนโตรเจนในปริมาณที่สูงกว่าพืชที่ไม่มีการสร้างไมคอร์ไรซ่า(144)

นอกจากนี้จากการทดลองยังพบว่ากล้าสนสามใบซึ่งปลูกโดยการใส่ราเอคโตไมคอร์ไรซ่ามีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดที่สูงกว่ากล้าสนสามใบซึ่งปลูกโดยไม่ได้ใส่ราเอคโตไมคอร์ไรซ่า ดังแสดงในตารางที่ 25 ซึ่ง Marx และ Artman(118) และ Ruehle(139) ได้รายงานถึงการช่วยให้พืชที่มีการสร้างเอคโตไมคอร์ไรซ่ามีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด ที่สูงกว่าพืชซึ่งปลูกโดยไม่ได้สร้างเอคโตไมคอร์ไรซ่า ทั้งนี้เนื่องมาจากคุณสมบัติต่างๆของราเอคโตไมคอร์ไรซ่าช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชดังที่ได้กล่าวมาแล้วในข้างต้น

ทั้งนี้เมื่อพิจารณาถึงอัตราการเจริญ และ ปริมาณธาตุอาหารที่พบในกล้าสนสามใบดังที่ได้จากการทดลองมาแล้วในข้างต้นเปรียบเทียบกันระหว่างชุดการทดลองที่ใส่ราเอคโตไมคอร์ไรซ่าชนิดต่างๆ จะเห็นได้ว่าจากสภาวะแวดล้อมที่ใช้ในการทดลองราเอคโตไมคอร์ไรซ่ากลุ่มที่ 4 ซึ่งมีราเอคโตไมคอร์ไรซ่าที่แยกได้ที่เป็นตัวแทนกลุ่มได้แก่รา Tak 4 มีประสิทธิภาพดีที่สุดในกลุ่มของราที่แยกได้ ในการช่วยเพิ่มการเจริญของกล้าสนสามใบ ส่วนราเอคโตไมคอร์ไรซ่าที่แยกได้ที่ให้ผลที่ดีรองๆลงมา ได้แก่ Saraburi 3 ,Ubolrachathani 3, Surin 1 และ Chanulok 2 ตามลำดับ ซึ่งทั้งนี้หากทำการทดลองในสภาวะแวดล้อมที่ต่างออกไปราเอคโตไมคอร์ไรซ่าที่แยกได้กลุ่มอื่นๆ อาจให้ผลการทดลองที่ดีกว่า Tak 4 ซึ่งเป็นตัวแทนราเอคโตไมคอร์ไรซ่ากลุ่ม 4 ได้

ข้อเสนอแนะ

1. ควรนำราเอคโตไมคอร์ไรซ่า Tak 4 ที่แยกได้ในการทดลองนี้มาทำการทดลองเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการเพิ่มการเจริญของกล้าสนสามใบ กับรา *P. tinctorius* ซึ่งเป็นราเอคโตไมคอร์ไรซ่ามาตรฐานที่ใช้ในการผลิตเป็น Inoculum ในทางการค้า

2. ควรนำราเอคโตไมคอร์ไรซ่า Tak 4 ที่แยกได้ในการทดลองนี้มาทำการทดลองในสภาพธรรมชาติเพื่อทดสอบประสิทธิภาพและความเหมาะสมในการนำราเอคโตไมคอร์ไรซ่าชนิดนี้มาใช้ช่วยในการปลูกสนสามใบในโครงการปลูกสร้างสวนป่าต่อไป