การผลิตกรดแอบไซซิกจาก *Botrytis cinerea* เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของมะเขือเทศในสภาวะขาดน้ำ

Production of Abscisic Acid from *Botrytis cinerea* for Promoting Growth of Tomato under Water Stress Condition

นัยเนตร เจริญสันติ ทานากะ[1/*] ภรณี สว่างศรี[1/] รัติกาล ยุทธศิลป์[2/]

Naiyanate Jaroensanti Tanaka[1/*] Paranee Sawangsri[1/] Rattikan Yutthasin[2/]

Received 6 Apr. 2025/Revised 6 Mar. 2026/Accepted 8 Mar. 2026

ABSTRACT

Abscisic acid (ABA) is a phytohormone that regulates plant adaptation to survive in unsuitable environments. This study aimed to develop ABA production from microbes for promoting plant growth under drought stress. For producing ABA, 35 isolates of *Botrytis* spp. were collected and selected by morphology and tannic acid oxidation. The isolate with the greatest ability to produce ABA was BRDO-23. This isolation was identified as *Botrytis cinerea* by ITS region sequencing. The examination of the optimum growth conditions for the production of ABA by BRDO-23 showed that blue light and 25% tomato mixed juice can promote ABA production. With these favored growth conditions, BRDO-23 had the ability to produce ABA up to 76.2±11.7 mg/L at 3L spinner flask fermentation. The ethyl acetate phase separation method demonstrated a 74.6% ABA recovery rate, with the final ABA product being a dry powder. In a laboratory efficacy test, the ABA product at 2 μM was found to be the most effective for growth promotion of young tomato plants under drought stress. In the greenhouse test, adding a 3 μM ABA product can enhance the tolerance of fruiting-stage tomatoes under drought stress. Overall, these findings suggest that ABA biosynthesized by *Botrytis cinerea* holds promise as a phytohormone for improving the resilience of tomatoes under drought conditions.

Keywords: abscisic acid from fungus; abscisic acid production; plant growth promoting; water stress

[1/] กองวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี 12110

[1/] Biotechnology Research and Development Division, Thanya Buri, Pathum Thani 12110, Thailand

[2/] สำนักงานวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 3 ถ.มิตรภาพ ต.ศิลา อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40000

[2/] Agricultural Research and Development Region 3, Mittraphap Rd., Sila, Mueang, Khon Kaen, 40000, Thailand

*** Corresponding author: lawa_w@hotmail.com**

บทคัดย่อ

กรดแอบไซซิกเป็นฮอร์โมนพืชที่กระตุ้นให้พืชตอบสนองและปรับตัวต่อสภาวะเครียดจากสิ่งแวดล้อมและสภาวะที่ไม่เหมาะสม งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตกรดแอบไซซิกจากเชื้อรา *Botrytis cinerea* สำหรับประยุกต์ใช้ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของมะเขือเทศภายใต้สภาวะขาดน้ำ โดยรวบรวมเชื้อรา *Botrytis* spp. 35 ไอโซเลท และคัดเลือกลักษณะทางสัณฐานวิทยา ปฏิกิริยา tannic acid oxidation พบว่า ไอโซเลท BRDO-23 มีศักยภาพในการผลิตกรดแอบไซซิกสูงสุด และการจำแนก BRDO-23 ด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ ITS เป็นเชื้อราชนิด *B. cinerea* ส่วนการเลี้ยง BRDO-23 ในอาหารสูตรน้ำมะเขือเทศรวม 25% ภายใต้สภาวะแสงสีฟ้ากระตุ้นการผลิตกรดแอบไซซิกได้ดีที่สุด การผลิตในระดับถังหมักขนาด 3 ลิตร สามารถผลิตกรดแอบไซซิกได้ 76.2±11.7 มก./ลิตร การสกัดด้วยวิธีการ salting out ได้กรดแอบไซซิก 74.6% พัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ในรูปผงแห้ง เมื่อทดสอบประสิทธิภาพ พบว่า กรดแอบไซซิกเข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์ สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นอ่อนมะเขือเทศภายใต้สภาวะขาดน้ำในระดับห้องปฏิบัติการได้ ส่วนในระดับโรงเรือน กรดแอบไซซิกเข้มข้น 3 ไมโครโมลาร์ ส่งเสริมการทนสภาวะขาดน้ำของมะเขือเทศในระยะออกดอกติดผลได้ ชี้ให้เห็นว่ากรดแอบไซซิกที่สังเคราะห์โดยเชื้อรา *B. cinerea* มีศักยภาพในการเพิ่มความทนทานของมะเขือเทศต่อสภาวะแห้งแล้ง

คำสำคัญ: กรดแอบไซซิกจากเชื้อรา; การผลิตกรดแอบไซซิก; การส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช; ความเครียดจากสภาวะขาดน้ำ

บทนำ

การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิโลกที่เพิ่มสูงขึ้นส่งผลกระทบทำให้สภาพภูมิอากาศแปรปรวน สร้างความเครียดให้กับพืช มีผลต่อการเจริญเติบโตและผลผลิต โดยเฉพาะสภาวะขาดน้ำหรือแล้งสามารถสร้างความเสียหายทางเศรษฐกิจในวงกว้าง ในช่วงปี พ.ศ. 2566–2567 เกิดภัยแล้งรุนแรงในประเทศไทย ทำให้พื้นที่ทางการเกษตรได้รับความเสียหายรวม 1,780,362 ไร่ มูลค่าความเสียหายถึง 8.8 พันล้านบาท (กรมป้องกันและบรรเทาสาธารณภัย, 2567)

ในสภาวะแล้งพืชจะมีกลไกในการปรับตัวด้วยการปรับสมดุลออสโมซิส การสร้างสารต้านอนุมูลอิสระ และการกระตุ้นการผลิตกรดแอบไซซิก (Haghpanah et al., 2024) ซึ่งกรดแอบไซซิก (abscisic acid, ABA) เป็นฮอร์โมนพืชที่มีบทบาทสำคัญในการตอบสนองต่อสภาวะขาดน้ำ (Wilkinson et al., 2012) ควบคุมการปิดปากใบเพื่อลดการคายน้ำ ชะลอการเจริญเติบโต และกระตุ้นยีนที่เกี่ยวข้องกับการทนต่อความเครียด มีรายงานการใช้กรดแอบไซซิกในปริมาณที่เหมาะสมสามารถลดความเสียหายของพืชภายใต้สภาพเครียดได้อาทิ การใช้ในข้าวสาลีช่วงแตกกอ สามารถช่วยกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระและรักษาผลผลิตภายใต้สภาวะขาดน้ำ (Bano et al., 2012) การให้ในมะเขือเทศระยะต้นโตเต็มที่จะช่วยกระตุ้นพืชให้ผลิตกรดแอบไซซิก ชักนำยีนที่เกี่ยวกับการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระ และรักษาผลผลิตในสภาวะขาดน้ำ (Alabbosh and Alenazi, 2025)

ที่ผ่านมาการผลิตกรดแอบไซซิกอาศัยกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี และพึ่งพาการนำเข้าจากต่างประเทศ Shi et al. (2017) รายงานว่าเชื้อราหลายชนิด เช่น *Botrytis* spp. *Ceratocystis* spp. *Fusarium* spp. และ *Rhizoctonia* spp. สามารถผลิต

กรดแอบไซซิกได้ เชื้อรา *B. cinerea* สามารถผลิตกรดแอบไซซิกได้ในปริมาณสูงที่สุด ดังนั้น การพัฒนาการผลิตกรดแอบไซซิกจาก *B. cinerea* ในประเทศจะช่วยลดการนำเข้า ลดต้นทุน และเพิ่มการใช้ประโยชน์จากกรดแอบไซซิกเพื่อบรรเทาความเสียหายทางการเกษตรได้

งานวิจัยนี้มีเป้าหมายในการพัฒนากระบวนการผลิตกรดแอบไซซิกจากเชื้อรา *B. cinerea* เพื่อใช้ส่งเสริมการเจริญเติบโตของมะเขือเทศในสภาวะขาดน้ำ โดยคัดเลือกเชื้อรา *B. cinerea* ไอโซเลท ที่มีศักยภาพในการผลิตกรดแอบไซซิกสูง พัฒนากระบวนการผลิตกรดแอบไซซิก และประเมินประสิทธิภาพของกรดแอบไซซิกที่ผลิตได้ทั้งในระดับห้องปฏิบัติการและโรงเรือน เพื่อเป็นแนวทางในการขยายผลเชิงพาณิชย์ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การรวบรวมและคัดเลือกเชื้อรา *Botrytis* spp.

1.1 แยกเชื้อรา *Botrytis* spp.

เก็บรวบรวมผลสตรอว์เบอร์รีที่มีอาการผลเน่าจากแหล่งต่าง ๆ 33 ตัวอย่าง ทำการแยกเชื้อโดยเลี้ยงบนอาหาร *Botrytis* selective media (Edwards and Seddon, 2001) เป็นเวลา 2 สัปดาห์ เพื่อสังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยา ร่วมกับปฏิกิริยา tannic acid oxidation เพื่อจำแนกกลุ่ม *Botrytis* spp. โดยสังเกตการเปลี่ยนสีของอาหารจากสีชมพูเป็นสีน้ำตาล จากนั้นแยกเส้นใยเชื้อราบริสุทธิ์บนอาหารแข็ง PDA (1 ลิตรประกอบด้วย potato dextrose broth (Formedium®) 24 ก. และผงวุ้น 2%)

1.2 การคัดเลือกไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพ

นำเชื้อรา *Botrytis* spp. มาเลี้ยงในอาหารเหลว potato dextrose broth (PDB) (1 ลิตรประกอบด้วย potato dextrose broth (Formedium®) 24 ก.) บ่มที่อุณหภูมิ 24°ซ. ในสภาพใต้แสงขาว เป็นเวลา 2 สัปดาห์ เก็บส่วนของอาหารเหลวมากรองด้วย nylon membrane filter 0.45 ไมครอน ปรับ pH 9.0 ด้วย NaOH จากนั้นสกัดด้วย ethyl acetate แยกเอา aqueous phase ปรับ pH 3.0 และสกัดด้วย ethyl acetate อีกครั้ง แยกเอาส่วน organic phase มาทำการระเหยด้วยระบบสุญญากาศ วิเคราะห์ปริมาณกรดแอบไซซิกที่สังเคราะห์ได้ด้วยเครื่อง HPLC-MS เปรียบเทียบกับกรดแอบไซซิกมาตรฐาน [(+)-Abscisic acid] (Supelco®, Sigma-Aldrich)

นำสารละลายมาตรฐาน ABA และตัวอย่างที่ผ่านการกรองด้วยแผ่นฟิลเตอร์เมมเบรน ขนาดอนุภาค 0.22 ไมครอน วิเคราะห์ปริมาณด้วยเครื่อง HPLC (Shimadzu LC-40D XR) ดัดแปลงวิธีการจาก Kasote et al. (2016) โดยมีสภาวะดังนี้ คอลัมน์ InterSustain C18 (2.1 มม. x 100 มม., I.D. 1.9 ไมโครเมตร, GL Sciences) ที่อุณหภูมิ 35°ซ. อัตราส่วนระหว่างสารละลายเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) A (formic acid 0.1% โดยปริมาตร) และตัวทำละลายเคลื่อนที่ B (acetonitrile) เปลี่ยนแปลงในลักษณะ gradient ดังนี้ 0 min A: 65%, B: 35% ⟶ 6-8 นาที A: 10%, B: 90% ⟶ 8.10 – 12 นาที A: 65%, B: 35% อัตราการไหล 0.3 มล./นาที ใช้เครื่องตรวจวัดสารชนิด mass spectrometer (MS, Shimadzu, LCMS 2020) ตรวจสอบมวลของกรดแอบไซซิก SIM mode, m/z 263.15 ปริมาตรการฉีดสาร 5 ไมโครลิตร ระยะเวลาการฉีดแต่ละครั้ง (runtime) 12 นาที บันทึกปริมาณกรดแอบไซซิกในอาหารเลี้ยง

1.3 การจำแนกชนิดด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล

จำแนกชนิดของเชื้อรา *Botrytis* sp. ที่คัดเลือกได้ โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ Wizard® genomic DNA purification kit (Promega) ชุดทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอ universal DNA purification kit (TIANGEN®) สารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา polymerase chain reaction (PCR) (GoTaq® green master mix; Promega)

และไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR ได้แก่ ไพรเมอร์ ITS5 (5`-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3`) และ ITS4 (5`-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3`) (Raja et al., 2017) เตรียมผลผลิต PCR ให้บริสุทธิ์ โดยใช้ชุด universal DNA purification kit (TIANGEN®) (Ma et al., 2017) และนำส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (Macrogen Korea) ในส่วนของ internal transcribed spacer regions (ITS) และเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI ชนิดเชื้อราจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

2. ปัจจัยในการกระตุ้นการสังเคราะห์ ABA

2.1 แสง

นำเชื้อรา *B. cinerea* (BRDO-23) ทดสอบใน PDB ที่อุณหภูมิ 24°ซ. ภายใต้ปัจจัยแสง เป็นเวลา 2 สัปดาห์ วิเคราะห์ปริมาณกรดแอบไซซิกในอาหารเลี้ยงสกัดแบบหยาบด้วยเครื่อง HPLC-MS เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อราและปริมาณกรดแอบไซซิกในอาหารเลี้ยง วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) 5 ซ้ำ 3 กรรมวิธี ประกอบด้วย ไม่ให้แสง (control คลุมด้วยผ้าหนาสีดำ) แสงสีขาวปกติ (white fluorescent light) และแสงสีฟ้า (LED, 9 วัตต์)

2.2 สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อราที่กระตุ้นการผลิต ABA

เลี้ยงเชื้อรา BRDO-23 ในอาหารเลี้ยง 2 สัปดาห์ วิเคราะห์ปริมาณกรดแอบไซซิกในอาหารเลี้ยงสกัดแบบหยาบด้วยเครื่อง HPLC-MS เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อราและปริมาณกรดแอบไซซิกในอาหารเลี้ยง วางแผนการทดลองแบบ CRD 3 ซ้ำ 6 กรรมวิธี ประกอบด้วย PDB (control) น้ำมะเขือเทศ (ดอยคำ®) น้ำสตรอว์เบอร์รี (ดอยคำ®) น้ำมะเขือเทศรวม (ดอยคำ®) น้ำเบอร์รีรวม (ดอยคำ®) และน้ำมังคุดรวม (ดอยคำ®)

2.3 อัตราส่วนของน้ำมะเขือเทศ

นำเชื้อรา BRDO-23 เลี้ยงทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้น้ำมะเขือเทศรวมสัดส่วนต่าง ๆ จากผลิตภัณฑ์น้ำมะเขือเทศรวม (ดอยคำ®) เป็นเวลา 2 สัปดาห์ วิเคราะห์ปริมาณกรดแอบไซซิกในอาหารเลี้ยงสกัดแบบหยาบด้วยเครื่อง HPLC-MS เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อราและปริมาณกรดแอบไซซิกในอาหารเลี้ยง วางแผนการทดลองแบบ CRD 4 กรรมวิธี 5 ซ้ำ ได้แก่ น้ำมะเขือเทศรวม 100 50 25 และ 10%

3. การพัฒนาต้นแบบผลิตภัณฑ์

เลี้ยงเชื้อรา BRDO-23 ในปัจจัยที่เหมาะสม โดยใช้ถังปฏิกรณ์สกัดขนาด 5 ลิตร 2 สัปดาห์ นำอาหารเลี้ยงเชื้อมาสกัดแบบหยาบโดยใช้ตัวทำละลาย ethyl acetate ที่อุณหภูมิห้อง ในขั้นแรก ปรับ pH 3.0 และใช้ ethyl acetate ในอัตราส่วนต่ออาหารเลี้ยง 1:1 กวนที่ความเร็ว 250-300 รอบ/นาที เพื่อผสมของเหลวให้เข้ากันดี ปล่อยทิ้งไว้ให้แยกชั้นและแยกชั้นน้ำส่วนล่าง (aqueous phase) ออกมาปรับ pH 9.0 และสกัดด้วย ethyl acetate อีกครั้ง ในอัตราส่วน ethyl acetate: aqueous phase 1:5 เมื่อของเหลวแยกชั้น แยกเอาส่วนด้านบน (organic phase) ที่มีกรดแอบไซซิกออกมาทำระเหยด้วยเครื่องทำระเหยระบบสุญญากาศจะได้สารสกัดกรดแอบไซซิกแบบหยาบ และนำไปวิเคราะห์ปริมาณกรดแอบไซซิกด้วยเครื่อง HPLC-MS

การพัฒนาผลิตภัณฑ์สารสกัดกรดแอบไซซิกในรูปผงแห้ง นำสารสกัดกรดแอบไซซิกแบบหยาบที่ทราบความเข้มข้นของกรดแอบไซซิกแล้วมาละลายด้วยน้ำให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครโมลาร์ ปรับค่า pH 5.7 ด้วย NaOH ผสม maltodextrin ปริมาณ 3% (น้ำหนักโดยปริมาตร) และทำผงแห้งด้วยเครื่อง spray drier ตั้งค่าต่าง ๆ ของเครื่อง ดังนี้ inlet temperature 140°ซ.

outlet temperature 80°ซ. aspirator 100% pump 28% nozzle cleaner 6 จนตัวอย่างมีสภาพเป็นผงแห้ง แล้วชั่ง 250 มก. ละลายในน้ำ 1 มล. นำไปวิเคราะห์ปริมาณกรดแอบไซซิกในผลิตภัณฑ์ด้วยเครื่อง HPLC-MS

4. การทดสอบประสิทธิภาพของกรดแอบไซซิกในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

4.1 สภาวะขาดน้ำในระดับห้องปฏิบัติการ

จำลองสภาวะขาดน้ำในระดับห้องปฏิบัติการ (ดัดแปลงจาก Khan et al., 2016) ใช้ polyethylene glycol (PEG) ที่ความเข้มข้น 7% เป็นสารชักนำสภาวะขาดน้ำ นำเมล็ดมะเขือเทศพันธุ์เรดดี้ (ศรแดง®) มาเพาะบนอาหาร Murashige and Skoog medium (MS; Himedia®) จนต้นอ่อนมีอายุ 7 วัน มีใบแท้ 2 ใบคลี่ออกเต็มที่ จึงย้ายไปปลูกในอาหาร MS ที่มีส่วนประกอบของ PEG 7% และกรดแอบไซซิกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ วางไว้ที่ห้องอุณหภูมิ 25°ซ. ความชื้นสัมพัทธ์ 60% ให้แสงสีขาวปกติความเข้ม 2,000 ลักซ์ 16 ชั่วโมง และไม่ให้แสง 8 ชั่วโมง วางแผนการทดลองแบบ CRD 5 กรรมวิธี 8 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 MS (positive control)

กรรมวิธีที่ 2 MS + 7% PEG (control)

กรรมวิธีที่ 3 MS + 7% PEG + ABA การค้า (ABA_{com}) 0.3 ไมโครโมลาร์

กรรมวิธีที่ 4 MS + 7% PEG + ABA จาก BRDO-23 ($ABA_{BRDO-23}$) 1 ไมโครโมลาร์

กรรมวิธีที่ 5 MS + 7% PEG + $ABA_{BRDO-23}$ 2 ไมโครโมลาร์

บันทึกน้ำหนักสดของต้นและราก ความสูงของต้นอ่อนมะเขือเทศ ที่ 14 วันหลังย้ายต้นกล้า และวิเคราะห์ปริมาณ MDA (malondialdehyde) ซึ่งเป็นสารบ่งชี้สภาวะเครียดของเซลล์พืช ในใบมะเขือเทศ (Cherono et al., 2021)

4.2 การส่งเสริมความทนทานต่อการขาดน้ำในระดับโรงเรือน

ทดลองภายในโรงเรือนที่มีตาข่ายพรางแสง 50% ใช้มะเขือเทศพันธุ์เรดดี้ (ศรแดง®) คัดต้นกล้าอายุ 28 วันที่มีความสูงและจำนวนใบคลี่เต็มที่เท่ากัน ย้ายปลูกลงกระถางขนาด 10 นิ้ว ใช้ดิน (spring®) 4 กก./กระถาง รองก้นหลุมด้วยสตาร์เกิลจี 2 ก./กระถาง หาค่าความจุความชื้นสนาม (field capacity; FC) ของดินในกระถาง (1.5 ลิตร) หลังย้ายปลูก 50 วัน จึงทำการทดสอบ ณ สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 3 จ.ขอนแก่น ระหว่าง ก.ค. 2567 ถึง ม.ค. 2568

เปรียบเทียบประสิทธิภาพของกรดแอบไซซิกโดยงดให้น้ำ 1 วัน ก่อนการให้กรดแอบไซซิกในแต่ละกรรมวิธีโดยการรดบริเวณโคนต้นปริมาตร 50 มล./ต้น 2 ครั้ง ห่างกัน 7 วัน ในอัตรา 60%FC และให้น้ำ 60%FC ต่ออีก 7 วัน จากนั้นจึงให้น้ำตามปกติ เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมให้น้ำปกติ และลดการให้น้ำ วางแผนการทดลองแบบ randomized complete block design (RCBD) 6 กรรมวิธี 4 ซ้ำ (ขนาดหน่วยทดลองละ 4 กระถาง) ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ให้น้ำปกติ (control)

กรรมวิธีที่ 2 ลดการให้น้ำ (water stress; WS)

กรรมวิธีที่ 3 WS + ABA_{com} 1 ไมโครโมลาร์

กรรมวิธีที่ 4 WS + $ABA_{BRDO-23}$ 1 ไมโครโมลาร์

กรรมวิธีที่ 5 WS + $ABA_{BRDO-23}$ 3 ไมโครโมลาร์

กรรมวิธีที่ 6 WS + $ABA_{BRDO-23}$ 10 ไมโครโมลาร์

บันทึกอัตราการรอดชีวิต (จำนวนต้นที่รอดชีวิต x 100/จำนวนต้นที่ทดสอบ) ผลผลิต/ต้น น้ำหนักผลและจำนวนผล/ต้น เก็บผลผลิตในช่วงอายุ 65-130 วันหลังย้ายปลูก โดยเลือกเก็บผลที่เริ่มเปลี่ยนเป็นสีส้มมากกว่า 70% วัดขนาด 10 ผล/ครั้ง ในแต่ละหน่วยทดลอง วิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การรวบรวมและคัดเลือกเชื้อรา *Botrytis* spp.

1.1 รวบรวมเชื้อรา *Botrytis* spp. จากลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Figure 1a-b) และการทำปฏิกิริยา tannic acid oxidation (Figure 1c) สามารถคัดเลือกได้เชื้อรา *Botrytis* spp. 35 ไอโซเลท จากการสังเกตลักษณะ conidiophore และ conidia ของเชื้อรา ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Figure 1d) พบ conidiophore สีเข้ม ลักษณะยาวตรงหรือเกือบตรง อยู่รวมกันหนาแน่น มีลักษณะคล้ายพู่ บริเวณใกล้ปลายสุดของ conidiophore โป่งพอง สีใส conidia มีรูปร่างไข่ถึงกลม อยู่รวมกันหนาแน่นที่ปลาย conidiophore สอดคล้องกับลักษณะ conidiophore และ conidia ของ *Botrytis cinerea* (วรวรรณและคณะ, 2533)

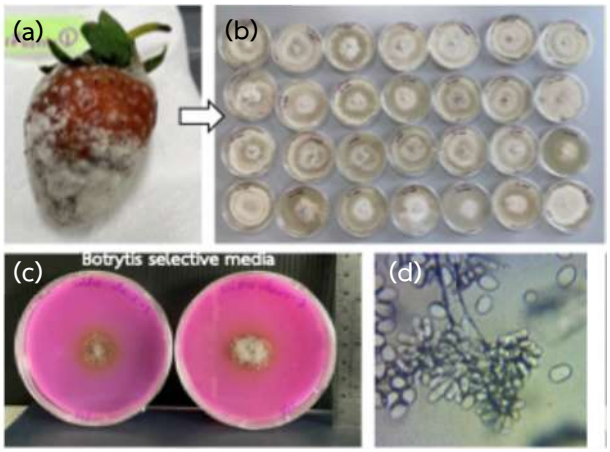


Figure 1 Selection and characterization of *Botrytis* spp.; (a) Strawberry fruit with gray mold; (b) The isolates were collected and purified in PDA media; (c) The isolates were selected by *Botrytis* selective media; (d) Conidiophore of *Botrytis* spp.

1.2 การคัดเลือกไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพ ผลการวิเคราะห์ปริมาณ พบว่า มีเชื้อรา 18 ไอโซเลท ABA (Figure 2a) ที่สามารถผลิต ABA ได้ สามารถคัดเลือกไอโซเลทที่มีศักยภาพในการผลิต ABA สูงสุด 5 ไอโซเลท โดยเชื้อรา *Botrytis* spp. ไอโซเลทที่มีศักยภาพในการผลิต ABA สูงที่สุด คือ BRDO-23 สามารถผลิตกรดแอบไซซิก 84.6 นาโนกรัม/มล. รองลงมา ได้แก่ BRDO-32, BRDO-6, BRDO-8 และ BRDO-21 ผลิตได้ 54.4 53.8 48.5 และ 37.7 นาโนกรัม/มล. ตามลำดับ (Figure 2b) เกือบ 50% ของเชื้อรา *Botrytis* spp. ที่พบในประเทศสามารถผลิตกรดแอบไซซิกได้ แต่มีศักยภาพแตกต่างกัน อาจเกิดจากสตรอว์เบอร์รีมีการติดเชื้อแบบพักตัว (quiescence) ซึ่งเชื้อราที่มีการพักตัวบางไอโซเลท อาจลดการผลิต ABA เพื่อหลีกเลี่ยงการกระตุ้นให้พืชไหวตัวทันในช่วงแรก (Jarvis, 1962)

1.3 การจำแนกชนิดด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล การจำแนกชนิดด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุลของ 5 ไอโซเลทที่ผลิต ABA ในปริมาณสูง พบว่า มีลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ที่มีความคล้ายคลึงกับ เชื้อรา *B. cinerea* โดยมีค่าความเหมือน (identity) 98–99% โดยเฉพาะ BRDO-23 มีลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ที่มีความคล้ายคลึงกับเชื้อรา *B. cinerea* (accession number KX443701.1) มี identity 99% (Table 1) แสดงให้เห็นว่า *Botrytis* spp. ที่สามารถผลิตกรดแอบไซซิกได้ในปริมาณสูงทั้ง 5 ไอโซเลท เป็น *B. cinerea* ซึ่งตรงกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สังเกตได้

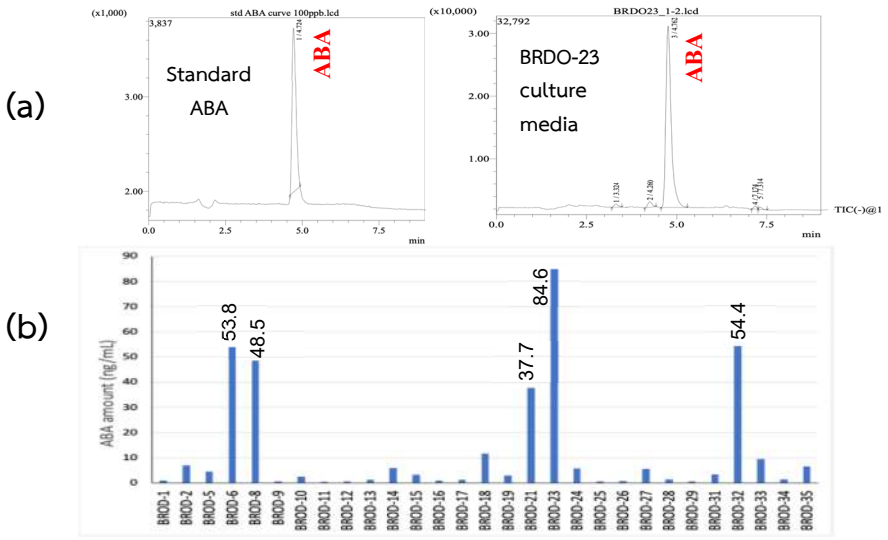


Figure 2 ABA producing ability of purified *B. cinerea* isolates; (a) HPLC chromatogram of abscisic acid analyzed by mass spectrometry; (b) The amount of ABA in 25 mL PDB

Table 1 Molecular analysis of ITS region of the selected isolates

Candidate isolations	Species	Identity (%)	Accession number
BRDO-6	*Botrytis cinerea*	98	KU992700.1
BRDO-8	*Botrytis cinerea*	98	KU992700.1
BRDO-21	*Botrytis cinerea*	98	KU992700.1
BRDO-23	***Botrytis cinerea***	**99**	**KX443701.1**
BRDO-32	*Botrytis cinerea*	99	KU992693.1

2. ปัจจัยในการกระตุ้นการสังเคราะห์ ABA

2.1 แสง

พบว่า การเลี้ยงเชื้อราในสภาพแสงสีฟ้าสามารถกระตุ้นการผลิตกรดแอบไซซิกได้ดีที่สุด ผลิตกรดแอบไซซิกได้ปริมาณ 2.1±0.5 นาโนกรัม/มล. รองลงมาคือ การไม่ให้แสง และแสงสีขาว ผลิตได้ 0.9±0.4 และ 0.58±0.2 นาโนกรัม/มล. ตามลำดับ (Figure 3a) ซึ่งสอดคล้องกับ Marumo et al. (1982) ที่รายงานว่าแสงสีฟ้าสามารถกระตุ้นการผลิตกรดแอบไซซิกได้

2.2 สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อราที่กระตุ้นการผลิต ABA

BRDO-23 เมื่อเลี้ยงด้วยน้ำมะเขือเทศรวมและน้ำมังคุดรวม สามารถกระตุ้นการผลิตกรดแอบไซซิกได้ดี โดยมีค่าเฉลี่ยของปริมาณ ABA 13.2±4.5 และ 13.8±2.9 นาโนกรัม/มล. ตามลำดับ แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับสูตรอื่น ๆ รองลงมาคืออาหารเลี้ยงเชื้อสูตรน้ำเบอร์รี่รวม น้ำสตรอว์เบอร์รี น้ำมะเขือเทศ และ PDB โดยมีค่าเฉลี่ยของปริมาณ ABA 12.5±2.2 7.95±3.4 7.87±0.54 และ 2.47±2.6 นาโนกรัม/มล. ตามลำดับ (Figure 3b) น้ำผลไม้รวมสามารถกระตุ้นการผลิต ABA ได้ดีกว่าน้ำผลไม้ชนิดเดียว เป็นไปได้ว่าน้ำผลไม้รวมมีปริมาณน้ำตาลสูงกว่าน้ำผลไม้ชนิดเดียว ซึ่งน้ำตาลเหล่านี้เป็นสารอาหารหลักและกระตุ้นการผลิตกรดแอบไซซิก (Izquierdo-Bueno et al., 2018) แม้น้ำมังคุดรวมสามารถกระตุ้นการผลิตกรดแอบไซซิกได้ในปริมาณสูงสุด แต่หาซื้อยาก จึงเลือกใช้น้ำมะเขือเทศรวมที่หาซื้อได้ง่าย

2.3 อัตราส่วนของน้ำมะเขือเทศ

พบว่าน้ำมะเขือเทศรวม 25% สามารถกระตุ้นการผลิต ABA ได้ดีที่สุด เฉลี่ย 34.3±7.7 นาโนกรัม/มล. (Figure 3c) แสดงว่าน้ำมะเขือเทศที่ความเข้มข้นสูงไม่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตหรือการผลิต ABA โดยอาจสร้างสภาวะความเครียดออสโมซิส (osmotic stress) ซึ่งยับยั้งการเจริญเติบโตของ *B. cinerea* (Heller et al., 2012)

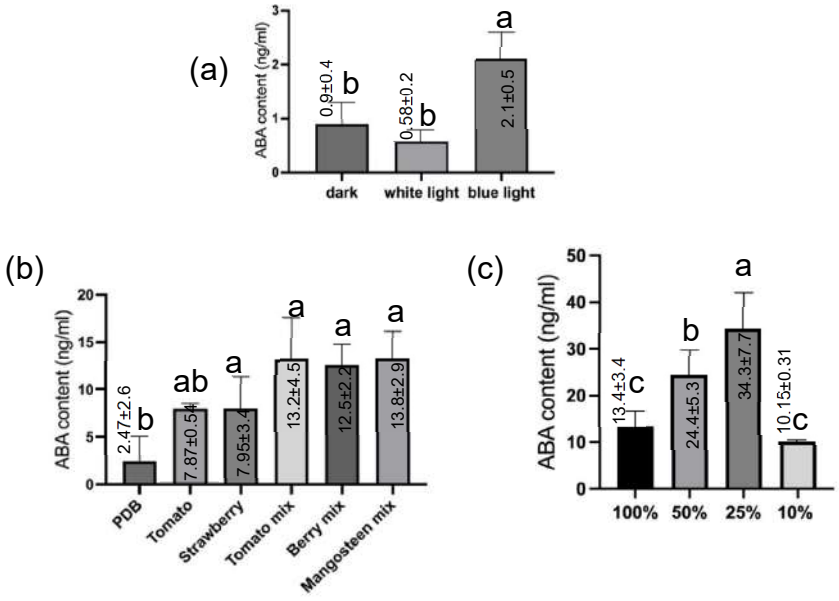


Figure 3 The amount of ABA produced by *B. cinerea* in several growth conditions; (a) light source; (b) culture media; and (c) concentration of tomato mix

3. การพัฒนาต้นแบบผลิตภัณฑ์

การผลิต ABA จาก BRDO-23 ในถังหมักขนาด 3 ลิตร โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรน้ำมะเขือเทศรวมเข้มข้น 25% ภายใต้สภาวะที่มีแสงสีฟ้า นาน 14 วัน สามารถผลิต ABA ได้เฉลี่ย 76.2 ± 11.7 มก./ล. แสดงว่าน้ำมะเขือเทศรวมสามารถกระตุ้นการผลิต ABA ได้ในปริมาณสูง สอดคล้องกับ Boddy (2016) ที่รายงานว่าองค์ประกอบทางเคมีในน้ำมะเขือเทศรวมโดยเฉพาะเพกตินและน้ำตาลธรรมชาติอาจเป็นตัวกระตุ้นการผลิต ABA ได้ดีกว่าอาหาร PDB

เมื่อนำอาหารเลี้ยงเชื้อมากรองและสกัดด้วยสาร ethyl acetate โดยใช้ถังปฏิกรณ์สกัด พบว่า การเติมเกลือเพิ่มความสามารถในการแยกชั้นของเหลวในกระบวนการสกัดในขั้นตอนการสกัดที่ pH 9.0 ได้ โดย ABA เพิ่มมากขึ้นถึง 74.6% ของการสกัด (% recovery) เมื่อเทียบกับวิธีการไม่เติมเกลือ ได้ ABA 58% ของการสกัด (Table 2) ดังนั้น ในการสกัด ABA จากอาหารเลี้ยงเชื้อในปริมาณมาก ควรใช้การเติมเกลือ ซึ่งวิธีการใช้เกลือเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดของเหลว (salting-out assisted liquid–liquid extraction; SALLE) มีความปลอดภัยและนิยมใช้ในการสกัดสารตกค้างที่มีปริมาณน้อยในสภาพแวดล้อม (Gezahegn et al., 2019)

Table 2 Recovery rate (%) of ABA extraction before and after extraction with ethyl acetate

Method	Total ABA (mg)		% Recovery
	Before extraction	After extraction	
Ethyl acetate + salting out	258.8	193.2	74.6
Ethyl acetate	232.4	134.8	58.0

การพัฒนาต้นแบบผลิตภัณฑ์ (Figure 4) นำสารสกัด ABA ที่วิเคราะห์ความเข้มข้นแล้ว มาละลายด้วยน้ำให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายที่ 50 ไมโครโมลาร์ จากนั้น ผสมกับ maltodextrin ในปริมาณ 3% (w/v) เพื่อป้องกันการเกาะตัวของผงแห้งในผลิตภัณฑ์ แล้วทำให้เป็นผงแห้งด้วยเครื่อง spray drier จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณ ABA ในผลิตภัณฑ์อีกครั้งก่อนบรรจุในซองทึบกันแสงและความชื้น ด้านความคงตัวของผลิตภัณฑ์ปริมาณ ABA ในผลิตภัณฑ์มีความคงที่เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°ซ. เป็นระยะเวลาไม่น้อยกว่า 4 เดือน

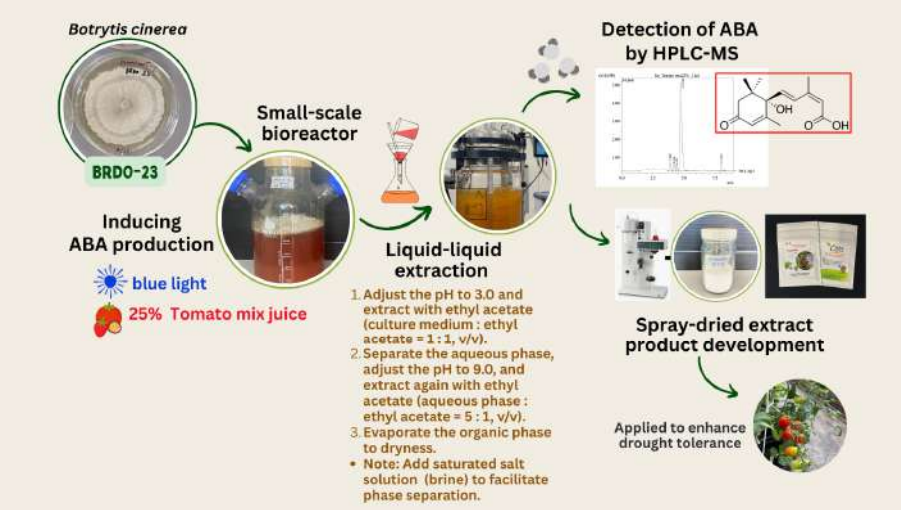


Figure 4 Development process of ABA product from *B. cinerea* isolate BRDO-23

4. การทดสอบประสิทธิภาพของกรดแอบไซซิกในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

4.1 สภาวะขาดน้ำในระดับห้องปฏิบัติการ

เมื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของต้นอ่อนมะเขือเทศที่ได้รับ ABA และไม่ได้รับ ABA ในอาหารแข็ง MS ที่มี PEG 7% พบว่า ต้นอ่อนมะเขือเทศที่ได้รับ $ABA_{BRDO-23}$ 1 และ 2 ไมโครโมลาร์ มีน้ำหนักต้นรวม 4,059 และ 3,894 มก. ตามลำดับ มากกว่าต้นที่ไม่ได้รับ ABA อย่างมีนัยสำคัญ (Figure 5) นอกจากนี้ ต้นที่ได้รับ $ABA_{BRDO-23}$ 2 ไมโครโมลาร์ มีความยาวของลำต้น 52.5 มม. ซึ่งมากกว่าต้นที่ไม่ได้รับอย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน แสดงให้เห็นว่าการให้ ABA ที่ความเข้มข้นพอเหมาะ



Figure 5 Tomato seedlings collected from each treatment groups. From left; MS (positive control), PEG (control), 0.3 µM commercial ABA, 1 and 2 µM ABA from *B. cinerea* isolate BRDO-23

สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของมะเขือเทศในสภาวะขาดน้ำได้ ผลการทดลองนี้จึงชี้ให้เห็นว่า $ABA_{BRDO-23}$ ที่ผลิตจากเชื้อรามีศักยภาพใกล้เคียงกับ ABA_{com} เชิงพาณิชย์ในการกระตุ้นการตอบสนองของพืชต่อสภาวะขาดน้ำ โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 0.3–2 ไมโครโมลาร์ สอดคล้องกับ Cisse et al. (2022) ที่รายงานว่า ABA 1 ไมโครโมลาร์ สามารถส่งเสริมความทนแล้งของต้นสมุนไพรได้

4.2 สภาวะขาดน้ำในระดับในระดับโรงเรือน

ต้นมะเขือเทศอายุ 78 วัน ก่อนทดลองมีความสูงและจำนวนใบไม่แตกต่างกัน เมื่อทดสอบตามกรรมวิธี พบว่า อัตราการรอดชีวิตในทุกกรรมวิธีไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่กรรมวิธีที่รดต้นมะเขือเทศด้วย $ABA_{BRDO-23}$ 3 ไมโครโมลาร์ ให้ผลผลิต/ต้น เฉลี่ย 820 ก. และน้ำหนักผลเฉลี่ย 5.47 ก. มากกว่าการลดการให้น้ำอย่างเดียว ซึ่งให้ผลผลิต/ต้นและน้ำหนักผลเฉลี่ย 775 และ 5.09 ก. ตามลำดับ แสดงว่า $ABA_{BRDO-23}$ 3 ไมโครโมลาร์ มีประสิทธิภาพในการลดความเสียหายของผลผลิตมะเขือเทศเมื่ออยู่ในสภาวะขาดน้ำ โดยมีแนวโน้มเพิ่มน้ำหนักของผล ทั้งนี้ จำนวนผล/ต้นทุกกรรมวิธีไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ขณะที่ขนาดของผลเมื่อเปรียบเทียบระหว่างทุกกรรมวิธีที่ลดการให้น้ำ พบว่า กรรมวิธีที่ให้ $ABA_{BRDO-23}$ 1 ไมโครโมลาร์ มีขนาดของผลใหญ่ที่สุด กว้างเฉลี่ย 1.93 ซม. และยาวเฉลี่ย 2.84 ซม. (Table 3) ชี้ให้เห็นว่า กรดแอบไซซิกที่ผลิตจาก *B. cinerea* ไอโซเลท BRDO-23 สามารถส่งเสริมความทนทานของมะเขือเทศระยะออกดอกติดผลต่อสภาวะขาดน้ำในระดับโรงเรือนได้ ลดผลกระทบจากการขาดน้ำในมะเขือเทศ สอดคล้องกับ Alabbosh and Alenazi (2025) ที่ระบุว่าภายใต้สภาวะขาดน้ำ การให้กรดแอบไซซิกกับต้นมะเขือเทศในระยะโตเต็มที่ สามารถช่วยรักษาการเจริญเติบโต ปริมาณคลอโรฟิลล์และผลผลิตของมะเขือเทศได้ อย่างไรก็ตาม ควรมีการศึกษาประสิทธิภาพในระดับแปลงปลูกเพื่อเป็นแนวทางขยายการใช้ประโยชน์ต่อไป

Table 3 Effect of ABA produced by *B. cinerea* isolate BRDO-23 on survival rate and yield of tomato under water stress at flowering stage at Agricultural Research and Development Region 3, Khon Kaen province during July 2024 – January 2025

Treatment	Survival rate	Yield			
		Yield/plant[1/] (g)	Weight/fruit[1/] (g)	Fruit size[1/] (cm)	
				Width	Length
Irrigation	100	951 a	5.94 a	2.07 a	3.06 a
Water stress (WS)	95	775 b	5.09 b	1.85 bc	2.77 b
WS + 1 µM ABA_{com}	100	785 b	5.00 b	1.95 b	2.73 b
WS + 1 µM $ABA_{BRDO-23}$	100	744 b	5.17 b	1.93 bc	2.84 ab
WS + 3 µM $ABA_{BRDO-23}$	**95**	**820 ab**	**5.47 ab**	**1.88 bc**	**2.81 b**
WS + 10 µM $ABA_{BRDO-23}$	95	761 b	5.32 ab	1.82 c	2.75 b
CV (%)	7.68	11	8.18	3.81	5.42

[1/] Mean of the same column (yield/plant, fresh weight/fruit, fruit size), followed by a common letter are not significantly different at 5% level by DMRT

สรุปผลการทดลอง

สามารถคัดแยกเชื้อรา *Botrytis* spp. ที่สามารถผลิต ABA สูงได้ 5 ไอโซเลท เชื้อราไอโซเลท BRDO-23 มีศักยภาพในการผลิตกรดแอบไซซิกสูงสุด จำแนกชนิดด้วยเทคนิคชีวโมเลกุลเป็นเชื้อราชนิด *B. cinerea* การเลี้ยงในอาหารสูตรน้ำมะเขือเทศรวมที่ความเข้มข้น 25% สามารถกระตุ้นการผลิต ABA ได้ดีที่สุด โดยการผลิตในระดับถังหมักขนาด 3 ลิตร สามารถผลิตกรดแอบไซซิกได้เฉลี่ย 76.2±11.7 ไมโครกรัม/มล. ส่วนวิธีการสกัดกรดแอบไซซิกในปริมาณมากด้วยถังปฏิกรณ์สกัด สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดกรดแอบไซซิกได้ 74.6% การสกัดด้วยวิธีการ salting out ผลิตภัณฑ์แบบผงแห้งมีความคงที่เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°ซ. เป็นระยะเวลาไม่น้อยกว่า 4 เดือน $ABA_{BRDO-23}$ เข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์ มีประสิทธิภาพในสภาวะขาดน้ำของต้นอ่อนมะเขือเทศในระดับห้องปฏิบัติการ ส่วนในระดับโรงเรือน พบว่าการให้ ABA ที่ความเข้มข้น 3 ไมโครโมลาร์ โดยวิธีการรดที่โคนต้นมีประสิทธิภาพในการเพิ่มความทนสภาวะขาดน้ำในมะเขือเทศระยะออกดอกและผล ดังนั้น ABA จากเชื้อรา *B. cinerea* ไอโซเลท BRDO-23 มีความเป็นไปได้ที่จะพัฒนาเพื่อใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ และควรทดสอบประสิทธิภาพในสภาพแปลงเพื่อยืนยันผล

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณการสนับสนุนทุนวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.) งบประมาณสนับสนุนงานมูลฐาน ปีงบประมาณ 2565-2567

เอกสารอ้างอิง

กรมป้องกันและบรรเทาสาธารณภัย. 2567. สรุปสถิติสาธารณภัยประจำปี 2566. ศูนย์ข้อมูลสาธารณภัย. แหล่งข้อมูล: https://datacenter.disaster.go.th/datacenter/cms/8670?id=108628. สืบค้น: 1 เมษายน 2568.

วรวรรณ ศักดิ์วงศ์ ประพันธ์ โอสถาพันธุ์ และศิริเปรม พุทธา. 2533. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารเคมีป้องกันกำจัดโรคบางชนิดต่อเชื้อรา *Botrytis cinerea*. สำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีการเกษตรแม่โจ้. 21 หน้า.

Alabbosh, K.F. and R.N. Alenazi. 2025. Exogenous abscisic acid (ABA) enhanced drought tolerance by regulating morpho-physiological attributes, osmotic adjustments, antioxidants, and ABA-related genes in tomato. Journal of Plant Growth Regulation. 45(1): 741-751.

Bano, A., F. Ullah and A. Nosheen. 2012. Role of abscisic acid and drought stress on the activities of antioxidant enzymes in wheat. Plant, Soil and Environment. 58(4): 181–185.

Boddy L. 2016. Pathogens of Autotrophs. pp. 245-292. In: The Fungi. Academic Press.

Cherono, S., C. Ntini, M. Wassie, M.D. Mollah, M.A. Belal, C. Ogutu and Y. Han. 2021. Exogenous application of melatonin improves drought tolerance in coffee by regulating photosynthetic efficiency and oxidative damage. Journal of the American Society for Horticultural Science. 146(1): 24–32.

Cisse, E.H.M., J. Zhang, D.D. Li, L.F. Miao, L.Y. Yin and F. Yang. 2022. Exogenous ABA and IAA modulate physiological and hormonal adaptation strategies in *Cleistocalyx operculatus* and *Syzygium jambos* under long-term waterlogging conditions. BMC Plant Biology. 22(1): 523.

Edwards, S.G. and B. Seddon. 2001. Selective media for the specific isolation and enumeration of *Botrytis cinerea* conidia. Letters in Applied Microbiology. 32(2): 63-66.

Gezahegn, T., B. Tegegne, F. Zewge and B.S. Chandravanshi. 2019. Salting-out assisted liquid–liquid extraction

for the determination of ciprofloxacin residues in water samples by high performance liquid chromatography–diode array detector. BMC Chemistry. 13(1): 28.

Haghpanah, M., S. Hashemipetroudi, A. Arzani and F. Araniti. 2024. Drought tolerance in plants: physiological and molecular responses. Plants. 13(21): 2962.

Heller, J., N. Ruhnke, J.J. Espino, M. Massaroli, I.G. Collado and P. Tudzynski. 2012. The mitogen-activated protein kinase BcSak1 of *Botrytis cinerea* is required for pathogenic development and has broad regulatory functions beyond stress response. Molecular Plant-microbe Interactions. 25(6). 802–816.

Izquierdo-Bueno, I., V.E. González-Rodríguez, A. Simon, B. Dalmais, J.-M. Pradier, P. Le Pêcheur, A. Mercier, A.-S. Walker, C. Garrido, I.G. Collado and M. Viaud. 2018. Biosynthesis of abscisic acid in fungi: identification of a sesquiterpene cyclase as the key enzyme in *Botrytis cinerea*. Environmental Microbiology. 20(7): 2469-2482.

Jarvis, W.R. 1962. The infection of strawberry and raspberry fruits by *Botrytis cinerea* Fr. Annals of Applied Biology. 50(3): 569-575.

Kasote, D.M., R. Ghosh, J.Y. Chung, J. Kim, I. Bae and H. Bae. 2016. Multiple reaction monitoring mode based liquid chromatography-mass spectrometry method for simultaneous quantification of brassinolide and other plant hormones involved in abiotic stresses. International Journal of Analytical Chemistry. 2016(1): 7214087.

Khan, R.T., S.D.A. Gerdezi, S.R. Abbas and A. Batool. 2016. Effect of drought on the growth of tomatoes genotypes. International Journal of Biosciences. 9(1): 421-429.

Ma, Y.Q., D.Z. Li, L. Zhang, Q. Li, J.W. Yao, Z. Ma, X. Huang and Z.Q. Xu. 2017. Ectopic expression of IiFUL isolated from *Isatis indigotica* could change the reproductive growth of *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiology and Biochemistry. 121: 140–152.

Marumo, S., M. Katayama, E. Komori, Y. Ozaki, M. Natsume and S. Kondo. 1982. Microbial production of abscisic acid by *Botrytis cinerea*. Agricultural and Biological Chemistry. 46(7): 1967–1968.

Raja, H.A., A.N. Miller, C.J. Pearce and N.H. Oberlies. 2017. Fungal identification using molecular tools: a primer for the natural products research community. Journal of Natural Products. 80(3): 756-770.

Shi, T.Q., H. Peng, S.Y. Zeng, R.Y. Ji, K. Shi, H. Huang and X.J. Ji. 2017. Microbial production of plant hormones: opportunities and challenges. Bioengineered. 8(2): 124–128.

Wilkinson, S., G.R. Kudoyarova, D.S. Veselov, T.N. Arkhipova and W.J. Davies. 2012. Plant hormone interactions: innovative targets for crop breeding and management. Journal of Experimental Botany. 63(9): 3499–3509.