การชักนำสารและกลไกที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานต่อศัตรูพืชในยาสูบ ด้วยสารสกัดสคอพอเลตินจากผลยอบ้าน

Inducing Substances and Plant Defense Mechanisms Related to Pest Resistance in Tobacco with Scopoletin Extracts from the *Morinda citrifolia* L. (Noni) Fruits

เขมมิการ์ โขมพัตร[1/*] เยาวภา สุขพรมา[2/] ปริยากร ฤทธิสุนทร[1/] ฐิติกร พรหมบรรจง[3/] วิมลวรรณ วัฒนวิจิตร[4/]

Khemmikar Khompatara[1/*] Yaowapa Sukpondma[2/] Pariyakorn Ritthisoonthorn[1/]

Thitikorn Prombanchong[3/] Wimonwan Wattanawichit[4/]

Received 20 Apr. 2025/Revised 17 Sep. 2025/Accepted 7 Oct. 2025

ABSTRACT

Scopoletin is a secondary metabolite found in many plants. It possesses antioxidant properties and inhibits the growth of microorganisms. This research aimed to extract scopoletin from Thai noni (*Morinda citrifolia* L.) fruit to investigate its potential role in inducing compounds and mechanisms related to pest resistance in tobacco plants. The extraction was performed using the maceration method with ethanol as the solvent. The extract was then separated by column chromatography using silica gel as the stationary phase and a mixture of ethyl acetate and hexane (0–60% v/v) as the mobile phase. The presence of scopoletin in each fraction was detected by TLC under UV light at 365 nm. The fraction containing scopoletin was further purified using 2% methanol in dichloromethane as the mobile phase. The purified compound was identified using TLC, UV-visible spectroscopy, Fourier transform infrared spectroscopy and nuclear magnetic resonance spectroscopy. The results confirmed that the obtained yellow crystal were scopoletin, with a yield of 0.038±0.01%. A resistance induction assay was performed by infiltrating scopoletin into tobacco leaves at concentrations of 100, 500 and 1,000 μM. The treatment stimulated the production of salicylic acid and increased the activities of phenylalanine ammonia-lyase, glucanase and peroxidase, with peak

[1/] สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 8 อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90110

[1/] Office of Agricultural Research and Development Region 8, Hat Yai, Songkhla 90110, Thailand

[2/] คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90110

[2/] Faculty of Science, Prince of Songkla University. Hat Yai, Songkhla 90110, Thailand

[3/] คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตนครศรีธรรมราช จ.นครศรีธรรมราช 80110

[3/] Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of Technology Srivijaya, Nakhon Si Thammarat campus, Nakhon Si Thammarat 80110, Thailand

[4/] กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร ถ.พหลโยธิน จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

[4/] Postharvest and Processing Research and Development Division, Phaholyothin Rd., Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand

[*] **Corresponding author: kjoy2000@hotmail.com**

responses observed at different time points. These findings suggest that scopoletin isolated from Thai noni fruit may functions as a plant elicitor that enhances pest resistance in tobacco by activating signaling molecules and defense-related enzymes.

Keywords: scopoletin; noni fruit; extraction; resistance; plant elicitor

บทคัดย่อ

สคอพอเลตินเป็นสารทุติยภูมิที่พบในพืชหลายชนิด สามารถต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อสกัดแยกสารสคอพอเลตินจากผลยอบ้าน (*Morinda citrifolia* L.) ของไทยและนำมาใช้ชักนำสารและกลไกที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานต่อศัตรูพืชในต้นยาสูบ ทำการสกัดสารจากผลยอโดยวิธีการหมักแช่ด้วยเอทานอล จากนั้นแยกสารสกัดด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีที่มีซิลิกาเจลเป็นเฟสอยู่กับที่ ชะด้วยสารละลายผสมเอทิลอะซิเตทและเฮกเซน (0-60%v/v) จากนั้นตรวจสอบส่วนย่อยที่แยกได้ด้วยวิธี TLC ภายใต้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร แล้วแยกส่วนย่อยที่มีสคอพอเลตินให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ 2% เมทานอลในไดคลอโรมีเทนเป็นตัวชะพบว่า สคอพอเลตินที่ได้มีผลึกเป็นสีเหลือง ยืนยันความเป็นสคอพอเลตินโดยใช้ TLC UV-visible spectroscopy Fourier transform infrared spectroscopy และ nuclear magnetic resonance spectroscopy โดยมีผลได้ 0.038$\pm$0.01% การทดสอบการชักนำความต้านทานด้วยวิธีฉีดสารสคอพอเลตินเข้มข้น 100 500 และ 1,000 ไมโครโมลาร์ ในใบยาสูบ พบว่า สามารถกระตุ้นการผลิตกรดซาลิซิลิก และเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนิลอะลานีน แอมโมเนียไลเอส กลูคาเนส และเปอร์ออกซิเดส โดยมีรูปแบบการตอบสนองสูงสุดในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน จึงมีความเป็นไปได้ว่าสคอพอเลตินที่สกัดจากผลยอบ้านของไทยมีคุณสมบัติเป็นสารกระตุ้นความต้านทานในต้นยาสูบผ่านการกระตุ้นโมเลกุลสัญญาณและเอนไซม์ที่สำคัญในระบบความต้านทานของพืช

คำสำคัญ: สคอพอเลติน; ผลยอบ้าน; การสกัด; ความต้านทาน; สารกระตุ้นความต้านทานในพืช

บทนำ

ยอบ้าน หรือ noni มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Morinda citrifolia* L. เป็นไม้ยืนต้น ใบมีสีเขียวเข้ม ผลทรงยาวรี เมื่ออ่อนสีเขียว พอสุกเปลี่ยนเป็นสีขาวนวล กลิ่นแรง มีเมล็ดจำนวนมาก เป็นสมุนไพรพื้นบ้านใช้ประโยชน์ได้ทั้งส่วนใบ ราก และผล (ณพัฐอร, 2563) ส่วนของผลมีสารพฤกษเคมีที่สำคัญหลายชนิด เช่น กรดไขมัน ฟลาโวนอยด์ ลิกแนน แอนทราควิโนน คูมาริน และสคอพอเลติน เป็นต้น สารเหล่านี้มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ เช่น ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ (Bushnell et al., 1950) ต้านการอักเสบ (Motshakeri and Ghazali., 2015) ต้านอนุมูลอิสระ (Su et al., 2005) ป้องกันมะเร็ง และเสริมสร้างประสิทธิภาพของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย (Wang and Su, 2001)

สารสคอพอเลติน (scopoletin) หรือ 6-methoxy -7-hydroxycoumarin เป็นสารทุติยภูมิที่พบในผลยอและพืชหลายชนิด การสังเคราะห์สารทุติยภูมินี้มักเกิดขึ้นผ่านวิถีฟีนิลโพรพานอยด์ ซึ่งมีเอนไซม์ฟีนิลอะลานีนแอมโมเนียไลเอส (phenylalanine ammonialyase; PAL: EC 4.3.1.24) ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์แรกในวิถี (Deenamo et al., 2018) วิถีดังกล่าวยังเป็นแหล่งสังเคราะห์สารโมเลกุลสัญญาณในระบบป้องกันตนเอง เช่น กรดซาลิซิลิก (salicylic) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นให้เกิดความต้านทานแบบ systemic acquired resistance (SAR) (Kachroo et al., 2022) โดยมีการส่งสัญญาณ

จากพื้นที่ที่ถูกบุกรุกไปยังพื้นที่ห่างไกลออกไปให้มีการเตรียมความพร้อมรองรับก่อนที่การบุกรุกจะขยายขอบเขต (Huang et al., 2020) โดยการส่งสัญญาณนี้ยังกระตุ้นให้พืชสังเคราะห์โปรตีนในกลุ่ม pathogenesis-related protein (PR-protein) เช่น เปอร์ออกซิเดส (peroxidase; POD: EC 1.11.1.7) หรือ PR-9 ซึ่งทำหน้าที่กำจัดสารพิษที่เกิดในกระบวนการเมทาบอลิซึมของเซลล์ เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ตลอดจนเกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างความแข็งแรงให้กับผนังเซลล์พืช การสังเคราะห์เอนไซม์กลูคาเนส (β-1,3-glucanase; GLU: EC 3.2.1.39) หรือ PR-2 ซึ่งทำหน้าที่ตัดพันธะเบต้า 1,3 กลูโคซิดิก (β-1,3-glucosidic bond) (Du et al., 2021) ซึ่งเป็นโครงสร้างของกลูแคนที่เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์เชื้อราหลายชนิด ทำให้สามารถทำลายเชื้อราที่บุกรุกได้

ในการผลิตทางการเกษตรอย่างยั่งยืน การจำกัดการใช้สารเคมีสังเคราะห์ให้อยู่ในระดับที่จำเป็นควบคู่ไปกับการจัดการพืชแบบผสมผสาน การค้นหาสารธรรมชาติชนิดใหม่ที่สามารถชักนำให้พืชเพิ่มระดับความต้านทานต่อศัตรูพืชด้วยตนเองจึงเป็นอีกแนวทางที่มีความสำคัญ อย่างไรก็ตาม ข้อมูลเกี่ยวกับการสกัดสารสคอพอเลตินจากผลยอและกลไกที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานศัตรูพืชในประเทศไทยยังมีอยู่อย่างจำกัด งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อนำผลยอบ้านของไทยมาสกัดสารสคอพอเลติน พร้อมทั้งทดสอบการใช้สารดังกล่าวเพื่อชักนำกลไกความต้านทานต่อศัตรูพืชในต้นยาสูบ เพื่อนำผลการวิจัยไปประยุกต์ใช้ในการควบคุมศัตรูพืชในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การสกัดแยกสารสคอพอเลติน

1.1 การคัดเลือกระยะสุกแก่ที่เหมาะสม

นำผลยอที่เก็บจากพื้นที่ อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา ล้างทำความสะอาด และจำแนกตามความสุกแก่ เป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ ระยะที่ 1 ผลยออ่อน (มีสีเขียวทั้งผล) ระยะที่ 2 ผลยอสุก 50% (มีสีเหลืองอมเขียว) ระยะที่ 3 ผลยอสุก 100% (มีสีเหลืองทั้งผล) และระยะที่ 4 ผลสุกมากกว่า 100% (มีสีน้ำตาลเริ่มพบการเน่าสลายของผล) กลุ่มละ 10 ผล สกัดตามวิธี Ba et al. (2017) โดยหั่นผลยอเป็นชิ้นเล็ก ๆ นำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60°ซ. เป็นเวลา 7 วัน หรือจนกว่าน้ำหนักแห้งคงที่ จากนั้นบดให้เป็นผงด้วยเครื่องบดตัวอย่างพืช แล้วสกัดด้วยเอทานอลในอัตราส่วนผงยอ 1 ก./เอทานอล 95% 10 มล. แช่ไว้ 3 วัน ในที่มืด ณ อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบ/นาที นาน 30 นาที เก็บสารละลายใสนำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน จนได้สารสีน้ำตาลดำมีลักษณะกึ่งของแข็ง (semi-solid) ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 3 มล. ด้วยเอทานอล 95% ทำการสกัด 3 ซ้ำ สารสกัดที่ได้นำมากรองผ่านเมมเบรนขนาดรูพรุน 0.25 ไมครอน บรรจุในขวดแก้วสีชาเพื่อวิเคราะห์ปริมาณสคอพอเลตินด้วยเครื่อง high performance liquid chromatograph (HPLC: Agilent 1100)

1.2 การสกัดแยกสคอพอเลตินจากผลยอ

นำผงยอ 200 ก. จากระยะผลสุกแก่ที่เลือกได้จากข้อ 1.1 ผสมกับเอทานอล 95% อัตราส่วน 1:3 เขย่าที่ 200 รอบ/นาที วันละ 6 ชม. สลับกับวางในที่มืด เก็บส่วนสารละลายใสในวันที่ 2 แล้วสกัดซ้ำตามวิธีการเดิมอีก 2 รอบ นำสารละลายใสทั้ง 3 รอบรวมกัน กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 จากนั้นระเหยตัวทำละลายออกภายใต้สุญญากาศ จนได้สารสกัดเอทานอลที่มีลักษณะเป็นกึ่งของแข็ง สีน้ำตาลดำ ละลายสารสกัดโดยใช้เฮกเซน แยกส่วนสารสกัดที่ละลายในเฮกเซนออก จากนั้นนำส่วนที่ไม่ละลายในเฮกเซนมาผสมกับซิลิกาเจลในอัตราส่วน 1:1 (W/W) บดในโกร่งบดยาจนได้ผงร่วนสีน้ำตาลอ่อน นำไปแยกผ่านคอลัมน์แก้วที่บรรจุซิลิกาเจล อัตราส่วนตัวอย่าง : ปริมาณซิลิกาทั้งหมด 1:10 (W/W) ทำการชะด้วย

สารละลายเอทิลอะซิเตทในเฮกเซน โดยเพิ่มความเข้มข้นของเอทิลอะซิเตทครั้งละ 10% เก็บส่วนของสาร (fraction) ที่ถูกแยกผ่านคอลัมน์ส่วนละ 50 มล. นำส่วนต่าง ๆ มาตรวจสอบด้วยเทคนิค thin layer chromatography (TLC) (silica gel 60 F254 aluminium sheet) โดยใช้เอทิลอะซิเตท : เฮกเซน อัตราส่วน 50 : 50 V/V เป็นตัวเคลื่อนที่ ตรวจสอบส่วนของสารที่แยกได้โดยส่องภายใต้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร เลือกส่วนย่อยที่มีสารเรืองแสงสีน้ำเงินและมีค่า relative of flow (R_f) ตรงกับสารมาตรฐานสคอพอเลตินไประเหยตัวทำละลายออกแล้วแยกต่อด้วยคอลัมน์อีกครั้ง โดยใช้สารละลายเมทานอล 2% ในไดคลอโรมีเทนเป็นตัวชะ ทำการทดสอบส่วนที่แยกได้อีกครั้งด้วยวิธี TLC และรวบรวมส่วนย่อยที่มีค่า R_f ของสารตรงกับสคอพอเลติน จากนั้นนำไประเหยตัวทำละลายออก ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารที่แยกได้ด้วยวิธี TLC โดยใช้สารละลายเมทานอลความเข้มข้น 2% ในไดคลอโรมีเทนเป็นตัวเคลื่อนที่ นำไปส่องภายใต้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 365 และ 254 นาโนเมตร ชั่งน้ำหนักและคำนวณปริมาณสคอพอเลตินที่สกัดได้โดยใช้สูตรผลได้ (% yields) = (น้ำหนักของสคอพอเลตินที่สกัดได้/น้ำหนักผงยอแห้ง)x100

1.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารที่สกัดแยกได้

นำผลึกสารที่แยกได้มาตรวจวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 190-900 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer (UV Biochrom/Libra S22) วิเคราะห์หมู่ฟังก์ชั่นด้วยเทคนิค Fourier transform infrared spectroscopic (FT-IR) ด้วยเครื่อง Fourier transform infrared spectrometer (VERTEX 70, Bruker, Germany) และวิเคราะห์สเปกตรัมของ ^{1}H และ ^{13}C NMR ด้วยเครื่อง 300 MHz Bruker AVANCE spectrometer เปรียบเทียบกับสคอพอเลตินมาตรฐาน

2. การทดสอบระดับความเข้มข้นของสารสคอพอเลตินต่อการชักนำความต้านทานในต้นยาสูบ

นำต้นยาสูบอายุ 3 เดือน ที่มีขนาดใกล้เคียงกันมาเลี้ยงในโรงเรือนป้องกันแมลงที่มุงหลังคาด้วยพลาสติกใส ภายใต้สภาวะแวดล้อมที่ได้รับแสงแดดจากธรรมชาติ แบ่งเป็น 4 กลุ่ม ๆ ละ 5 ต้น ฉีดสารละลายสคอพอเลตินความเข้มข้น 0 (น้ำกลั่น) 100 500 และ 1,000 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ โดยใช้หลอดฉีดยาฉีดสารทดสอบ (infiltrate) เข้าไปยังบริเวณช่องว่างระหว่างเส้นใบให้เต็มช่อง 4 ช่อง/ใบ โดยใช้ใบที่อยู่บริเวณกลางลำต้น 5 ใบ/ต้น จากนั้นเก็บใบที่เวลา 0 12 24 48 และ 120 ชม.หลังการฉีด ต้นละ 1 ใบ/ช่วงเวลา ชั่งน้ำหนักใบสดนำไปห่อด้วยกระดาษอลูมิเนียมฟอยล์ แช่ลงในไนโตรเจนเหลวเพื่อหยุดปฏิกิริยาภายในใบ เก็บใบที่อุณหภูมิ –40°ซ. จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์ปริมาณสารและกิจกรรม (activity) ของเอนไซม์ในระบบความต้านทานพืช ได้แก่ กรดซาลิซิลิก กรดแอบไซซิก เอนไซม์ฟินิลอะลานีนแอมโมเนียไลเอส เอนไซม์กลูคาเนส และเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

3. การสกัดและวิเคราะห์สารทุติยภูมิด้วยเทคนิค HPLC

3.1 การสกัดสารทุติยภูมิจากใบยาสูบ

นำตัวอย่างใบยาสูบที่ได้รับการฉีดสารสคอพอเลติน 0.5 ก. มาสกัดตามวิธี Ederli et al. (2011) โดยบดให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลวในโกร่งบดยาเติมเมทานอล 90% 750 ไมโครลิตร บดให้เข้ากัน นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที นำสารละลายส่วนใสที่ได้พักไว้ จากนั้นนำส่วนตะกอนผสมกับเมทานอล 100% 500 ไมโครลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที รวมสารละลายส่วนใสที่ได้กับสารละลายส่วนใสเดิมที่พักไว้ วัดปริมาตรที่ได้ก่อนเติมสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก 50%

ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของกรดเป็น 5% นำตัวอย่างที่สกัดได้ไปกรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.25 ไมครอน เก็บรักษาในขวดแก้วสีชา

3.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารทุติยภูมิด้วยเครื่อง HPLC

นำตัวอย่างมาฉีดลงเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์ชนิด reverse-phase (ZORBAX Eclipse XDB-c18, 4.6x150 mm, 5 micron) ครั้งละ 20 ไมโครลิตร ใช้เฟสเคลื่อนที่ 2 ชนิด คือ 1) อะซิโตไนไตรล์ และ 2) สารละลายกรดฟอร์มิกเข้มข้น 0.1% ตั้งโปรแกรมควบคุมอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ตามระยะเวลา (นาที)/% ของอะซิโตไนไตรล์ ดังนี้ นาทีที่ 0-2/80% และ นาทีที่ 8.5-10/60% โดยควบคุมอัตราเร็วของเฟสเคลื่อนที่เป็น 1 มล./นาที และควบคุมอุณหภูมิของคอลัมน์ที่ 40°ซ. ตรวจวัดสัญญาณของกรดแอบไซซิก ด้วย diode array detector ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ตรวจวัดสัญญาณของสารสคอพอเลตินและกรดซาลิซิลิก ด้วย fluorescence detector โดยที่เวลา 0-8 นาทีแรก ตั้งค่าช่วงแสง excitation และ emission เป็น 337 และ 425 นาโมเมตร เพื่อวิเคราะห์สคอพอเลติน จากนั้นตั้งค่าช่วงแสงเป็น 294 และ 426 นาโนเมตร เพื่อวิเคราะห์กรดซาลิซิลิก คำนวณผลจากพื้นที่ใต้พีคด้วยโปรแกรม Chemstation เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแอบไซซิก สคอพอเลติน และกรดซาลิซิลิก (ช่วงของสารมาตรฐานแต่ละชนิด=0.05-10 ไมโครกรัม/มล.)

4. การสกัดและวัดกิจกรรมของเอนไซม์ในระบบความต้านทานพืช

4.1 การสกัดเอนไซม์จากใบยาสูบ

เตรียมสารสกัดเอนไซม์จากตัวอย่างใบยาสูบตามวิธี Chanwun et al. (2013) โดยมีขั้นตอนดังนี้ นำใบยาสูบ 0.5 ก. มาบดด้วยไนโตรเจนเหลวในโกร่งบดยา และเติมทริสไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ pH 7.0 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ 1 มล. ที่มี Triton X-100 เข้มข้น 0.25% (V/V) ผสมอยู่ แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4°ซ. 30 นาที เก็บสารละลายส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

4.2 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ในระบบความต้านทานพืช

4.2.1 เอนไซม์ฟินิลอะลานีนแอมโมเนียไลเอส

วัดกิจกรรมของเอนไซม์ฟินิลอะลานีนแอมโมเนียไลเอสตามวิธี Deenamo et al. (2018) โดยมีขั้นตอนดังนี้ ผสมสารละลายตัวอย่าง 100 ไมโครลิตร ลงไปในทริสไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ pH 8.9 เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่มี L-phenylalanine เข้มข้น 0.1 โมลาร์ 930 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ. เป็นเวลา 1 ชม. จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 6 นอร์มอล 160 ไมโครลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 290 นาโนเมตร คำนวณค่าการดูดกลืนแสงก่อนและหลังการบ่ม เทียบกับกราฟมาตรฐาน trans-cinnamic acid ในหน่วย nmol trans-cinnamic acid/h/gFW

4.2.2 เอนไซม์กลูคาเนส

วัดกิจกรรมของเอนไซม์ตามวิธี Santos et al. (1977) โดยปฏิกิริยาประกอบด้วย สารละลายตัวอย่าง (ความเข้มข้นที่เหมาะสม) 100 ไมโครลิตร สารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมอะซิเตท pH 5.0 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ 200 ไมโครลิตร และสารละลายลามินารินความเข้มข้น 2 มก./มล. 200 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 35°ซ. นาน 20 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยเติมสารละลายไดไนโตรซาลิซิเลต 200 ไมโครลิตร นำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที รอให้เย็นลงแล้วเติมน้ำกลั่น 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร คำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐานกลูโคส โดยปริมาณกลูโคสที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาของเอนไซม์ เท่ากับปริมาณกลูโคสทั้งหมด

ที่วัดได้ – ปริมาณกลูโคสเดิมที่มีในสารละลายลามินาริน – ปริมาณกลูโคสเดิมในตัวอย่างซึ่งไม่ใช่ผลผลิตจากการทำงานของเอนไซม์ และรายงานผลในหน่วย µg glucose/min/ gFW

4.2.3 เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

นำสารสกัดเอนไซม์ไปแยกด้วยไฟฟ้าบนแผ่นเจลที่ความเข้มข้นของโพลีอะคริลาไมด์ 7% แบบไม่แปลงสภาพ ใช้ไฟฟ้า 150 โวลต์ในการแยก ตามวิธี Ali et al. (2005) โหลดตัวอย่างครั้งละ 8 ไมโครลิตร นำตัวอย่างที่แยกอยู่บนเจลไปย้อม ตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส โดยบ่มเจลในสารละลายโปแทสเซียมบัฟเฟอร์ pH 7.0 ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ นาน 15 นาที จากนั้นนำไปแช่ลงในสารละลายผสมระหว่างโปแทสเซียมบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ที่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ผสมอยู่ และไกวเอคอล ความเข้มข้น 18 มิลลิโมลาร์ รอกระทั่งปรากฏแถบสีเหลืองอมน้ำตาลของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ซึ่งสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า

5. การวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิเคราะห์ตัวอย่างทำการทดสอบอย่างน้อย 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำเมื่อนำมาวิเคราะห์ในระดับห้องปฏิบัติการมีการทำซ้ำในทุกรายการ วิเคราะห์ค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยผลทดสอบที่ได้โดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว ทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การคัดเลือกระยะสุกแก่ที่เหมาะสม

ปริมาณสคอพอเลตินในผลยอระยะสุก-แก่ที่แตกต่างกันทั้ง 4 กลุ่ม พบว่า ระยะที่ 1 มีปริมาณน้อยที่สุด 69.18±62.66 มก./กก.น้ำหนักแห้ง ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยพบในระยะที่ 2-4 ปริมาณ 321.30±26.25 353.66±123.29 และ 267.41±60.82 มก./กก. น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ สอดคล้องกับการศึกษาของ Yang et al. (2007) ซึ่งระบุว่าน้ำลูกยอที่ผลิตจากผลยอสุกมีปริมาณสคอพอเลตินสูงกว่าที่ผลิตมาจากผลยอที่ยังไม่สุก จากผลการวิเคราะห์บ่งชี้ให้เห็นว่าผลยอระยะสุกตั้งแต่ 50% ขึ้นไปมีความเหมาะสำหรับใช้สกัดสคอพอเลติน (Figure 1) โดยมีค่าปริมาณสคอพอเลตินเฉลี่ย 314.12±43.57 มก./กก.น้ำหนักแห้ง อย่างไรก็ตามนอกจากระยะสุกแก่ของผลแล้ว ปริมาณสคอพอเลตินในผลยออาจมีความแตกต่างได้จากสิ่งแวดล้อม เช่น ฤดูกาล (Jia et al., 2020) หรือค่า pH ของดิน (Galán-Pérez et al., 2021)

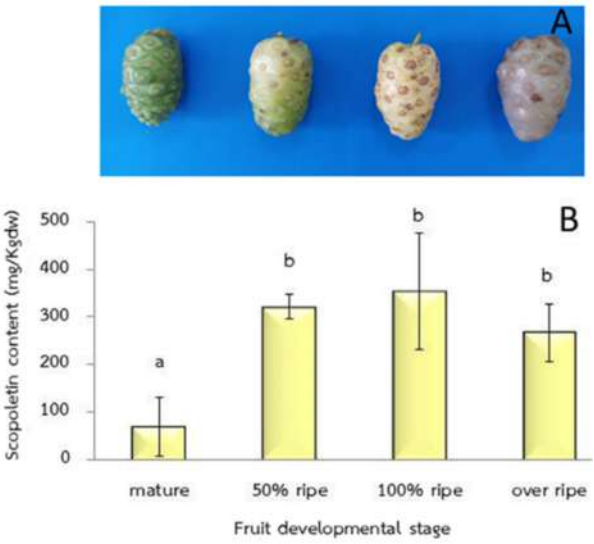


Figure 1 Changes of scopoletin content along with fruit ripening; phenotypes of noni fruit at different developmental stage (A) and changes of scopoletin content along with fruit development and ripening (B). Values are means±SD of three biological replicates. Different letters denote significant differences at $p<0.05$

2. การสกัดแยกสารสคอพอเลตินบริสุทธิ์

การแยกสคอพอเลตินออกจากสารสกัดหยาบ พบว่า สารสคอพอเลตินเริ่มแยกออกจากคอลัมน์เมื่อเพิ่มอัตราส่วนของเอทิลอะซิเตทถึง 60% เมื่อนำส่วนของสารที่ตรวจพบการเรืองแสงตรงกับสารสคอพอเลตินมาตรฐานจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TLC เมื่อนำส่วนย่อยดังกล่าวมาระเหยตัวทำละลายออก และตรวจสอบความบริสุทธิ์อีกครั้งด้วยเทคนิค TLC ในตัวเคลื่อนที่สารละลายเมทานอล 2% ในไดคลอโรมีเทนพบว่า มีแถบสารมากกว่า 1 แถบ ภายใต้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 365 และ 254 นาโนเมตร จึงนำไปแยกต่อด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟีครั้งที่ 2 โดยชะด้วยสารละลายเมทานอล 2% ในไดคลอโรมีเทน เมื่อตรวจสอบส่วนย่อยที่แยกได้ด้วยเทคนิค TLC ปรากฏแถบของสารเพียงแถบเดียวในตำแหน่งตรงกับสารมาตรฐานสคอพอเลติน (Figure 2) โดยส่วนย่อยที่แยกได้มีลักษณะเป็นผงสีเหลือง มี yield 0.038±0.001%สอดคล้องกับรายงานของอภิรักษ์และคณะ (2561) ที่ระบุปริมาณสคอพอเลตินในผลยอ 0.02-0.07%

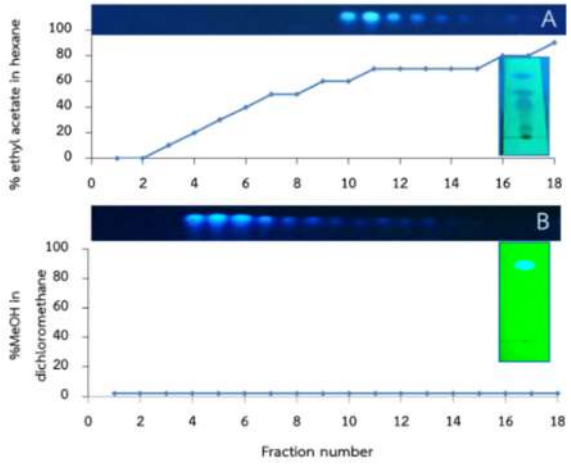


Figure 2 Two steps of scopoletin purification from noni fruit; the first separation using gradient elution (0-90% ethyl acetate) and the purity test by TLC (A) and the second separation using isocratic elution (2% methanol in dichloromethane) and the purity test by TLC (B)

3. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารที่สกัดแยกได้

สารที่สกัดแยกได้มีลักษณะเป็นผงสีเหลือง จากข้อมูลยูวีสปคตรัม (Figure 3) ปรากฏแถบดูดกลืนที่ความยาวคลื่น 228 และ 345 นาโนเมตร แสดงว่ามีระบบคอนจูเกชัน ข้อมูลการวิเคราะห์สเปกตรัม FTIR เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน (Figure 4) พบว่า มีค่า correlation ที่ระบุความคล้ายคลึงกัน 94.8% โดยมีรายละเอียดหมู่ฟังก์ชั่น แสดงดัง Table 1 ผลการศึกษาสเปกตรัม ^{1}H NMR และ ^{13}C NMR ของสารที่สกัดแยกได้จากผลยอบ้านและสารมาตรฐาน (Figure 5) โดยข้อมูล ^{1}H NMR สเปกตรัม ปรากฏ สัญญาณของ ortho-coupled aromatic proton ที่เป็นลักษณะเฉพาะของวง pyrone ที่ δ6.19 (*d*, *J* = 9.0 Hz, H-3) และ 7.60 (*d*, *J* = 9.0 Hz, H-4) และสัญญาณ singlet aromatic proton ที่ δ_H 6.82 (*s*, 2H, H-6 และ H-9) นอกจากนี้ ยังพบสัญญาณของหมู่ methoxyl ที่ δ_H 3.88 (*s*, 3H, 7-OCH_3) จากข้อมูล ^{13}C NMR ประกอบด้วย 10 คาร์บอนที่ δ_C 162.4 150.8 150.1 145.1 144.1 112.4 111.2 108.1 103.3 และ 56.3 จากการเปรียบเทียบข้อมูล NMR กับสารที่ได้เคยรายงานมาแล้ว ยืนยันได้ว่าสารที่แยกได้คือ สารสคอพอเลติน

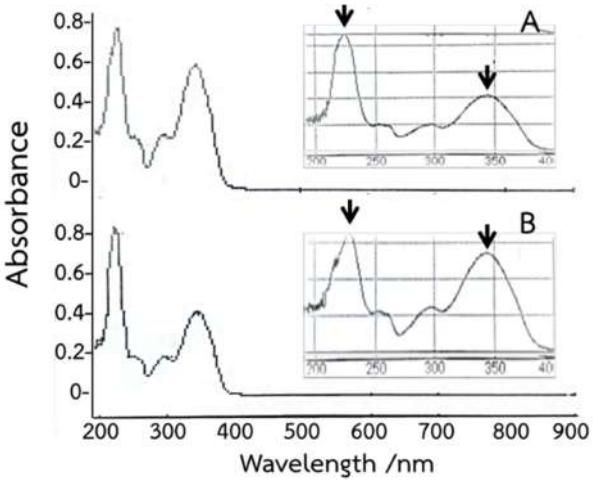


Figure 3 UV-spectrum of isolated compound from noni fruit (A) and standard scopoletin (B)

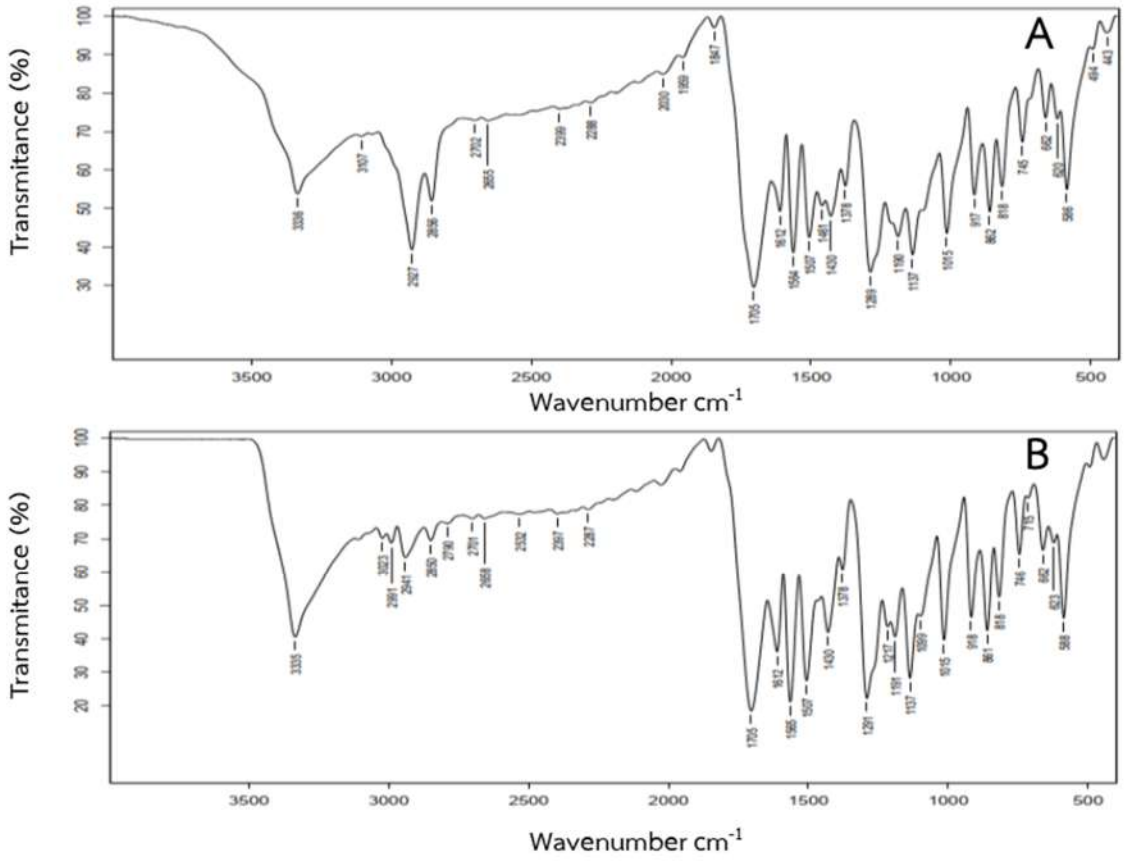


Figure 4 FTIR-spectrum of isolated compound from noni fruit (A) and standard scopoletin (B)

Table 1 The data from FTIR spectrum of isolated compound from noni fruit

Wavenumber (cm^{-1})		Functional group
Standard scopoletin	Isolated compound	
3,335	3,336	O-H Alcohol group present
2,850	2,856	C-H group present
1,705	1,705	Carbonyl C=O group present
1,612	1,612	CH=CH group present
1,565	1,564	Benzene ring present
1,507	1,507	Benzene ring present
861	862	Due to substitution of benzene

4. การทดสอบใช้สารสคอพอเลตินต่อการชักนำความต้านทานในต้นยาสูบ

ผลการทดสอบพบการเพิ่มปริมาณกรดซาลิซิลิกในใบที่ได้รับสคอพอเลติน 500 ไมโครโมลาร์ที่เวลา 12 ชม. โดยมีปริมาณกรดซาลิซิลิกสูงที่สุด 21.16±7.76 นาโนกรัม/ก. น้ำหนักสด แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) จากนั้นลดลงใน ชม.ที่ 24 (Figure 6A) รูปแบบการเพิ่มขึ้นของกรดซาลิซิลิกนี้มีความคล้ายคลึงกับผลการทดลองของ Dorey et al. (1997) ที่ชักนำความต้านทานในใบยาสูบด้วยการฉีดสารไกลโคโปรตีนจากเชื้อราแล้ว

พบการเพิ่มของกรดซาลิซิลิก สูงที่สุดภายในเวลา 14 ชม. ก่อนจะลดลงใน ชม.ที่ 24 และจากรายงานของ Ding and Ding (2020) ระบุว่าในสภาวะปกติปริมาณกรดซาลิซิลิกในพืชจะอยู่ในระดับต่ำ เมื่อถูกกระตุ้นด้วยสารกระตุ้นหรือเชื้อก่อโรค จะเพิ่มปริมาณขึ้นอย่างรวดเร็ว เพื่อเริ่มต้นเข้าสู่กระบวนการต้านทานภายในพืช โดยมีการเสริมความแข็งแรงแก่ผนังเซลล์ เพิ่มการผลิตสารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ รวมทั้งเพิ่มการสร้างโปรตีนในกลุ่ม pathogenesis-related proteins (PRs-protein) ส่งผลให้พืชสามารถต้านทานต่อการบุกรุกของเชื้อก่อโรค (Dos Santos and Franco, 2023) นอกจากนี้ Kim and Hwang (2000) รายงานว่าสคอพอเลติน 500 ไมโครกรัม/มล.ที่ฉีดบนใบยาสูบสามารถชักนำการแสดงออกของยีน *PR-1* ซึ่งเกี่ยวข้องวิถีการป้องกันตนเองของพืช แบบ SAR โดยมีกรดซาลิซิลิกเป็นโมเลกุลส่งสัญญาณ

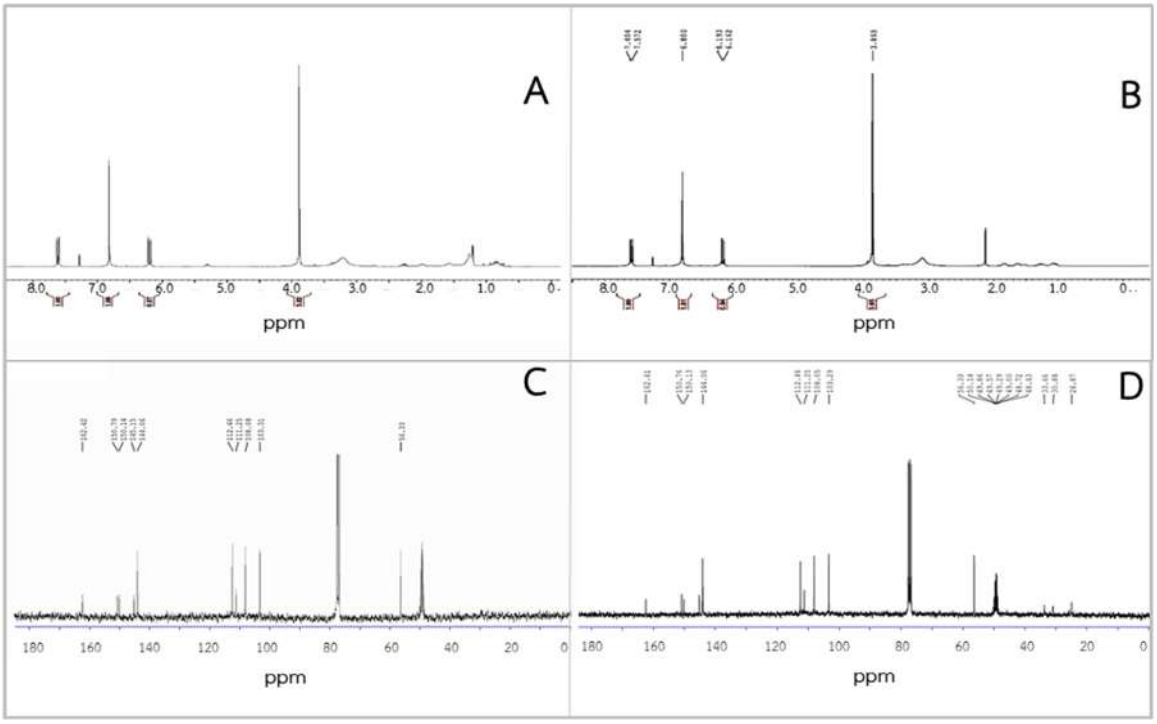


Figure 5 Representative ^{1}H NMR spectra of isolated compound from noni fruit and standard scopoletin (A and B) and ^{13}C NMR spectra of isolated compound from noni fruit and standard scopoletin (C and D)

ในทางตรงกันข้ามพบว่า กรดแอบไซซิกในใบที่ได้รับสคอพอเลติน 1,000 ไมโครโมลาร์ มีปริมาณลดลงอย่างมีนัยสำคัญที่เวลา 24 ชม. หลังเริ่มทดสอบ (Figure 6B) บ่งชี้ถึงการทำงานแบบ antagonistic interaction ระหว่างกรดแอบไซซิกและกรดซาลิซิลิก อย่างไรก็ตาม ใน ชม.ที่ 48 พบว่า ปริมาณกรดแอบไซซิกมีแนวโน้มสูงขึ้นในกลุ่มใบที่ได้รับการฉีดสารสคอพอเลติน ทั้งนี้ กรดแอบไซซิกเป็นฮอร์โมนพืชที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการเจริญเติบโตรวมทั้งการเกิดความต้านทานในพืช (Iriti and Faoro, 2008) ดังนั้น การเพิ่มปริมาณของกรดแอบไซซิกในช่วงดังกล่าว อาจเกี่ยวข้องกับการทำหน้าที่ในด้านการส่งเสริมการเจริญเติบโต ซึ่งสอดคล้องกับ Beyer et al. (2019) ที่ได้ทดสอบให้สคอพอเลตินแก่ต้นถั่วเหลืองที่มีผลเพิ่มผลผลิตเมล็ดถั่วเหลืองได้

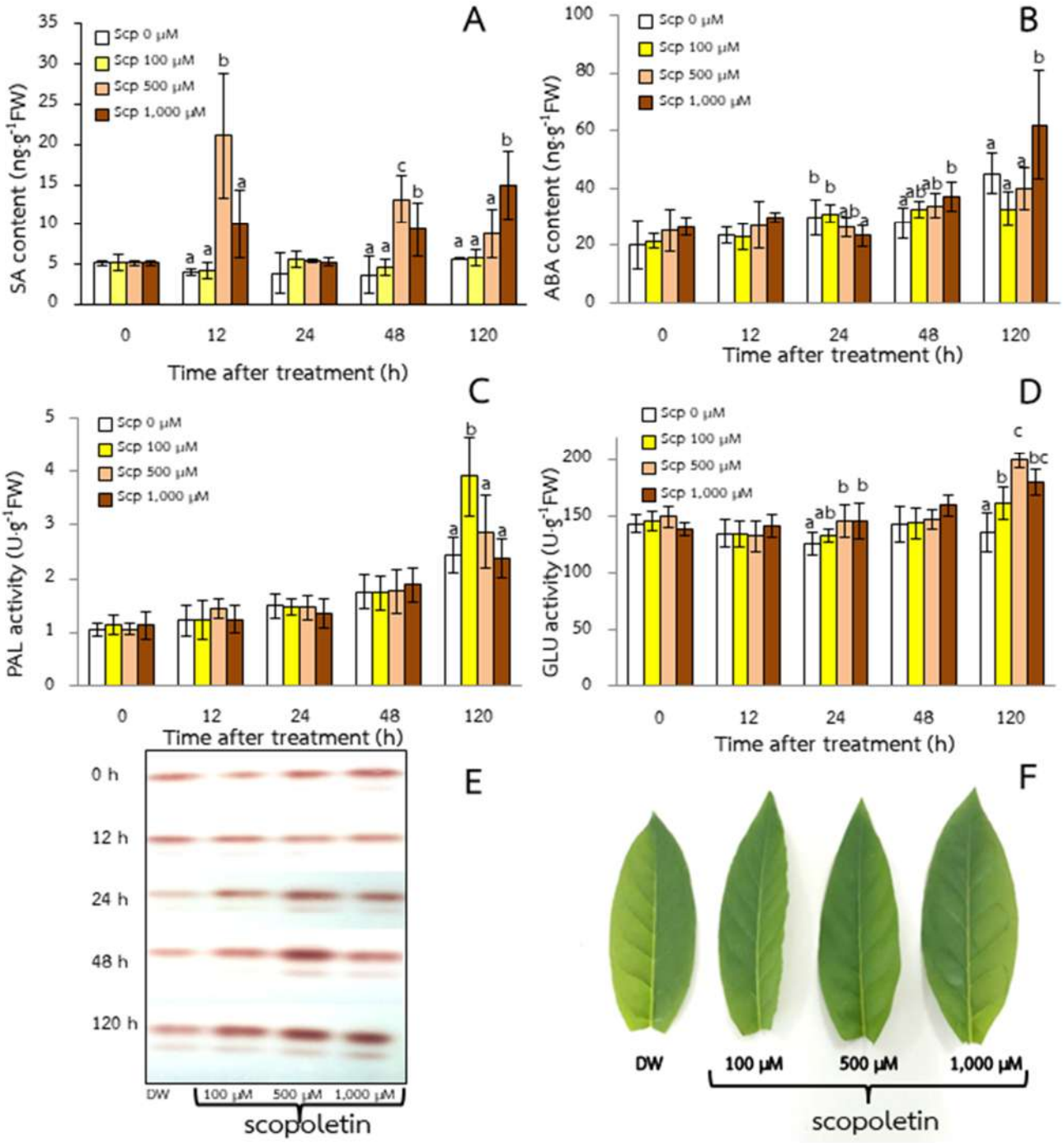


Figure 6 Physio-morphological traits of tobacco leaves after treatment with different scopoletin concentrations. Scopoletin elicited changes in salicylic acid content (A), abscisic acid content (B), activities of PAL (C), GLU (D) and POD (E) at various time. Leaf appearance in fresh tobacco leaves infiltrated with 0, 100, 500 and 1,000 μM of scopoletin for 120 h. (F). Data were means±SD. Different letters among treatments within the same time point indicated significant differences ($p<0.05$)

ผลการเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในระบบความต้านทานพืชทั้ง 3 ชนิดพบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ฟินิลอะลานีนแอมโมเนียไลเอสในใบยาสูบ ที่เวลา 0 12 24 และ 48 ชม. ไม่มีความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดสอบ ทั้งนี้เอนไซม์ฟินิลอะลานีนแอมโมเนียไลเอสเป็นเอนไซม์ตัวแรกในวิถีฟินิลโพรพานอยด์ ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารทุติยภูมิหลายชนิดรวมทั้งกรดซาลิซิลิก (Zhang et al., 2021) เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณกรดซาลิซิลิกในใบยาสูบซึ่งเพิ่มสูงที่สุดที่เวลา 12 ชม. หลังทดสอบ จึงเป็นไปได้ว่าการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ฟินิลอะลานีนแอมโมเนียไลเอสอาจเกิดขึ้นก่อนช่วงเวลาดังกล่าว (Figure 6C) อย่างไรก็ตาม ใบที่ฉีดสคอพอเลติน 100 ไมโครโมลาร์ มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์นี้เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญที่เวลา 120 ชม. ทั้งนี้อาจเป็นผลจากการกระตุ้นโดยกรดซาลิซิลิกที่เพิ่มขึ้นเล็กน้อยในช่วงปลายของการเก็บตัวอย่างวิเคราะห์ ซึ่งผลการกระตุ้นในรูปแบบดังกล่าว รายงานโดย Deenamo et al. (2018) ระบุว่ากรดซาลิซิลิกสามารถชักนำการแสดงออกของยีน *HbPAL* ซึ่งควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ฟินิลอะลานีนแอมโมเนียไลเอสในยางพาราได้

เมื่อพิจารณากิจกรรมของเอนไซม์กลูคาเนสในใบยาสูบ พบว่า มีระดับเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญภายหลังจากฉีดสคอพอเลติน 500 และ 1,000 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชม. สอดคล้องกับการเพิ่มของกรดซาลิซิลิกที่เป็นโมเลกุลสัญญาณก่อนหน้าที่เวลา 12 ชม. ทั้งนี้ได้เคยมีการรายงานถึงการเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์กลูคาเนสในพืชชนิดต่าง ๆ เช่น ยาสูบ และฝ้าย หลังถูกกระตุ้นให้เกิดความต้านทานแบบ SAR ด้วยตัวกระตุ้นชนิดต่าง ๆ (Li et al., 2003) (Figure 6D)

ระดับกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสซึ่งประเมินได้จากความเข้มของแถบเอนไซม์ที่ปรากฏบนแผ่นเจลพบว่า ที่เวลา 24 ชม. ต่อเนื่องมายัง ชม. ที่ 48 และ 120 เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในใบที่ฉีดสคอพอเลตินทุกความเข้มข้นมีความเข้มของแถบเอนไซม์สูงกว่าชุดควบคุม (Figure 6E) ซึ่งผลดังกล่าวบ่งชี้ถึงการเพิ่มระดับความต้านทานขึ้นในต้นยาสูบ ซึ่งผลการกระตุ้นเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างลิกนินในพืช (Asadi-sardari et al., 2022) และยังส่งผลกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์โปรตีนชนิดอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มความต้านทานในพืช (pathogen responsive (PR) genes) ได้อีกด้วย (Kidwai et al., 2020) เมื่อพิจารณาระยะเวลาในการตอบสนองภายในต้นยาสูบหลังการกระตุ้นด้วยสคอพอเลติน ควบคู่ไปกับระยะเวลาการฟักตัวของโรคพืช (incubation period) ซึ่งโดยทั่วไปอยู่ในช่วง 1–7 วัน (Oerke and Steiner, 2025) จึงเห็นได้ว่าการชักนำความต้านทานสามารถใช้รองรับการบุกรุกของเชื้อก่อโรคภายใต้สถานการณ์การระบาดของโรคได้ตั้งแต่ช่วงต้นของการฟักตัว นำไปสู่การลดระดับความรุนแรงของโรคได้อย่างทันท่วงที นอกจากนี้ยังพบว่า ความเข้มข้นของสคอพอเลตินที่ใช้ในการทดสอบไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ของใบยาสูบ เนื่องจากไม่ปรากฏการตายของเซลล์บนแผ่นใบในทุกชุดทดสอบหลังการ infiltrate สารลงบนใบพืช (Figure 6F)

สรุปผลการทดลอง

สารที่สกัดจากผลยอบ้านของไทยโดยวิธี maceration ร่วมกับการแยกผ่านคอลัมน์ซิลิกาเจล 2 ครั้ง เมื่อนำไปตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค TLC UV-spectrum scanning FTIR และ NMR ให้ค่าระบุความคล้ายคลึงกัน 94.8% และมีสูตรโครงสร้างตรงกับสารสคอพอเลติน โดยมีผลที่ได้ 0.038$\pm$0.001% การนำสคอพอเลตินที่สกัดแยกได้มาทดสอบฉีดลงบนแผ่นใบของต้นยาสูบโดยวิธี infiltrate สามารถชักนำการเพิ่มปริมาณกรดซาลิซิลิกซึ่งเป็นโมเลกุลสัญญาณ

ในระบบ SAR ได้ภายใน 12 ชม. และเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสและกลูคาเนสได้ภายใน 24 ชม. ซึ่งผลดังกล่าวบ่งชี้ถึงคุณสมบัติการเป็นสารกระตุ้นความต้านทานในต้นยาสูบของสคอพอเลตินที่สกัดได้จากผลยอบ้านของไทย โดยผ่านการกระตุ้นการเพิ่มขึ้นของสารและกลไกที่เกี่ยวข้องในระบบการป้องกันตนเองของพืช

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ นางลาภ พุฒคง ที่ให้ความช่วยเหลือปลูกและดูแลต้นยาสูบสำหรับการทดสอบ กลุ่มเกษตรกรในพื้นที่ จ. สงขลา ที่ให้ความอนุเคราะห์วัตถุดิบผลยอบ้าน นางสาวพรพิมล อธิปัญญาคม ผู้เชี่ยวชาญด้านโรคพืช กรมวิชาการเกษตร สำหรับคำแนะนำในการดำเนินงานวิจัย และขอขอบคุณกองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม สำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.) ที่สนับสนุนงบประมาณในการวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

ณพัฐอร บัวฉุน. 2563. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณฟีนอลลิกรวมของสารสกัดหยาบลูกยอ. วารสารวิจัยและพัฒนาวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 15 (2) : 67-76.

อภิรักษ์ ศักดิ์เพ็ชร ดวงเพ็ญ ปัทมดิลก พีรธรรม เทียมเทียบรัตน์ ศักดิ์วิชัย อ่อนทอง และณุฉัตรา จันทร์สุวานิชย์. 2561. คุณภาพทางเคมีของผลยอ. วารสารการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก. 16(2): 195-204.

Ali, M.B., K.W. Yu, E.J. Hahn and K.Y. Paek. 2005. Differential responses of anti-oxidants enzymes, lipoxygenase activity, ascorbate content and the production of saponins in tissue cultured root of mountain *Panax ginseng* C.A. Mayer and *Panax quinquefolium* L. in bioreactor subjected to methyl jasmonate stress. Plant Science. 169(1): 83–92.

Asadi-sardari, A., E. Mahdikhani-Moghadam and M. Zaki-Aghl. 2022. The biochemical changes in two moderately resistant and highly susceptible tomato cultivars at the later stages of *Meloidogyne javanica* infection. Nematology. 24(10): 1085-1103.

Ba, R., T. Alfa, F. Gbaguidi, K.M. Novidzro, K. Dotse, K. Koudouvo, U. Houngue, M.T. Donou Hounsode, K.H. Koumaglo, Y. Ameyapoh and L. Baba-Moussa. 2017. Maize fungal growth control with scopoletin of Cassava roots produced in Benin. International Journal of Microbiology. 2017(1): e5671942.

Beyer, S.F., A. Beesley, P.F.W. Rohmann, H. Schultheiss, U. Conrath and C.J.G., Langenbach. 2019. The Arabidopsis non-host defence-associated coumarin scopoletin protects soybean from Asian soybean rust. The Plant Journal. 99(3): 397–413.

Bushnell, O.A., M. Fukuda and T. Makinodian. 1950. The antibacterial properties of some plants found in Hawaii. Pacific Science. 4(3): 167-183.

Chanwun, T., N. Muhamad, N. Chirapongsatonkul and N. Churngchow, 2013. *Hevea brasiliensis* cell suspension peroxidase: purification, characterization and application for dye decolorization. AMB Express. 3: 14.

Deenamo, N., A. Kuyyogsuy, K. Khompatara, T. Chanwun, K. Ekchaweng and N. Churngchow. 2018. Salicylic acid induces resistance in rubber tree against *Phytophthora palmivora*. International Journal of Molecular Sciences. 19(7): 1883.

Ding, P. and Y. Ding. 2020. Stories of salicylic acid: A plant defense hormone. Trends in Plant Science. 25(6): 549–565.

Dorey, S., F. Baillieul, M.A. Pierrel, P. Saindrenan, B. Fritig and S. Kauffmann. 1997. Spatial and temporal induction of cell death, defense genes, and accumulation of salicylic acid in tobacco leaves reacting hypersensitively to a fungal glycoprotein elicitor. Molecular Plant-Microbe Interactions. 10(5): 646–655.

Dos Santos, C. and O.L. Franco. 2023. Pathogenesis-related proteins (PRs) with enzyme activity activating plant defense responses. Plants. 12(11): 2226.

Du, H., Y. Sun, R. Yang, W. Zhang, C. Wan, J. Chen, İ. Kahramanoğlu and L. Zhu. 2021. Benzothiazole (BTH) induced resistance of Navel orange fruit and maintained fruit quality during storage. Journal of Food Quality. 2021(1): e6631507.

Ederli, L., L. Madeo, O. Calderini, C. Gehring, C. Moretti, R. Buonaurio, F. Paolocci and S. Pasqualini. 2011. The *Arabidopsis thaliana* cysteine-rich receptor-like kinase CRK20 modulates host responses to *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 infection. Journal of Plant Physiology. 168(15): 1784-1794.

Galán-Pérez, J.A., B. Gámiz and R. Celis. 2021. Determining the effect of soil properties on the stability of scopoletin and its toxicity to target plants. Biology and Fertility of Soils. 57(5): 643–655.

Huang, W., Y. Wang, X. Li and Y. Zhang. 2020. Biosynthesis and regulation of salicylic acid and N-hydroxypipecolic acid in plant immunity. Molecular Plant. 13(1): 31–41.

Iriti, M. and F. Faoro. 2008. Abscisic acid is involved in chitosan-induced resistance to tobacco necrosis virus (TNV). Plant Physiology and Biochemistry. 46(12): 1106–1111.

Jia, D.D., Z.Q. Lan and T. Wu. 2020. Ethylene is the key signal in the accumulation process of scopoletin in noni (*Morinda citrifolia*). Scientia Horticulturae. 261(17): 108980.

Kachroo, A., H. Liu, X. Yuan, T. Kurokawa and P. Kachroo, 2022. Systemic acquired resistance-associated transport and metabolic regulation of salicylic acid and glycerol-3-phosphate. Essays in Biochemistry. 66(5): 673–681.

Kidwai, M., I.Z. Ahmad and D. Chakrabarty. 2020. Class III peroxidase: An indispensable enzyme for biotic/abiotic stress tolerance and a potent candidate for crop improvement. Plant Cell Reports. 39(11): 1381–1393.

Kim, Y.J. and B.K. Hwang. 2000. Pepper gene encoding a basic pathogenesis-related 1 protein is pathogen and ethylene inducible. Physiologia Plantarum. 108(1): 51-60.

Motshakeri, M. and H.M. Ghazali. 2015. Nutritional, phytochemical and commercial quality of noni fruit: A multi-beneficial gift from nature. Trends in Food Science & Technology. 45(1): 118–129.

Li, Y.Z., X.H. Zheng, H.L. Tang, J.W. Zhu and J.M. Yang. 2003. Increase of β-1, 3-glucanase and chitinase activities in cotton callus cells treated by salicylic acid and toxin of *Verticillium dahliae*. Acta Botanica Sinica. 45(7): 802-808.

Oerke, E.C. and U. Steiner. 2025. Intra-leaf variability of incubation period sheds new light on the lifestyle of *Cercospora beticola* in sugar beets. Journal of Fungi. 11(3): 211.

Santos, T., J.R. Villanueva and C. Nombela, 1977. Production and catabolite repression of *Penicillium italicum* beta-glucanases. Journal of Bacteriology. 129(1): 52–58.

Su, B.N., A.D. Pawlus, H.A. Jung, W.J. Keller, J.L. McLaughlin and A.D. Kinghorn. 2005. Chemical constituents of the fruits of *Morinda citrifolia* (noni) and their antioxidant activity. Journal of Natural Products. 68(4): 592–595.

Wang, M.Y. and C. Su. 2001. Cancer preventive effect of *Morinda citrifolia* (Noni). Annals of the New York Academy of Sciences. 952(1): 161–168.

Yang S.C., T.I. Chen, K.Y. Li and T.C. Tsai. 2007. Change in phenolic compound content, reductive capacity and ACE inhibitory activity in noni juice during traditional fermentation. Journal of Food and Drug Analysis. 15(3): 290-298.

Zhang, H., Q. Huang, L. Yi, X. Song, L. Li, G. Deng, J. Liang, F. Chen, M. Yu and H. Long. 2021. PAL-mediated SA biosynthesis pathway contributes to nematode resistance in wheat. The Plant Journal. 107(3): 698–712.