

การชักนำการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของบัวบกสายพันธุ์พื้นเมือง ของไทยด้วยรังสีแกมมาแบบเฉียบพลัน

Induction of Morphological Characteristic Differentiation of Thai Native Asiatic Pennywort (*Centella asiatica* L.) by Acute Gamma Irradiation

น้ำฝน ชาชัย¹ บันธิตา เพ็ญสุริยะ¹ มนัสชนก เกตกลางดอน¹ พงศกร นิตย์มี¹ พงษ์ศักดิ์ แก้วศรี¹
สุรสิทธิ์ วงษ์สัจจจันท์¹ ภัทรา ประทับทอง¹ เรวัตร์ จินดาเจีย¹ จรรยา มุ่งงาม¹ ปราโมทย์ ไตรบุญ²
และ จักรกฤษณ์ ศรีแสง^{1,*}

Namfon Chachai¹, Banthita Pensuriya¹, Manaschanok Katklangdon¹, Pongsakorn Nitmee¹,
Pongsak Kaewsri¹, Surasit Wongsatchanan¹, Pattra Pratubkong¹, Rewat Chindachia¹,
Janya Mungngam¹, Pramote Triboun² and Jakkrit Sreesaeng^{1,*}

¹ สถานีวิจัยลำตะคอง ศูนย์เชี่ยวชาญนวัตกรรมเกษตรสร้างสรรค์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ปทุมธานี 12120

² ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ปทุมธานี 12120

¹ Lam Takhong Research Station, Expert Centre of Innovative Agriculture, Thailand Institute of Scientific and Technological Research, Pathum Thani 12120

² National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA), Pathum Thani 12120

รับเรื่อง: 9 พฤษภาคม 2566 Received: 9 May 2023

ปรับแก้ไข: 15 กรกฎาคม 2566 Revised: 15 July 2023

รับตีพิมพ์: 26 กรกฎาคม 2566 Accepted: 26 July 2023

* Corresponding author: jakkrit@tistr.or.th

บทคัดย่อ

ความเป็นมาและวัตถุประสงค์: บัวบกเป็นพืชล้มลุกอายุหลายปีที่เจริญเติบโตได้ดีในเขตร้อนและกึ่งร้อนขึ้นทั่วโลก จัดเป็นพืชสมุนไพร 1 ใน 5 สุดยอดพืชสมุนไพรของไทย บัวบกมีสารสำคัญประกอบด้วยเอเชียติโคไซด์ (Asiaticoside) เอเชียติคแอซิด (Asiatic acid) มาเดคาสโซไซด์ (Madecassoside) และมาเดคาสซิกแอซิด (Madecassic acid) การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อชักนำเมล็ดบัวบกสายพันธุ์พื้นเมืองให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันและศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของบัวบกสายพันธุ์พื้นเมืองหลังได้รับรังสีรุ่นที่ M_1V_2 เพื่อใช้เป็นแหล่งพันธุกรรมในโครงการปรับปรุงพันธุ์บัวบก

วิธีดำเนินการวิจัย: ฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันให้เมล็ดบัวบก จำนวน 6 ระดับ ตามแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ เพาะเมล็ดที่ผ่านการฉายรังสีเพื่อศึกษาการกระจายตัวของลักษณะสัณฐานวิทยาบัวบกสายพันธุ์พื้นเมืองหลังได้รับรังสี (รุ่น M_1V_2) วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ และสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เพียร์สันของลักษณะการเจริญเติบโต

ผลการวิจัย: ปริมาณรังสีที่ทำให้การงอกของเมล็ดบัวบกลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ (LD_{50}) อยู่ที่ระดับ 162.51 เกรย์ ปริมาณรังสีแกมมาสามารถเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาของบัวบก ปริมาณรังสีแกมมาที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้ความสูงต้น ความยาวก้านใบ และความยาวไหลลดลง แต่ทำให้จำนวนใบ ความกว้างใบ ความยาวใบ และจำนวนไหลเพิ่ม

ขึ้นเมื่อปลูกทดสอบที่อายุ 90 วัน นอกจากนี้ การกระจายตัวของลักษณะทางสัณฐานวิทยาของบัวบกรุ่นที่ M_1V_2 ที่อายุ 60 วันหลังย้ายปลูก พบว่า มีความแปรปรวนทางสัณฐานวิทยาค่อนข้างสูงในทุกลักษณะ ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของลักษณะสัณฐานวิทยาของบัวบกรุ่นที่ M_1V_2 ที่อายุ 60 วันหลังย้ายปลูก พบว่า ความสูงต้นของบัวบกมีความสัมพันธ์เชิงบวกสูงกับความยาวใบ (0.487) ความกว้างใบ (0.415) และความยาวก้านใบ (0.708)

สรุป: รังสีแกมมาแบบเฉียบพลันสามารถกระตุ้นให้เกิดความแปรปรวนทางสัณฐานวิทยาของเมล็ดพันธุ์บัวบกพื้นเมืองได้ แต่ไม่สามารถจำแนกได้ชัดเจน จำเป็นต้องใช้ข้อมูลเชิงปริมาณร่วมในการพิจารณาคัดเลือกสายพันธุ์ที่กลายซึ่งการชักนำด้วยรังสีแกมมาสามารถสร้างความแปรปรวนของบัวบกเพื่อประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ได้ต่อไป

คำสำคัญ: บัวบก, รังสีแกมมาแบบเฉียบพลัน, สัณฐานวิทยา, การกลายพันธุ์, สมุนไพร

ABSTRACT

Background and Objectives: Asiatic pennywort is an herbaceous perennial plant that grows in tropical and subtropical humid regions around the world. It has been recognized as one of the five Thailand Champion Herbal Product (TCHP). The main substances in Asiatic pennywort include asiaticoside, asiatic acid, madecassoside, and madecassic acid. This study aimed to induce mutation in Thai native Asiatic pennywort species using acute gamma radiation and to investigate the morphological variability of M_1V_2 mutated for use as a germplasm in the Asiatic pennywort breeding program.

Methodology: Six levels of acute gamma radiation were applied to Asiatic pennywort seeds following a completely randomized design. The irradiated seeds were then planted to investigate the distribution of morphological characteristics in the native Asiatic pennywort species after exposure to radiation (M_1V_2 model). The study aimed to estimate variance at 95% confidence interval and the Pearson correlation coefficient of growth traits.

Main Results: Radiation dose causing the germination of Asiatic pennywort seeds to decrease to the median lethal dose (LD_{50}) is 162.51 gray. The amount of gamma radiation can alter the morphology of Asiatic pennywort. Increasing dose of gamma radiation induced reduction in plant height, petiole length, and stolon length, but an increase in the number of leaves, leaf width, leaf length and stolon number during 90 days after transplanted. Additionally, the morphological distribution of Asiatic pennywort M_1V_2 generation during the 60 days after transplantation showed relatively high morphological variability in all characteristics. The correlation coefficient of morphological characteristics of Asiatic pennywort M_1V_2 generation during the 60 days after transplantation revealed that plant height was highly positively correlated with leaf length (0.487), leaf width (0.415), and petiole length (0.708).

Conclusions: Acute gamma radiation appears to be triggering morphological variability in native Asiatic pennywort seeds. Additionally, when clear classification is challenging, a combination of

quantitative data could be employed to select mutant species. The induction method using acute gamma radiation can be utilized to generate diversity for breeding Asiatic pennywort.

Keywords: Asiatic pennywort, acute gamma ray, morphology, mutation, herb

บทนำ

การเพิ่มขึ้นของประชากรโลกส่งผลให้ความต้องการปัจจัยในการดำรงชีวิตเพิ่มสูงขึ้น ทั้งด้านอาหารและยารักษา (WHO, 2010) ขณะที่ การเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศโลกส่งผลกระทบต่อความสามารถในการเจริญเติบโตและการให้ผลผลิตพืช รวมถึงพืชสมุนไพร (Collins *et al.*, 2013; Willeit *et al.*, 2019; Hassani *et al.*, 2021) ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และกระบวนการเจริญเติบโตและพัฒนาของพืช รวมถึงการเปลี่ยนแปลงในด้านชีวโมเลกุล (Gray and Brady, 2016) ซึ่งส่งผลกระทบต่อทั้งทางตรงและทางอ้อมต่อพืชอาหารและพืชสมุนไพรทั่วโลก (Collins *et al.*, 2013) การเพิ่มความแปรปรวนทางพันธุกรรมของพืชจึงมีความจำเป็นต่อการปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อให้ทนต่อสภาวะความแปรปรวนของสภาพภูมิอากาศโลกที่มีแนวโน้มรุนแรงขึ้น

บัวบก (*Centella asiatica* L.) เป็นพืชล้มลุกอายุหลายปีที่กระจายพันธุ์ในพื้นที่เขตร้อนและกึ่งร้อนทั่วโลก (Gray *et al.*, 2018) เป็นพืชสมุนไพร 1 ใน 5 สุดยอดผลิตภัณฑ์สมุนไพรของไทย (Thailand Champion Herbal Product: TCHP; Yasurin *et al.*, 2016) มีการใช้ประโยชน์เพื่อการรักษาและบรรเทาอาการของโรค ได้แก่ รักษาบาดแผล โรคผิวหนัง บรรเทาความวิตกกังวล และช่วยเพิ่มความจำ เป็นต้น (Gohil *et al.*, 2010; Gray *et al.*, 2018) เป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตเครื่องสำอาง ผลิตภัณฑ์อาหาร เครื่องดื่ม และการผลิตสารสำคัญ (Gohil *et al.*, 2010; Yasurin *et al.*, 2016; Ogunka-Nnoka *et al.*, 2020) บัวบกมีสารสำคัญในกลุ่มอนุพันธ์ของ

pentacyclic triterpene ประกอบด้วย เอเชียติโคไซด์ (Asiaticoside) เอเชียติคแอซิด (Asiatic acid) มาเดคาสโซไซด์ (Madecassoside) และมาเดคาสซิกแอซิด (Madecassic acid) เป็นต้น (Singh and Rastogi, 1969; Brinkhaus *et al.*, 2000) ขณะที่ Gray *et al.* (2018) รายงานว่า สารสำคัญในบัวบกประกอบด้วยสารในกลุ่ม isoprenoids ได้แก่ sesquiterpenes, sterols, pentacyclic triterpenoids และ saponins รวมถึงอนุพันธ์ของ phenylpropanoid ได้แก่ eugenol, caffeoylquinic acids (CQAs) และ flavonoids เป็นต้น ซึ่งปริมาณสารสำคัญในบัวบกจะขึ้นอยู่กับปัจจัยทางด้านพันธุกรรม สภาพแวดล้อมในการผลิต และสภาพพื้นที่ทางภูมิศาสตร์ (Devkota *et al.*, 2010; Pant *et al.*, 2021) จากรายงานของ Eom *et al.* (2022) พบว่า ใบบัวบกมีปริมาณสารสำคัญในกลุ่ม polyphenol และ triterpenoid (236.88 mg% และ 60.65 mg/g ตามลำดับ) ซึ่งมีปริมาณมากกว่าในส่วนของลำต้นและดอก

การศึกษาความแปรปรวนและความหลากหลายทางพันธุกรรมของบัวบกดำเนินการในหลายพื้นที่ทั่วโลก ได้แก่ อินเดีย มาดากัสการ์ ศรีลังกา มาเลเซีย จีน ออสเตรเลีย รวมถึงประเทศไทย (Padmalatha and Prasad, 2008; Hashim, 2011; Srithongkul *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2012; Prasad *et al.*, 2014; Gbolahan *et al.*, 2016; Yasurin *et al.*, 2016; Alqahtani *et al.*, 2017; Mumtazah *et al.*, 2020) จากการศึกษาความหลากหลายของบัวบกในประเทศไทย พบว่า บัวบกสายพันธุ์พื้นเมืองของไทยจำนวน 30 ตัวอย่าง มีความแปรปรวนทางสัณฐานวิทยา สามารถใช้เป็นแหล่งพันธุกรรมในการปรับปรุง

พันธุ์บัวบกเพื่อเพิ่มปริมาณสารสำคัญและเพิ่มผลผลิตบัวบกในสภาพแปลงปลูก (Chachai *et al.*, 2021) นอกจากนี้ การปรับปรุงเชื้อพันธุกรรมบัวบกสายพันธุ์พื้นเมืองให้มีลักษณะการเจริญเติบโตที่ดี ให้ปริมาณผลผลิตต่อพื้นที่สูง และเหมาะสมสำหรับผลิตในสภาพภูมิอากาศในปัจจุบัน ช่วยเพิ่มโอกาสและทางเลือกให้แก่เกษตรกรผู้ผลิตบัวบก โดยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์เป็นวิธีที่สามารถชักนำให้พืชมีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม สันฐานวิทยาและชีวเคมีบางประการได้ (Tan *et al.*, 2019) รังสีแกมมาสามารถชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในระดับพันธุกรรมส่งผลให้มีการเจริญเติบโตที่เปลี่ยนไป สามารถเพิ่มความแปรปรวนทางพันธุกรรมของพืช (Majeed *et al.*, 2018) มีการศึกษาการชักนำให้เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้วยรังสีแกมมาเพื่อประโยชน์ในการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์ในพืชหลายชนิด ได้แก่ ข้าว (Andrew-Peter-leon *et al.*, 2021) ข้าวสาลี (Kiani *et al.*, 2022) มันเทศประดับ (Balla *et al.*, 2017) บานไม่รู้โรย (Tanimlak *et al.*, 2018) และกล้วยไม้ *Anoectochilus koshunensis* Hayata (Sawatdiwong *et al.*, 2020) รวมถึงบัวบก (Moghaddam *et al.*, 2011; Roostika *et al.*, 2022) ซึ่งการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในบัวบกสามารถใช้ได้ทั้งสารก่อกลายพันธุ์ (Kaensaksiri *et al.*, 2010; 2011) และรังสีแกมมา (Moghaddam *et al.*, 2011; Roostika *et al.*, 2022) โดยสามารถเพิ่มความแปรปรวนทางพันธุกรรม และการเปลี่ยนแปลงทางสันฐานวิทยาและสรีรวิทยาของบัวบกได้ดี จากการทดลองของ Moghaddam *et al.* (2011) พบว่า รังสีแกมมาที่ปริมาณรังสี 60 และ 40 เกรย์สามารถชักนำแคลลัสบัวบกให้เกิดการตาย 50 เปอร์เซ็นต์ ในบัวบกสายพันธุ์ CA03 และ CA23 ตามลำดับ นอกจากนี้ รังสีแกมมายังส่งผลให้บัวบกมีปริมาณฟลาโวนอยด์และสาร malondialdehyde (MDA) สูงขึ้น โดยบัวบกมีปริมาณฟลาโวนอยด์สูงที่สุดเมื่ออายุ 8 สัปดาห์ อีกทั้งยังสามารถใช้เป็นเชื้อพันธุกรรมในการคัดเลือกสายพันธุ์บัวบกที่มีศักยภาพ

ในการผลิตเชิงการค้าได้อีกด้วย ดังนั้น เพื่อเป็นการเพิ่มความแปรปรวนทางพันธุกรรมของบัวบกพื้นเมืองของไทยเพื่อใช้เป็นเชื้อพันธุกรรมในการคัดเลือกสายพันธุ์บัวบกที่มีปริมาณสารสำคัญสูงในอนาคต การทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปริมาณรังสีแกมมาที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในบัวบกสายพันธุ์พื้นเมืองของไทย และการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสันฐานวิทยาที่เกิดจากการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันในบัวบกสายพันธุ์พื้นเมืองหลังได้รับรังสีรุ่นที่ M_1V_2 เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีการเจริญเติบโตดีสามารถใช้ในโครงการปรับปรุงพันธุ์บัวบกที่มีการเจริญเติบโตดีและมีปริมาณสารสำคัญสูงต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมเมล็ดพันธุ์บัวบกพันธุ์พื้นเมืองและการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลัน

รวบรวมเมล็ดพันธุ์บัวบกสายพันธุ์พื้นเมืองจากพื้นที่อำเภอบางเลน จังหวัดนครปฐม คัดเลือกเมล็ดที่สมบูรณ์ ขนาดเมล็ดมีความสม่ำเสมอ มีความกว้างประมาณ 1.8–2.1 มิลลิเมตร และความยาว 2.6–3.0 มิลลิเมตร ไม่มีการเข้าทำลายของโรคและแมลง นำไปฉายด้วยรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันด้วยเครื่องฉายรังสีแกมมา รุ่น Mark I 30 (Serial Number 1116) ของบริษัท J.L. Shepherd Associates ประเทศสหรัฐอเมริกา ณ ศูนย์วิจัยนิวเคลียร์เทคโนโลยีมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การหาปริมาณรังสีที่เหมาะสมสำหรับการชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสันฐานวิทยาของบัวบกพันธุ์พื้นเมือง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomize Designed; CRD) โดยฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลัน จำนวน 6 ระดับ ประกอบด้วย ที่ปริมาณรังสี 0 (ชุดควบคุม), 50, 100, 150, 200 และ 250 เกรย์ ปริมาณรังสีละ 3 ชั่วโมง

100 เมล็ด หลังการฉายรังสีนำเมล็ดบัวบกเพาะในถาด หลุมที่ใช้พีทมอสเป็นวัสดุปลูก วางในสภาพโรงเรือน พรางแสง 60 เปอร์เซ็นต์ ณ สถานีวิจัยลำตะคอง อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา ในช่วงเดือนมกราคม พ.ศ. 2565 บันทึกผลจำนวนเมล็ดที่งอกและจำนวนต้นที่รอดตายเปรียบเทียบกับชุดควบคุมของต้นกล้าบัวบก ที่อายุ 30 วันหลังเพาะ จากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์การงอก} = \frac{\text{จำนวนเมล็ดที่งอก}}{\text{จำนวนเมล็ดทั้งหมด}} \times 100$$

$$\text{เปอร์เซ็นต์การรอดตาย} = \frac{\text{จำนวนต้นที่รอดตาย}}{\text{จำนวนต้นทั้งหมด}} \times 100$$

คำนวณหาปริมาณรังสีที่ทำให้เกิดการตาย 50 เปอร์เซ็นต์ หลังได้รับรังสี 30 วัน ($LD_{50(30)}$) จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณรังสีกับเปอร์เซ็นต์การรอดตายของต้นกล้าบัวบก พร้อมทั้งสร้างสมการที่ใช้สำหรับการคำนวณหาปริมาณรังสีที่ทำให้เกิดการตาย 50 เปอร์เซ็นต์ หลังได้รับรังสี 30 วัน ($LD_{50(30)}$) ด้วยโปรแกรม LD50 Calculator (AAT Bioquest, 2023) หลังจากนั้น ย้ายต้นกล้าบัวบกสายพันธุ์พื้นเมืองหลังได้รับรังสีรุ่นที่ M_1V_1 ที่ได้จากการฉายรังสีเมล็ดบัวบกในแต่ละปริมาณรังสี ลงปลูกในกระถางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 นิ้ว จำนวน 3 ซ้ำ ซ้ำละ 5 กระถาง กระถางละ 1 ต้น ใช้ดินผสมเป็นวัสดุปลูก วางในสภาพโรงเรือน พรางแสง 60 เปอร์เซ็นต์ ณ สถานีวิจัยลำตะคอง อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา ในช่วงเดือนมีนาคม-พฤษภาคม พ.ศ. 2565 รดน้ำทุกวัน และใส่ปุ๋ยสูตร 15-15-15 อัตรา 2 กรัม/กระถาง ทุก 15 วัน เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตของบัวบกที่ได้รับการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันรุ่นที่ M_1V_1 บันทึกลักษณะความสูงต้น จำนวนใบ ความกว้างใบ ความยาวใบ ความยาวก้านใบ จำนวนไหล และความยาวไหล ที่อายุ 60 และ 90 วันหลังย้ายปลูก คำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การเพิ่มขึ้นหรือลดลงของการเจริญเติบโต

ของบัวบกรุ่นที่ M_1V_1 จากสูตร %Increasing หรือ %Reduction = $[(M - C) / C] \times 100$ โดย M คือ ค่าเฉลี่ยของลักษณะที่ศึกษา และ C ค่าเฉลี่ยของลักษณะของชุดควบคุม (Nawanopparatsakul *et al.*, 2012)

การศึกษาลักษณะการกลายและการกระจายตัวของบัวบกสายพันธุ์พื้นเมืองหลังได้รับรังสีรุ่นที่ M_1V_2

การศึกษาลักษณะการกลายและการกระจายตัวของลักษณะการเจริญเติบโตของบัวบกสายพันธุ์พื้นเมืองหลังได้รับรังสีรุ่นที่ M_1V_2 โดยขยายต้นพันธุ์บัวบกสายพันธุ์พื้นเมืองหลังได้รับรังสีรุ่นที่ M_1V_2 ด้วยวิธีการตัดชำไหล (Stolen cutting) จากต้นแม่รุ่นที่ M_1V_1 ที่ผ่านการคัดเลือกจากการเจริญเติบโตดีกว่าต้นของชุดควบคุม (0 เกรย์) วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomize Designed) โดยนำต้นพันธุ์บัวบกสายพันธุ์พื้นเมืองหลังได้รับรังสีรุ่นที่ M_1V_2 ที่ชำจากต้นแม่รุ่นที่ M_1V_1 ในแต่ละปริมาณรังสี (0, 50, 100, 150, 200 และ 250 เกรย์) ปลูกในกระถางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 นิ้ว จำนวน 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 กระถาง กระถางละ 1 ต้น วางในสภาพโรงเรือนพรางแสง 60 เปอร์เซ็นต์ ณ สถานีวิจัยลำตะคอง รดน้ำทุกวัน และใส่ปุ๋ยสูตร 15-15-15 อัตรา 2 กรัม/กระถาง ทุก 15 วัน บันทึกข้อมูลการเจริญเติบโตของบัวบกสายพันธุ์พื้นเมืองหลังได้รับรังสีรุ่นที่ M_1V_2 ทุกต้น ในลักษณะความสูงต้น จำนวนใบ ความกว้างใบ ความยาวใบ ความยาวก้านใบ จำนวนไหล และความยาวไหล ที่อายุ 60 วันหลังย้ายปลูก วิเคราะห์ข้อมูลการกระจายตัวของลักษณะสัณฐานวิทยาบัวบกสายพันธุ์พื้นเมืองหลังได้รับรังสีรุ่น M_1V_2 ด้วยโปรแกรม SR Plot (Bioinformatics, 2023)

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางสถิติ เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น

95 เปอร์เซ็นต์ ในลักษณะเปอร์เซ็นต์การงอก และเปอร์เซ็นต์การรอดตาย ที่อายุ 30 วันหลังเพาะ อัตราการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของลักษณะความสูงต้น จำนวนใบ ความกว้างใบ ความยาวใบ ความยาวก้านใบ จำนวนไหล และความยาวไหลของบวบกสายพันธุ์พื้นเมืองหลังได้รับรังสีรุ่นที่ M_1V_1 ที่อายุ 60 และ 90 วันหลังย้ายปลูก รวมถึงลักษณะความสูงต้น จำนวนใบ ความกว้างใบ ความยาวใบ ความยาวก้านใบ จำนวนไหล และความยาวไหลของบวบกสายพันธุ์พื้นเมืองหลังได้รับรังสีรุ่นที่ M_1V_2 ที่อายุ 60 วันหลังย้ายปลูก และวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์เพียร์สัน (Pearson correlation coefficients) ในลักษณะการเจริญเติบโตของบวบกสายพันธุ์พื้นเมืองหลังได้รับรังสีรุ่นที่ M_1V_1 ที่อายุ 60 และ 90 วันหลังย้ายปลูก และลักษณะการเจริญเติบโตของบวบกสายพันธุ์พื้นเมืองหลังได้รับรังสีรุ่นที่ M_1V_2 ที่อายุ 60 วันหลังย้ายปลูก ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป IBM SPSS version 26

ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลของรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันต่อการงอกและการเจริญเติบโตของต้นกล้าบวบกสายพันธุ์พื้นเมืองหลังได้รับรังสีรุ่นที่ M_1V_1

เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดบวบกและการเจริญเติบโตของต้นกล้าบวบกพันธุ์พื้นเมืองหลังได้รับรังสีแกมมาแบบเฉียบพลัน ระยะเวลา 30 วัน พบว่าเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดบวบกลดลงเมื่อได้รับปริมาณรังสีที่สูงขึ้น โดยเมล็ดบวบกสายพันธุ์พื้นเมืองมีเปอร์เซ็นต์การงอกน้อยที่สุด (5 เปอร์เซ็นต์) เมื่อได้รับปริมาณรังสีแกมมา 250 เกรย์ (Table 1) และเมื่อคำนวณค่า $LD_{50(30)}$ พบว่า บวบกสายพันธุ์พื้นเมืองของไทยที่รวบรวมจากจังหวัดนครปฐม มีค่า $LD_{50(30)}$ เท่ากับ 162.51 เกรย์ (Figure 1) ซึ่งมีรายงานการใช้สารก่อกลายพันธุ์ชักนำให้กลายพันธุ์ในบวบก (Kaensaksiri *et al.*, 2010; 2011) และใช้รังสีแกมมาสามารถชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยา

สรีรวิทยา รวมถึงปริมาณสารสำคัญในบวบกอีกด้วย (Moghaddam *et al.*, 2011; Roostika *et al.*, 2022) อย่างไรก็ตาม การตอบสนองต่อรังสีแกมมาของพืช จะขึ้นอยู่กับชนิดพืช พันธุ์/สายพันธุ์ (Moghaddam *et al.*, 2011) ส่วนของพืช ขนาดและอายุของชิ้นส่วน รวมถึงปัจจัยภายนอกที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของพืช โดยชิ้นส่วนพืชที่นิยมชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสีแกมมา ได้แก่ ชิ้นส่วนยอดและข้อในสภาพปลอดเชื้อ เมล็ด และท่อนพันธุ์ เป็นต้น (Majeed *et al.*, 2018) ถึงแม้ว่าจะมีการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสีแกมมาโดยใช้ชิ้นส่วนของเมล็ดในพืชหลายชนิดได้แก่ ข้าว (Abdelnour-Esquivel *et al.*, 2020) และ Arabidopsis (Hase *et al.*, 2023) เป็นต้น อย่างไรก็ตาม ยังไม่พบรายงานการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในบวบกโดยใช้ชิ้นส่วนของเมล็ด มีเพียงการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของบวบกที่ใช้ชิ้นส่วนยอดและข้อที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ และทั้งสองชิ้นส่วนมีการตอบสนองต่อการชักนำด้วยรังสีแกมมาที่แตกต่างกัน (Moghaddam *et al.*, 2011)

การศึกษาการตอบสนองต่อการฉายรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันของเมล็ดบวบกพันธุ์พื้นเมืองโดยศึกษาเปอร์เซ็นต์การลดลงหรือเพิ่มขึ้นของการเจริญเติบโตเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (0 เกรย์) ที่อายุ 60 และ 90 วันหลังย้ายปลูก พบว่า ลักษณะจำนวนใบ จำนวนไหล และความยาวไหลมีเปอร์เซ็นต์การลดลงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญอยู่ทางสถิติ ($P < 0.01$) ขณะที่ ลักษณะก้านใบมีความยาวลดลงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยที่อายุ 90 วันหลังย้ายปลูก บวบกที่ได้รับการฉายรังสีมีจำนวนใบ ความยาวใบ ความกว้างใบ จำนวนไหลและความยาวไหลเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม แสดงให้เห็นว่า ต้นบวบกรุ่น M_1V_1 ที่ปักชำจากต้นแม่ที่เพาะจากเมล็ดที่ได้รับการฉายรังสีแกมมา มีการเจริญเติบโตที่อายุ 90 วัน ได้ดีกว่าต้นที่ไม่ได้ผ่านการฉายรังสีแกมมา

Table 1 Percentage of germination and survival seedlings of Asiatic pennywort after 30 days of irradiation with different doses of acute gamma radiation

| Gamma radiation dose (Gy) | Germination percentage (%) | Survival percentage (% of control) |
|---------------------------|----------------------------|------------------------------------|
| 0 (Control) | 43.33 ± 1.52 ^a | 100.00 ± 0.00 ^a |
| 50 | 40.67 ± 1.52 ^a | 93.85 ± 1.32 ^{ab} |
| 100 | 35.00 ± 2.00 ^b | 80.77 ± 3.52 ^b |
| 150 | 24.33 ± 2.08 ^c | 56.31 ± 6.69 ^c |
| 200 | 18.33 ± 0.57 ^d | 42.37 ± 2.65 ^c |
| 250 | 5.00 ± 1.00 ^e | 11.60 ± 2.69 ^d |
| F-test | ** | ** |
| CV (%) | 49.92 | 49.83 |

** Highly significant difference (P < 0.01).

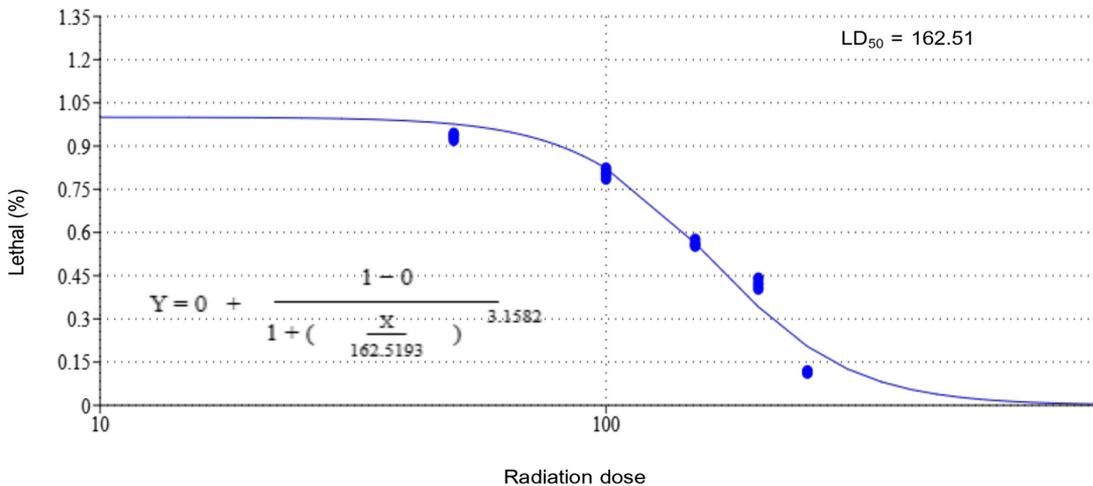


Figure 1 The median lethal dose (LD_{50}) of M_{1V_1} Asiatic pennywort at 30 days after irradiation

ขณะที่ ปริมาณรังสีแกมมาต่อการเจริญเติบโตของต้นบัวบกกลุ่ม M_{1V_1} พบว่า ทุกปริมาณรังสีทำให้ความสูงต้นของบัวบกลดลง โดยปริมาณรังสี 250 เกรย์ มีเปอร์เซ็นต์การลดลงมากที่สุด ลักษณะจำนวนใบ พบว่า รังสีแกมมาทุกปริมาณรังสีทำให้ต้นบัวบกมีเปอร์เซ็นต์การเพิ่มขึ้น ลักษณะความยาวใบ พบว่า รังสีแกมมาปริมาณรังสี 50–200 เกรย์ ทำให้มีความยาวใบเพิ่มขึ้น แต่ที่ปริมาณรังสี 250 เกรย์ ทำให้มีใบสั้นลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ลักษณะความกว้างใบ พบว่า รังสีแกมมาทำให้บัวบกมีความกว้าง

ใบไม่แตกต่างกันทางสถิติ ลักษณะความยาวก้านใบ พบว่า รังสีแกมมาที่ปริมาณรังสี 250 เกรย์ ทำให้บัวบกมีก้านใบสั้นลงมากที่สุด เมื่อพิจารณาลักษณะของไหลบัวบก ซึ่งมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตในสภาพแปลงปลูกและส่งผลต่อปริมาณผลผลิต พบว่า รังสีแกมมาที่ปริมาณรังสี 150–200 เกรย์ มีเปอร์เซ็นต์การเพิ่มจำนวนไหลมากที่สุด และที่ปริมาณรังสี 150 เกรย์ ส่งผลให้ต้นบัวบกมีเปอร์เซ็นต์การเพิ่มขึ้นของความยาวไหลมากที่สุด (Table 2)

Table 2 Reduction and increasing percentages of M₁V₁ Asiatic pennywort growth characteristics at 60 and 90 days after transplanted compared to the control

| Characters | Plant height (cm) | Leaf number (leaf) | Leaf length (cm) | Leaf width (cm) | Petiole length (cm) | Stolon number (stolon) | Stolon length (cm) |
|--------------------------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Days after transplanted (DATs) | | | | | | | |
| 60 DATs | -14.24 ± 11.79 | -8.21 ± 6.95 ^B | -1.94 ± 10.68 | 0.29 ± 6.26 | -13.75 ± 14.29 ^B | -46.67 ± 37.29 ^B | -19.14 ± 56.12 ^B |
| 90 DATs | -7.79 ± 10.00 | 58.31 ± 32.25 ^A | 5.81 ± 6.73 | 5.34 ± 8.93 | -3.70 ± 10.56 ^A | 3.45 ± 12.78 ^A | 21.80 ± 16.54 ^A |
| Radiation doses (Gy) | | | | | | | |
| 50 | -2.54 ± 7.01 ^a | 16.47 ± 33.46 | 1.48 ± 5.70 ^{ab} | -0.59 ± 7.92 | 4.06 ± 9.13 ^a | -59.71 ± 44.04 ^b | -34.20 ± 38.75 ^c |
| 100 | -6.32 ± 8.36 ^a | 20.54 ± 27.23 | 0.87 ± 3.81 ^{ab} | 0.44 ± 6.00 | -0.29 ± 5.69 ^a | -44.42 ± 44.15 ^b | -32.87 ± 36.69 ^c |
| 150 | -5.04 ± 5.30 ^a | 25.63 ± 21.88 | 14.48 ± 9.98 ^a | 9.07 ± 7.37 | 0.28 ± 7.26 ^a | 22.89 ± 36.53 ^a | 92.23 ± 85.97 ^a |
| 200 | -12.46 ± 7.60 ^a | 24.03 ± 24.96 | 4.61 ± 7.18 ^a | 8.37 ± 11.61 | -12.66 ± 5.99 ^a | 14.21 ± 26.07 ^a | 11.43 ± 12.91 ^b |
| 250 | -28.71 ± 12.63 ^b | 38.60 ± 54.08 | -11.78 ± 12.24 ^b | -3.23 ± 6.59 | -35.03 ± 14.23 ^b | -41.01 ± 40.28 ^b | -29.96 ± 36.44 ^c |
| F-test | ns | ** | ns | ns | * | ** | ** |
| DATs | * | ns | * | ns | ** | ** | ** |
| CV (%) | 73.11 | 90.29 | 80.02 | 66.18 | 71.80 | 84.98 | 93.68 |

Means followed by the same letters within each column are not significantly different according to Duncan's multiple range test ($P < 0.05$), ns = not-significantly different, * significantly different ($P < 0.05$), ** highly significant different ($P < 0.01$), CV = coefficient of variation.

แม้ว่าผลจากการทดลอง พบว่า ปริมาณรังสีที่เพิ่มขึ้นมีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเพิ่มขึ้นของสัณฐานวิทยาในบางลักษณะ อย่างไรก็ตาม Moghaddam *et al.* (2011) รายงานว่า ปริมาณรังสีที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้ปริมาณผลผลิต ได้แก่ ใบและก้านใบของบัวบกลดลง แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Tanimlak *et al.* (2018) ที่รายงานว่า การฉายรังสีแกมมาให้กับบานไม่รู้โรย ลูกผสมทำให้การเจริญเติบโตด้านความสูงต้น ขนาดทรงพุ่ม และความยาวข้อลดลง รวมถึง Sawatdiwong *et al.* (2020) พบว่า การฉายรังสีแกมมาให้กับกล้วยไม้ *Anoectochilus koshunensis* Hayata ทำให้การเจริญเติบโตทางลำต้นและรากมีแนวโน้มลดลง อย่างไรก็ตาม การฉายรังสีแกมมาให้กับพืช ส่งผลให้เกิดความแปรปรวนทางสัณฐานวิทยาบางประการของพืช ซึ่ง Sawatdiwong *et al.* (2020) พบว่า การฉายรังสีแกมมาให้กับกล้วยไม้ *Anoectochilus koshunensis* Hayata ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาถึง 7 ลักษณะ เช่น สีใบ สีต้น และรูปร่างใบ เป็นต้น ถึงแม้ว่าการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสีแกมมาจะสามารถเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา รวมถึงพันธุกรรมของพืชได้ (Majeed *et al.*, 2018) แต่ยังคงจำเป็นต้องมีการทดสอบการเจริญเติบโตและคัดเลือกในหลาย ๆ รุ่น เพื่อให้สามารถคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีความคงตัวทางพันธุกรรมสำหรับการชักนำให้เกิดการกลายในบัวบก Moghaddam *et al.* (2011) พบว่า บัวบกหลังได้รับรังสีแกมมาทำให้มีปริมาณฟลาโวนอยด์ที่เพิ่มสูงขึ้นอีกด้วย ถึงแม้ว่าจะมีรายงานการศึกษาความหลากหลายของเชื้อพันธุกรรมบัวบกสายพันธุ์พื้นเมืองจะสามารถใช้เป็นแหล่งพันธุกรรมในการปรับปรุงพันธุ์บัวบกเพื่อเพิ่มปริมาณสารสำคัญและผลผลิตใบบัวบกในสภาพแปลงปลูก (Chachai *et al.*, 2021) อย่างไรก็ตาม การปรับปรุงเชื้อพันธุกรรมบัวบกสายพันธุ์พื้นเมืองให้มีลักษณะการเจริญเติบโตที่ดี ให้ปริมาณผลผลิตต่อพื้นที่สูง และเหมาะสมสำหรับผลิตในระบบการผลิต จะสามารถ

ช่วยเพิ่มโอกาสและทางเลือกให้แก่เกษตรกรผู้ผลิตบัวบกได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ ชนิดพืชที่ใกล้เคียงกับบัวบก (*C. asiatica*) ที่มีแหล่งกระจายพันธุ์ในประเทศออสเตรเลีย ได้แก่ *C. cordifolia* และ *C. erecta* สามารถนำมาใช้ในการปรับปรุงสายพันธุ์บัวบกที่มีปริมาณสาร triterpene glycoside, phenolics และสารต้านอนุมูลอิสระได้อีกด้วย (Alqahtani *et al.*, 2017)

ผลของรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันต่อการเจริญเติบโตของต้นกล้าบัวบกสายพันธุ์พื้นเมืองหลังได้รับรังสีรุ่นที่ M_1V_2

การศึกษาผลของรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันต่อการเจริญเติบโตของต้นกล้าบัวบกสายพันธุ์พื้นเมืองหลังได้รับรังสีรุ่นที่ M_1V_2 โดยสุ่มเลือกต้นพันธุ์จากต้นแม่รุ่นที่ M_1V_1 จำนวน 30 ต้นต่อระดับปริมาณรังสีขยายพันธุ์บัวบกสายพันธุ์พื้นเมืองหลังได้รับรังสีรุ่นที่ M_1V_2 ด้วยวิธีการชำหน่อจากต้นแม่รุ่นที่ M_1V_1 บันทึกข้อมูลที่อายุ 60 วันหลังย้ายปลูก (Figure 2) ผลการศึกษา พบว่า ทุกลักษณะที่ศึกษามีความแปรปรวนค่อนข้างสูง โดยบัวบกสายพันธุ์พื้นเมืองหลังได้รับรังสีรุ่นที่ M_1V_2 มีการกระจายของลักษณะความสูงต้น มีต้นสูงค่าเฉลี่ยความสูง 17.36 เซนติเมตร ต้นสูงที่สุดสูง 30.00 เซนติเมตร และต้นเตี้ยที่สุดสูง 4.00 เซนติเมตร การกระจายตัวในลักษณะจำนวนใบ พบว่า บัวบกสายพันธุ์พื้นเมืองหลังได้รับรังสีรุ่นที่ M_1V_2 มีค่าเฉลี่ยจำนวนใบ 24.88 ใบ จำนวนใบมากที่สุด 64 ใบ และใบน้อยที่สุด 3 ใบ ขณะที่ ลักษณะความยาวใบ พบว่า บัวบกสายพันธุ์พื้นเมืองหลังได้รับรังสีรุ่นที่ M_1V_2 มีค่าเฉลี่ยความยาวใบ 7.43 เซนติเมตร ใบยาวที่สุดยาว 11.50 เซนติเมตร ใบสั้นที่สุดยาว 2.00 เซนติเมตร การกระจายตัวในลักษณะความกว้างใบ พบว่า บัวบกสายพันธุ์พื้นเมืองหลังได้รับรังสีรุ่นที่ M_1V_2 มีค่าเฉลี่ยความกว้างใบ 4.34 เซนติเมตร ใบกว้างที่สุด 6.50 เซนติเมตร และใบแคบที่สุด 2.00 เซนติเมตร ลักษณะความยาวก้านใบ พบว่า ความยาวก้านใบเฉลี่ย 17.61 เซนติเมตร

ก้านใบยาวที่สุด 30.00 เซนติเมตร และสั้นที่สุด 4 เซนติเมตร ในขณะที่ จำนวนไหลของบัวบกสายพันธุ์พื้นเมืองหลังได้รับรังสีรุ่นที่ M_1V_2 มีค่าเฉลี่ยจำนวนไหล 2.85 ไหล ลักษณะความยาวไหล พบว่า บัวบกสายพันธุ์

พื้นเมืองหลังได้รับรังสีรุ่นที่ M_1V_2 มีค่าเฉลี่ยความยาวไหล 68.10 เซนติเมตร ไหลยาวที่สุดยาว 140 เซนติเมตร และบางต้นไม่พบการเกิดไหล (Table 3; Figure 3)

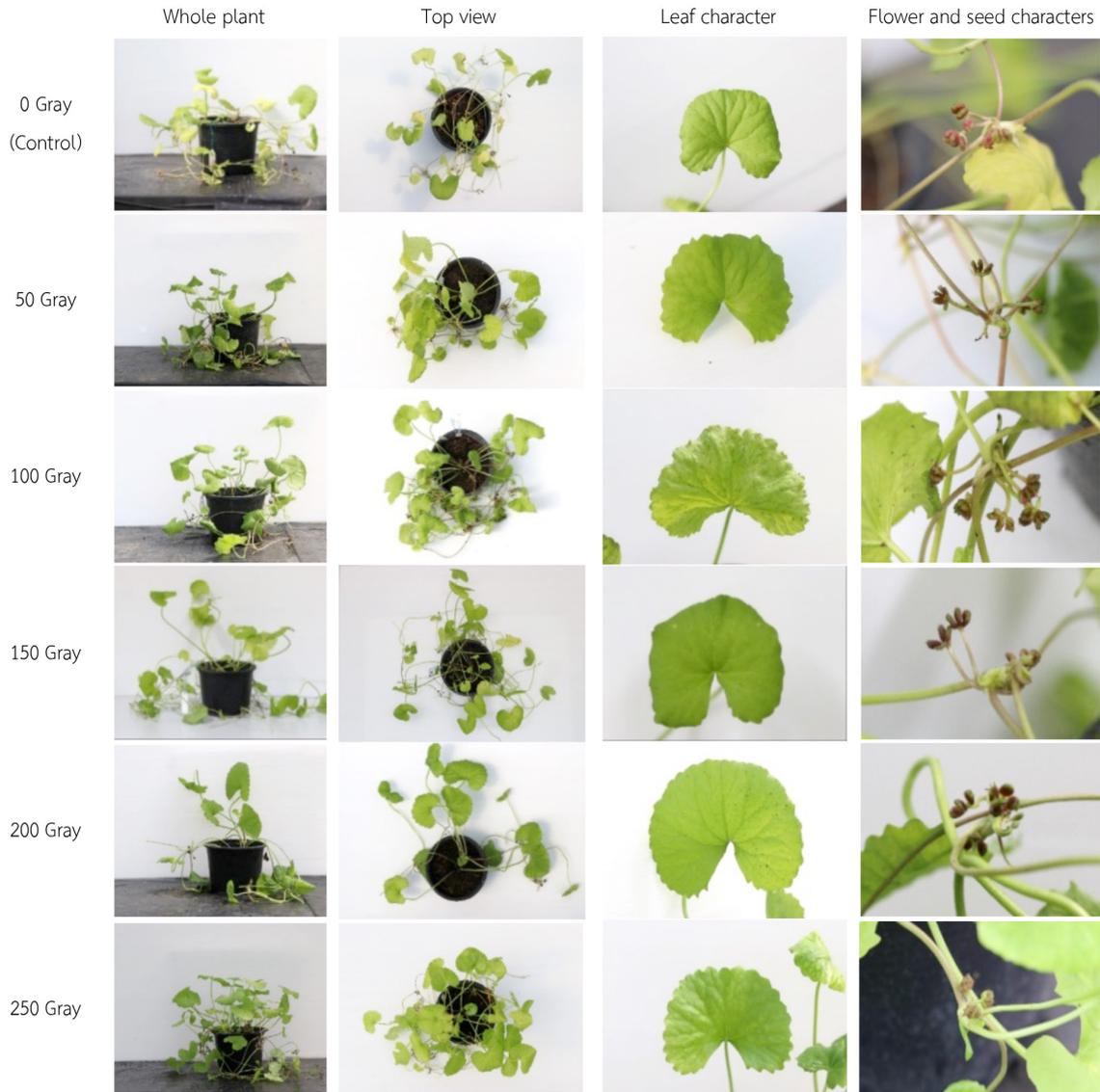


Figure 2 Morphological characteristic variations of M_1V_2 generation of Asiatic pennywort mutants

Table 3 Morphological characteristic variability of M₁V₂ generation of Asiatic pennywort plants at 60 days after transplanted

| Radiation doses (Gy) | Plant height (cm) | Leaf number (leaf) | Leaf length (cm) | Leaf width (cm) | Petiole length (cm) | Stolon number (stolon) | Stolon length (cm) |
|----------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| Control | 17.60 ± 3.31 ^{cd} | 17.80 ± 6.02 ^c | 7.70 ± 0.91 ^a | 4.46 ± 0.65 ^{ab} | 20.47 ± 5.69 ^a | 2.43 ± 0.68 ^c | 64.38 ± 33.76 ^{ab} |
| 50 | 16.75 ± 3.30 ^{de} | 26.50 ± 5.44 ^b | 7.76 ± 0.92 ^a | 4.68 ± 0.70 ^a | 16.28 ± 3.71 ^c | 2.90 ± 0.76 ^{abc} | 65.43 ± 23.27 ^{ab} |
| 100 | 15.42 ± 4.75 ^e | 25.37 ± 15.23 ^b | 6.78 ± 1.85 ^c | 3.92 ± 1.06 ^c | 16.70 ± 5.00 ^c | 2.87 ± 1.50 ^{abc} | 71.45 ± 36.57 ^{ab} |
| 150 | 19.73 ± 3.76 ^a | 23.77 ± 7.41 ^b | 7.93 ± 1.62 ^a | 4.53 ± 1.02 ^{ab} | 19.35 ± 4.56 ^{ab} | 2.53 ± 0.97 ^{bc} | 75.95 ± 22.40 ^a |
| 200 | 18.73 ± 3.11 ^{ab} | 21.77 ± 9.41 ^{bc} | 7.53 ± 1.49 ^{ab} | 4.38 ± 0.89 ^{abc} | 17.60 ± 3.99 ^{bc} | 3.10 ± 1.27 ^{ab} | 57.34 ± 23.96 ^b |
| 250 | 15.95 ± 2.88 ^{de} | 34.07 ± 10.08 ^a | 6.90 ± 0.84 ^{bc} | 4.08 ± 0.82 ^{bc} | 15.23 ± 2.74 ^c | 3.27 ± 1.08 ^a | 73.83 ± 22.74 ^a |
| Maximum | 30.00 | 64.00 | 11.50 | 6.50 | 30.00 | 6.00 | 140.00 |
| Minimum | 4.00 | 3.00 | 2.00 | 2.00 | 4.00 | 0.00 | 0.00 |
| Average | 17.36 | 24.88 | 7.43 | 4.34 | 17.61 | 2.85 | 68.06 |
| F-test | ** | ** | ** | ** | * | * | * |
| CV (%) | 22.07 | 42.69 | 18.63 | 20.63 | 26.62 | 38.81 | 41.24 |

Means followed by the same letters within each column are not significantly different according to Duncan's multiple range test (P < 0.05), * significantly different (P < 0.05), ** highly significant different (P < 0.01), CV = coefficient of variation.

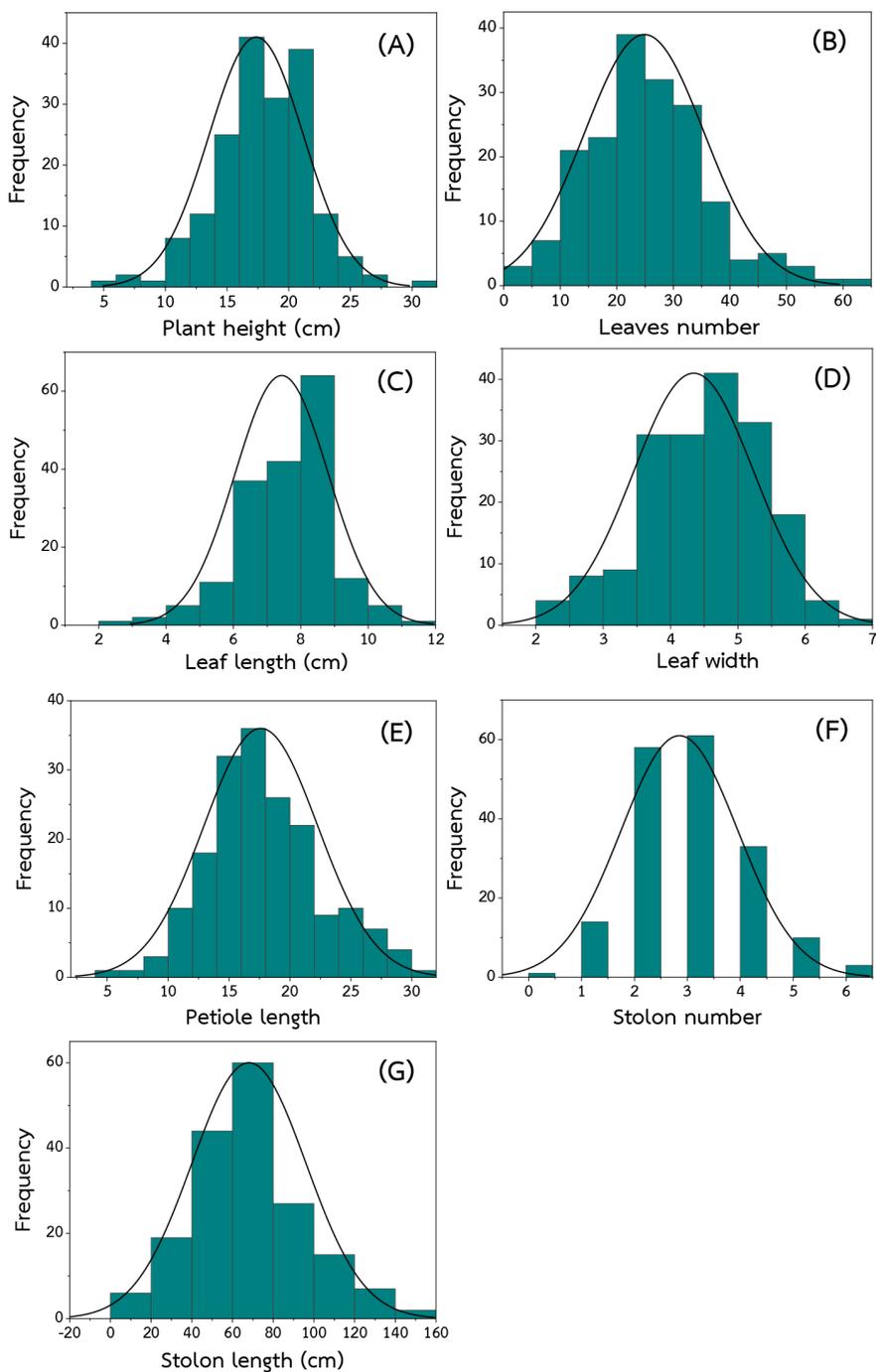


Figure 3 Distribution of 180 individual plants of M_1V_2 Asiatic pennywort from different doses of gamma ray at 60 days after transplanted: (A) plant height, (B) leaf number, (C) leaf length, (D) leaf width, (E) petiole length, (F) stolon number, (G) stolon length

การประเมินความแปรปรวนของลักษณะการเจริญเติบโตของบัวบกสายพันธุ์พื้นเมืองหลังได้รับรังสีรุ่นที่ M_1V_2 ที่ได้รับปริมาณรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันแตกต่างกัน ที่อายุ 60 วันหลังย้ายปลูกในสภาพโรงเรือน (Table 3) พบว่า ลักษณะความสูงต้น จำนวนใบ ความกว้างใบ และความยาวใบ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) ขณะที่ ลักษณะความยาวก้านใบ จำนวนไหล และความยาวไหลมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยปริมาณรังสีแกมมา 150 และ 200 เกรย์ ส่งผลให้ต้นกล้าบัวบกสายพันธุ์พื้นเมืองหลังได้รับรังสีรุ่นที่ M_1V_2 มีความสูงต้นมากที่สุด ขณะที่ ปริมาณรังสีแกมมา 200 เกรย์ ส่งผลให้ต้นกล้าบัวบกสายพันธุ์พื้นเมืองหลังได้รับรังสีรุ่นที่ M_1V_2 มีจำนวนใบมากที่สุด ลักษณะความยาวและความกว้างใบ พบว่า ที่ปริมาณรังสีแกมมา 100 เกรย์ ส่งผลให้ต้นกล้าบัวบกสายพันธุ์พื้นเมืองหลังได้รับรังสีรุ่นที่ M_1V_2 มีใบขนาดเล็กที่สุด ขณะที่ ลักษณะความยาวก้านใบ พบว่า ที่ปริมาณรังสีแกมมา 50, 100 และ 250 เกรย์ ส่งผลให้ต้นกล้าบัวบกสายพันธุ์พื้นเมืองหลังได้รับรังสีรุ่นที่ M_1V_2 มีก้านใบสั้นลง ลักษณะจำนวนไหล พบว่า ชุดควบคุม (0 เกรย์) มีจำนวนไหลน้อยที่สุด และลักษณะความยาวไหล พบว่า ที่ปริมาณรังสีแกมมา 200 เกรย์ ส่งผลให้ต้นกล้าบัวบกสายพันธุ์ M_1V_2 มีไหลสั้นลง

สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของสัณฐานวิทยาบัวบกสายพันธุ์พื้นเมืองหลังได้รับรังสีรุ่นที่ M_1V_1 และ M_1V_2 ที่ปลูกในสภาพโรงเรือน

ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของลักษณะสัณฐานวิทยาของบัวบกสายพันธุ์พื้นเมืองหลังได้รับรังสีรุ่นที่ M_1V_1 อายุ 60 และ 90 วันหลังย้ายปลูกในสภาพโรงเรือน (Tables 4–5) พบว่า ทั้ง 2 ช่วงอายุมีความแตกต่างกันของค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ โดยที่อายุ 60 วันหลังย้ายปลูก พบว่า ลักษณะความสูงต้นมีความสัมพันธ์เชิงบวกสูงกับจำนวนใบ ความยาวใบ ความกว้างใบ และความยาวก้านใบ (0.493, 0.643, 0.658 และ 0.981 ตามลำดับ) ขณะที่ ลักษณะจำนวนใบมีความสัมพันธ์เชิงบวกสูงกับจำนวนไหล (0.539) ลักษณะความยาวใบมีความสัมพันธ์เชิงบวกสูงกับความกว้างใบและความยาวก้านใบ (0.759 และ 0.683 ตามลำดับ) ลักษณะความกว้างใบมีความสัมพันธ์เชิงบวกสูงกับความยาวก้านใบ (0.685) และลักษณะจำนวนไหลมีความสัมพันธ์เชิงบวกสูงกับความยาวไหล (0.737) ในขณะที่ ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ที่อายุ 90 วันหลังย้ายปลูก พบว่า ลักษณะความสูงต้นมีความสัมพันธ์เชิงบวกสูงกับความยาวก้านใบและความยาวไหล (0.785 และ 0.552 ตามลำดับ) ลักษณะจำนวนใบมีความสัมพันธ์เชิงลบสูงกับความยาวก้านใบ (-0.522) ลักษณะความยาวใบมีความสัมพันธ์เชิงบวกสูงกับความกว้างใบและจำนวนไหล (0.584 และ 0.492 ตามลำดับ) และลักษณะความกว้างใบมีความสัมพันธ์เชิงบวกสูงกับจำนวนไหล (0.552)

Table 4 Pearson correlation coefficients of morphological characters of M₁V₁ Asiatic pennywort mutants during 60 days after transplanted under greenhouse conditions

| Characters | Plant height | Leaf number | Leaf length | Leaf width | Petiole length | Stolon number |
|----------------|--------------|-------------|-------------|------------|----------------|---------------|
| Leaf number | 0.493* | | | | | |
| Leaf length | 0.643** | 0.340 | | | | |
| Leaf width | 0.658** | 0.467 | 0.759** | | | |
| Petiole length | 0.981** | 0.409 | 0.683** | 0.685** | | |
| Stolon number | 0.315 | 0.539* | 0.227 | 0.127 | 0.271 | |
| Stolon length | 0.251 | 0.341 | 0.438 | 0.203 | 0.208 | 0.737** |

* Correlation is significant at the 0.05 level, ** Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed)

Table 5 Pearson correlation coefficients of morphological characters of M₁V₁ Asiatic pennywort mutants during 90 days after transplanted under greenhouse conditions

| Characters | Plant height | Leaf number | Leaf length | Leaf width | Petiole length | Stolon number |
|----------------|--------------|-------------|-------------|------------|----------------|---------------|
| Leaf number | -0.382 | | | | | |
| Leaf length | 0.365 | 0.010 | | | | |
| Leaf width | -0.153 | 0.005 | 0.584* | | | |
| Petiole length | 0.785** | -0.522* | 0.446 | -0.038 | | |
| Stolon number | -0.038 | 0.433 | 0.492* | 0.552* | -0.132 | |
| Stolon length | 0.552* | 0.357 | 0.315 | -0.045 | 0.440 | 0.169 |

* Correlation is significant at the 0.05 level, ** Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed)

ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของลักษณะ สัณฐานวิทยาของบัวบกสายพันธุ์พื้นเมืองหลังได้รับรังสี รุนที่ M₁V₂ ที่ปลูกในสภาพโรงเรือน จำนวน 180 ต้น (สายพันธุ์) พบว่า ลักษณะความสูงต้นของบัวบกสาย พันธุ์พื้นเมืองหลังได้รับรังสีมีความสัมพันธ์เชิงบวกสูง กับความยาวใบ ความกว้างใบ และความยาวก้านใบ (0.487, 0.415 และ 0.708 ตามลำดับ) ขณะที่ ลักษณะ จำนวนใบของบัวบกสายพันธุ์พื้นเมืองหลังได้รับรังสีมี ความสัมพันธ์เชิงบวกสูงกับจำนวนไหล (0.641) ลักษณะความยาวใบของบัวบกสายพันธุ์พื้นเมืองหลัง ได้รับรังสีมีความสัมพันธ์เชิงบวกสูงกับความกว้างใบ และความยาวก้านใบ (0.852 และ 0.566 ตามลำดับ)

รวมถึงลักษณะความกว้างใบมีความสัมพันธ์เชิงบวกสูง กับความยาวก้านใบ (0.467; Table 6) ซึ่งจากผลการ ทดลองของ Nav *et al.* (2021) รายงานว่า ลักษณะ ความยาวใบ ความยาวก้านใบ ความยาวข้อ ขนาดและ ความยาวรากมีความสัมพันธ์เชิงบวกสูงกับปริมาณสาร สำคัญในกลุ่ม pentacyclic triterpenes ซึ่งประกอบด้วยสารเอเชียติโคไซด์ และมาเดคาสโซไซด์ นอกจากนี้ สารเอเชียติโคไซด์ยังมีความสัมพันธ์เชิงบวกสูงกับสาร มาเดคาสโซไซด์ (0.99) นอกจากนี้ จากการวิเคราะห์ เส้นทาง (Path analysis) ของบัวบก Nav *et al.* (2021) ยังพบว่า ความยาวข้อ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางราก และความยาวใบสามารถใช้ในการคัดเลือกสายพันธุ์

บัวบกที่มีปริมาณสารสำคัญและผลผลิตสูงได้ จากการทดลองนี้ จึงสามารถสรุปได้เบื้องต้นว่า การคัดเลือกสายพันธุ์บัวบกสายพันธุ์พื้นเมืองหลังได้รับรังสีที่มีความเหมาะสมต่อการผลิตในเชิงการค้า และมี

ปริมาณสารสำคัญสูงควรให้ความสำคัญกับลักษณะจำนวนไหลและความสูงต้น เพราะส่งผลทำให้บัวบกมีจำนวนใบต่อต้นเพิ่มมากขึ้น รวมถึงมีขนาดใบที่ใหญ่ขึ้นอีกด้วย

Table 6 Pearson correlation coefficients of morphological characters of M_1V_2 Asiatic pennywort mutants during 60 days after transplanted under greenhouse conditions

| Characters | Plant height | Leaf number | Leaf length | Leaf width | Petiole length | Stolonnumber |
|----------------|--------------|-------------|-------------|------------|----------------|--------------|
| Leaf number | -0.014 | | | | | |
| Leaf length | 0.487* | -0.119 | | | | |
| Leaf width | 0.415* | -0.086 | 0.852** | | | |
| Petiole length | 0.708** | -0.159 | 0.566** | 0.467* | | |
| Stolon number | 0.190 | 0.641** | 0.060 | 0.059 | 0.043 | |
| Stolon length | 0.177 | 0.362 | 0.223 | 0.152 | 0.105 | 0.123 |

* Correlation is significant at the 0.05 level, ** Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed)

สรุป

ปริมาณรังสีที่เหมาะสมสำหรับการชักนำให้เกิดการกลายด้วยรังสีแกมมาแบบเฉียบพลันในบัวบกสายพันธุ์พื้นเมืองของไทย มีค่าเท่ากับ 162.51 เกรย์ ซึ่งปริมาณรังสีแกมมาสามารถเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาของบัวบก ปริมาณรังสีแกมมาที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้ ความสูงต้น ความยาวก้านใบ และความยาวไหลลดลง แต่ทำให้จำนวนใบ ความกว้างใบ ความยาวใบ และจำนวนไหลเพิ่มขึ้นเมื่อปลูกทดสอบที่อายุ 90 วัน ซึ่งจากผลการทดลองสามารถสรุปในเบื้องต้นได้ว่า สามารถใช้รังสีแกมมาในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์และการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของบัวบกสายพันธุ์พื้นเมืองของไทยได้อย่างเหมาะสมและมีประสิทธิภาพ สามารถใช้เป็นเชื้อพันธุ์กรรมในการคัดเลือกสายพันธุ์บัวบกที่มีผลผลิตสูงและรวมถึงสารสำคัญในกลุ่มเอเชียติโคไซด์ (Asiaticoside) เอเชียติคแอซิด (Asiatic acid) มาเดคาสโซไซด์ (Madecassoside) และมาเดคาสซิกแอซิด (Madecassic acid) ได้ในอนาคต นอกจากนี้ การคัดเลือกสายพันธุ์บัวบกสายพันธุ์พื้นเมือง

หลังได้รับรังสีที่มีความเหมาะสมต่อการผลิตในเชิงการค้า และมีปริมาณสารสำคัญสูงควรให้ความสำคัญกับลักษณะจำนวนไหลและความสูงต้น เพราะส่งผลทำให้บัวบกมีจำนวนใบต่อต้นเพิ่มมากขึ้น รวมถึงมีขนาดใบที่ใหญ่ขึ้นอีกด้วย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.) ที่ให้การสนับสนุนงบประมาณในการดำเนินงานโครงการวิจัยภายใต้งบประมาณโครงการวิจัยมูลฐาน (Fundamental Fund) ปีงบประมาณ พ.ศ. 2563–2565 และขอขอบคุณสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ที่ให้การสนับสนุนอุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมี ตลอดจนโรงเรือนที่ใช้ในการทดลองและห้องปฏิบัติการ รวมถึงขอขอบคุณนักวิจัยและผู้ช่วยวิจัยของสถานีวิจัยลำตะคองที่อำนวยความสะดวกและช่วยเหลือในการดำเนินการทดลองในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- AAT Bioquest. 2023. Quest Graph™ LD50 calculator. Available Source: <https://www.aatbio.com/tools/ld50-calculator>, January 29, 2023.
- Abdelnour-Esquivel, A., J. Perez, M. Rojas, W. Vargas and A. Gatica-Arias. 2020. Use of gamma radiation to induce mutations in rice (*Oryza sativa* L.) and the selection of lines with tolerance to salinity and drought. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 56: 88–97. <https://doi.org/10.1007/s11627-019-10015-5>.
- Alqahtani, A., J.L. Cho, K.H. Wong, K.M. Li, V. Razmovski–Naumovski and G.Q. Li. 2017. Differentiation of three *Centella* species in Australia as inferred from morphological characteristics, ISSR molecular fingerprinting and phytochemical composition. *Front. Plant Sci.* 8: 1980. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01980>.
- Andrew-Peter-Leon, M.T., S. Ramchander, K.K. Kumar, M. Muthamilarasan and M.A. Pillai. 2021. Assessment of efficacy of mutagenesis of gamma-irradiation in plant height and days to maturity through expression analysis in rice. *PLoS ONE* 16(1): e0245603. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245603>.
- Balla, N., T. Taychasinpitak, A. Jala and T. Thanananta. 2017. Effect of gamma irradiation on hybrid ornamental sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) *in vitro*. *Agricultural Sci. J.* 48(1): 151–159. (in Thai)
- Bioinformatics. 2023. SR plot. Available Source: http://bioinformatics.com.cn/plot_basic_corrplot_correlation_plot_082_en, January 29, 2023.
- Brinkhaus, B., M. Lindner, D. Schuppan and E.G. Hahn. 2000. Chemical, pharmacological and clinical profile of the East Asian medical plant *Centella asiatica*. *Phytomedicine.* 7(5): 427–448. [https://doi.org/10.1016/s0944-7113\(00\)80065-3](https://doi.org/10.1016/s0944-7113(00)80065-3).
- Chachai, N., B. Pensuriya, T. Pinsuntiae, P. Pratubkong, J. Mungngam, P. Nitmee, P. Kaewsri, S. Wongsatchanan, R. Jindajia, P. Triboun and J. Sreesaeng. 2021. Variability of morphological and agronomical characteristics of *Centella asiatica* in Thailand. *Trends Sci.* 18(23): 502. <https://doi.org/10.48048/tis.2021.502>.
- Collins, M., R. Knutti, J. Arblaster, J.L. Dufresne, T. Fichet, P. Friedlingstein, X. Gao, W.J. Gutowski, T. Johns, G. Krinner, M. Shongwe, C. Tebaldi, A.J. Weaver and M. Wehner. 2013. Long-term climate change: projections, commitments and irreversibility, pp. 1029–1136. *In* T.F. Stocker, D. Qin, G.K. Plattner, M. Tignor, S.K. Allen, J. Boschung, A. Nauels, Y. Xia, V. Bex and P.M. Midgley, eds. *Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.* Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, USA.

- Devkota, A., S. Dall'Acqua, S. Comai, G. Innocenti and P.K. Jha. 2010. *Centella asiatica* (L.) urban from Nepal: Quali-quantitative analysis of samples from several sites, and selection of high terpene containing populations for cultivation. *Biochem. Syst. Ecol.* 38(1) :12–22. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2009.12.019>.
- Eom, H.J., H.Y. Shin, H.J. Park, K.H. Kim, J.H. Kim and K.W. Yu. 2022. Functional components and physiological activity in different parts of *Centella asiatica*. *Korean J. Food Preserv.* 29(5): 749–761. <https://doi.org/10.11002/kjfp.2022.29.5.749>.
- Gbolahan, B.W., A.I. Abiola, J. Kamaldin, M.A. Ahmad and M.S. Atanassova. 2016. Accession in *Centella asiatica*; current understanding and future knowledge. *J. Pure Appl. Microbiol.* 10(4): 2485–2494. <http://dx.doi.org/10.22207/JPAM.10.4.02>.
- Gohil, K.J., J.A. Patel and A.K. Gajjar. 2010. Pharmacological review on *Centella asiatica*: a potential herbal cure—all. *Indian J. Pharm. Sci.* 72(5): 546–556. <https://doi.org/10.4103%2F0250-474X.78519>.
- Gray, N.E., A.A. Magana, P. Lak, K.M. Wright, J. Quinn, J.F. Stevens, C.S. Maier and A. Soumyanath. 2018. *Centella asiatica* – Phytochemistry and mechanisms of neuroprotection and cognitive enhancement. *Phytochem. Rev.* 17(1): 161–194. <https://doi.org/10.1007/s11101-017-9528-y>.
- Gray, S.B. and S.M. Brady. 2016. Plant developmental responses to climate change. *Dev. Biol.* 419(1): 64–77. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.07.023>.
- Hase, Y., K. Satoh and S. Kitamura. 2023. Comparative analysis of seed and seedling irradiation with gamma rays and carbon ions for mutation induction in *Arabidopsis*. *Front. Plant Sci.* 14: 1149083. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1149083>.
- Hashim, P. 2011. *Centella asiatica* in food and beverage applications and its potential antioxidant and neuroprotective effect. *Int. Food Res. J.* 18(4): 1215–1222.
- Hassani, A., A. Azapagic and N. Shokri. 2021. Global predictions of primary soil salinization under changing climate in the 21st century. *Nat. Commun.* 12: 6663. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26907-3>.
- Kaensaksiri, T., P. Soontornchainaksaeng, N. Soonthornchareonnon and S. Prathanturarug. 2010. Mutational breeding of *Centella asiatica* (L.) urban for medicinal purposes. *Planta Med.* 76: 182. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1264480>.
- Kaensaksiri, T., P. Soontornchainaksaeng, N. Soonthornchareonnon and S. Prathanturarug. 2011. *In vitro* induction of polyploidy in *Centella asiatica* (L.) Urban. *Plant Cell Tiss. Organ. Cult.* 107: 187–194. <https://doi.org/10.1007/s11240-011-9969-8>.

- Kiani, D., A. Borzouei, S. Ramezanpour, H. Soltanloo and S. Saadati. 2022. Application of gamma irradiation on morphological, biochemical, and molecular aspects of wheat (*Triticum aestivum* L.) under different seed moisture contents. *Sci. Rep.* 12: 11082. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-14949-6>.
- Majeed, A., Z. Muhammad, R. Ullah and H. Ali. 2018. Gamma irradiation I: effect on germination and general growth characteristics of plants—a review. *Pak. J. Bot.* 50(6): 2449–2453.
- Moghaddam, S.S., H. Jaafar, R. Ibrahim, A. Rahmat, M.A. Aziz and E. Philip. 2011. Effects of acute gamma irradiation on physiological traits and flavonoid accumulation of *Centella asiatica*. *Molecules.* 16(6): 4994–5007. <https://doi.org/10.3390/molecules16064994>.
- Mumtazah, H.M., Supriyono, Y. Widyastuti and A. Yunus. 2020. The diversity of leaves and asiaticoside content on three accessions of *Centella asiatica* with the addition of chicken manure fertilizer. *Biodiversitas.* 21(3): 1035–1040. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d210325>.
- Nav, S.N., S.N. Ebrahimib, A. Sonbolic and M.H. Mirjalili. 2021. Variability, association and path analysis of centellosides and agro-morphological characteristics in Iranian *Centella asiatica* (L.) Urban ecotypes. *S. Afr. J. Bot.* 139: 254–266. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.03.006>.
- Nawanopparatsakul, S., P. Phuagphong and N. Kitcharoen. 2012. Effect of citrus extractions on plant growth inhibition by lettuce (*Lactuca sativa* L) seed germination and seedling length bioassay. *J. Pharm. Biomed. Sci.* 22(22): 25.
- Ogunka-Nnoka, C.U., F.U. Igwe, J. Agwu, O.J. Peter and P.H. Wolugbom. 2020. Nutrient and phytochemical composition of *Centella asiatica* leaves. *Med. Aromat. Plants (Los Angeles).* 9(2): 346. <https://doi.org/10.35248/2167-0412.20.9.346>.
- Padmalatha, K. and M.N.V. Prasad. 2008. Genetic diversity in *Centella asiatica* (L.) Urb., a memory-enhancing nutraceutical herb, using RAPD markers. *Med. Aromat. Plant Sci. Biotechnol.* 2(2): 90–95.
- Pant, P., S. Pandey and S. Dall'Acqua. 2021. The influence of environmental conditions on secondary metabolites in medicinal plants: a literature review. *Chem. Biodivers.* 18(11): e2100345. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202100345>.
- Prasad, A., S.S. Dhawan, A.K. Mathur, O. Prakash, M.M. Gupta, R.K. Verma, R.K. Lal and A. Mathur. 2014. Morphological, chemical and molecular characterization of *Centella asiatica* germplasms for commercial cultivation in the Indo-Gangetic plains. *Nat. Prod. Commun.* 9(6): 779–784.

- Roostika, I., S. Rahayu and N. Bermawie. 2022. The application of gamma ray irradiation to increase triterpenoid compounds in embryogenic calli of *Centella asiatica* L. Urban. AIP Conf. Proc. 2462(1): 050001. <https://doi.org/10.1063/5.0076402>.
- Sawatdiwong, K., K. Chusreeaeom and S. Wongchaochant. 2020. Effect of gamma radiation on *in vitro* growth and morphological changes of *Anoectochilus koshunensis* Hayata. In Proc. the 58th Kasetsart University Annual Conference, February 5–7, 2020. p. 260. (in Thai)
- Singh, B. and R.P. Rastogi. 1969. A reinvestigation of the triterpenes of *Centella asiatica*. Phytochemistry 8(5): 917–921. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)85884-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)85884-7).
- Srithongkul, J., S. Kanlayanarat, V. Srilaong, A. Uthairatanakij and P. Chalermglin. 2011. Effects of light intensity on growth and accumulation of triterpenoids in three accessions of Asiatic pennywort (*Centella asiatica* (L.) Urb.). J. Food Agric. Environ. 9(1): 360–363.
- Tan, C., X.Q. Zhang, Y. Wang, D. Wu, M.I. Bellgard, Y. Xu, X. Shu, G. Zhou and C. Li. 2019. Characterization of genome-wide variations induced by gamma-ray radiation in barley using RNA-Seq. BMC Genomics. 20: 783. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6182-3>.
- Tanimlak, S., T. Taychasinpitak, P. Sukprasert, P. Jompuk and A. Piriya-phattarakit. 2018. Mutation breeding of gomphrena hybrid by gamma irradiation. TJST. 7(1): 48–57. <https://doi.org/10.14456/tjst.2018.6>. (in Thai)
- Willeit, M., A. Ganopolski, R. Calov and V. Brovkin. 2019. Mid-Pleistocene transition in glacial cycles explained by declining CO₂ and regolith removal. Sci. Adv. 5(4): eaav7337. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aav7337>.
- WHO (World Health Organization). 2010. Ageing: Global Population. Available Source: <https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/population-ageing>, January 28, 2023.
- Yasurin, P., M. Sriariyanun and T. Phusantisampan. 2016. Review: The bioavailability activity of *Centella asiatica*. KMUTNB Int. J. Appl. Sci. Tech. 9(1): 1–9. <http://dx.doi.org/10.14416/j.ijast.2015.11.001>.
- Zhang, X.G., T. Han, Z.G. He, Q.Y. Zhang, L. Zhang, K. Rahman and L.P. Qin. 2012. Genetic diversity of *Centella asiatica* in China analyzed by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers: combination analysis with chemical diversity. J. Nat. Med. 66: 241–247. <https://doi.org/10.1007/s11418-011-0572-4>.