

***Peristylus carnosipetalus* (Orchidaceae), a new species from northern Thailand**

HUBERT KURZWEIL*

Herbarium, Singapore Botanic Gardens, 1 Cluny Rd., Singapore 259569

ABSTRACT. *Peristylus carnosipetalus* Kurzweil from Chiang Mai Province in Northern Thailand is described and illustrated. The new species is similar to *P. nematocaulon* (Hook.f.) Banerji & P. Pradhan from the Himalayas and China but differs by having much narrower linear-lanceolate foliage leaves and mostly shorter and generally wider lip spurs.

Keywords: Orchidaceae, *Peristylus*, new species

INTRODUCTION

In a recent study of the Thai *Peristylus* species (Kurzweil, 2010) two very similar collections did not match any of the species known in Thailand, but were found to share critical characters with *P. nematocaulon* (Hook.f.) Banerji & P. Pradhan from the Himalayas and China, most importantly the lax to semi-dense inflorescences and the general shape and size of the sepals, petals and lip. Nevertheless, the two Thai specimens differ from this species particularly in their leaf shape. The two collections were

therefore provisionally listed as '*P. aff. nematocaulon*'. Subsequent herbarium study revealed that the two Thai collections are sufficiently distinct from this taxon, and consequently are here described as a new species.

***Peristylus carnosipetalus* Kurzweil, sp. nov.** Figs. 1–2.

Peristylus nematocaulon similis, caule 2- vel 3-foliato, foliis multo angustioribus, calcare latiore differt.

Type: Northern Thailand, Chiang Mai Province, Doi Chiang Dao Wildlife

* Corresponding author: hubert_kurzweil@nparks.gov.sg

Sanctuary, trail to the summit, *ca.* 2,100 m alt., open grassland, July 1996, *Suksathan* 1033 (holotype BCU, spirit).

Terrestrial herb, entirely glabrous, deciduous. *Tubers* elongate, *ca.* 0.9×0.4 cm. *Flowering shoots* slender, 7.5–15.7 cm tall. *Cataphyll* 1, tubular, tube erect and widened at the top, 0.7–1.2 cm long, acute, apex somewhat spreading. *Foliage leaves* 2 or 3, spreading to suberect, cauline and scattered along the stem, linear-lanceolate, acute, apiculate, $2.5\text{--}6.2 \times 0.4\text{--}0.6$ cm, basally sheathing for 0.7–1 cm, margins minutely denticulate, papillose or entire. *Sterile bracts of the flowering stem* absent or up to 3, linear-lanceolate, acuminate, 0.8–1.3 cm long, erect and basally sheathing, margins similar as the foliage leaves. *Inflorescences* semi-dense or lax, slender, 8- to 20-flowered; rachis 3–4.5 cm long; floral bracts narrowly lanceolate or lanceolate-elliptic, acute or acuminate, $2.8\text{--}6$ (–9) \times $1.3\text{--}1.9$ mm, mostly slightly shorter to slightly longer than the pedicel plus the ovary or sometimes clearly longer than the flowers. *Flower* not opening very widely, yellowish green in one specimen (*Tripetch* 001), colour not known in the other (*Suksathan* 1033). *Sepals* obtuse or subacute, with one strong vein in the middle and the median sepal in addition with two weaker lateral veins; median sepal erect, broadly elliptic to elliptic-

ovate, $1.6\text{--}2 \times 1\text{--}1.6$ mm; lateral sepals elliptic or elliptic-lanceolate, slightly oblique or not, $2\text{--}2.3 \times 0.8\text{--}1$ mm. *Petals* narrowly elliptic to ovate-elliptic, obtuse or subacute, 1-veined, erect or spreading, not forming a hood with the median sepal, $1.6\text{--}2.2 \times 0.75\text{--}1$ mm, weakly or strongly fleshy in the upper half. *Lip* $1.5\text{--}1.7 \times 0.9\text{--}1$ mm, entire or subentire (basally widened with the sides somewhat bulging and therefore appearing very obscurely 3-lobed), ovate-lanceolate or elliptic, apically more or less fleshy, obtuse; spur cylindrical, slightly clavate, 0.7–1 mm long, slightly curved forwards, entire or very weakly bifid, 0.7–1 mm wide when seen from the front. *Column* 0.6–1 mm long; anther loculi parallel; auricles elongate and forwards-pointing, *ca.* 0.3 mm long; stigmas subclavate, *ca.* 0.3 mm long. *Ovary* sessile, 2.8–4.5 mm long, erect, with obtuse ridges or entirely smooth. *Capsule* (only seen in *Tripetch* 001) broadly elliptic-fusiform, *ca.* 4×1.6 mm.

Phenology. – Flowering from July to September.

Ecology. – The type specimen was collected in open grassland at 2,100 m altitude. The only other collection of this species was made in a grassy patch in an open limestone crevasse at about 1,800 m altitude.

Distribution. – The species appears to be endemic to Northern Thailand.

Thailand. – Currently only known from two collections, both made in Doi Chiang Dao Wildlife Sanctuary, Chiang Mai Province, Northern Thailand.

Specimens examined. – *Suksathan* 1033 (holotype BCU, spirit); *Tripetch* 001 (QBG spirit A01).

Notes. – The structure of the subclavate stigmas which are adnate to the lip base and the presence of a lip spur clearly indicate that this new species belongs to the genus *Peristylus*. It is characterised by the linear-lanceolate foliage leaves and the minute flowers with entire or subentire lip which is not known in any other Thai *Peristylus* species (Seidenfaden, 1977; Kurzweil, 2010). While the two collections are very similar in their flower features, the general plant size and foliage are somewhat different (*Suksathan* 1033: plants 12.5–15.7 cm tall with three leaves 3–6.2 cm long; *Tripetch* 001: plants 7.5 cm tall with two leaves to 2.5 cm long) which is probably the result of different environmental conditions. In both specimens the petals are fleshy in their upper half (strongly so in *Suksathan* 1033; less pronounced in *Tripetch* 001) which is also found in the two similar species *P. nematocaulon* (Banerji &

Pradhan, 1984) and *P. forceps* Finet (Chen *et al.*, 2009). The species name “*carnosipetalus*” alludes to this feature. In the specimen *Suksathan* 1033 the lip is also strongly fleshy in the upper half (much less in *Tripetch* 001). One of the specimens (*Tripetch* 001) had already started to set fruit at the time of collection, with the ovary of the lowermost flower dehiscent and releasing seeds. While the perianth was still fairly intact, the column was already partly dried up. Measurements of the column details were therefore only taken in the second specimen (*Suksathan* 1033).

The new species is most similar to *Peristylus nematocaulon*, currently only known from the Himalayas and China (Pearce & Cribb, 2002; Chen *et al.*, 2009), with which it shares the slender and rather lax inflorescence as well as the overall shape and size of the sepals, petals and lip. However, *P. nematocaulon* differs clearly by its single subbasal and oblong to oblong-elliptic foliage leaf 0.7–2 cm wide. Further differences are the mostly shorter and generally wider lip spurs of the new species (1–1.4 × 0.4–0.5 mm in *P. nematocaulon*; 0.7–1 × 0.7–1 mm in *P. carnosipetalus*). One of the syntypes of *P. nematocaulon* (Hooker s.n., K!) also differs by having more pointed tepals.

Similarities to four other *Peristylus* species can also be observed. The Chinese *P. forceps* shares an entire lip with *P. carnosipetalus* but is a taller plant (15–45 cm), has wider foliage leaves (elliptic-lanceolate to lanceolate and 0.8–2 cm wide), a denser inflorescence, longer bracts (*ca.* 8 mm long) and larger flowers (sepals and petals 2–3 mm long, lip 2.5–3.5 mm long) (Seidenfaden, 1977; Chen *et al.*, 2009). An entire lip is also found in the Chinese *P. forrestii* (Schltr.) K.Y. Lang which is a taller plant (20–25 cm) that has narrower basal leaves 2–3 mm wide, longer ovaries (5–8 mm long), larger flowers (sepals *ca.* 2.5 mm long; petals and lip *ca.* 3 mm long) and much longer lip spurs (5.5–8 mm) (Chen *et al.*, 2009). There is also a similarity to the Himalayan *P. duthiei* (Hook.f.) Deva & H.B. Naithani (syn. *Herminium duthiei* Hook.f.) in the shape and size of the flower parts but this species has mostly wider foliage leaves (to 1.5 cm wide) and differs by its saccate spur (Banerji & Pradhan, 1984; Pearce & Cribb, 2002). The Vietnamese *P. chapaensis* (Gagnep.) Seidenf. also has an entire lip but differs in its flowers which are about twice as large and in its shorter and wider foliage leaves (Seidenfaden, 1977).

ACKNOWLEDGEMENTS

Parts of this paper, particularly the line drawing as well as several passages of the text, were published before in *Nordic Journal of Botany* 28: 21–46, and I would like to acknowledge the Journal and Blackwell Publishing for permission to reuse parts of this publication. I furthermore wish to thank Dr J.F. Veldkamp from the Leiden Univ. Herbarium (Netherlands) for help with the Latin diagnosis. I also would like to thank Yotsawate Sirichamorn for making the line drawings and Petch Tripetch for the loan of the colour photo.

REFERENCES

- Banerji, M.L. & Pradhan, P. 1984. **The Orchids of the Nepal Himalaya**. Cramer Verlag, Vaduz.
- Chen, S.C., Gale, S.W. & Cribb, P.J. 2009. 41. *Peristylus* Blume. In: **Flora of China** Vol. 25. Z.Y. Wu, P.H. Raven & D.Y. Hong (Eds.), pp. 137–144. Science Press, Beijing, and Missouri Botanical Garden Press, St. Louis.
- Kurzweil, H. 2010. Taxonomic studies in the genus *Peristylus* (Orchidaceae) in Thailand. **Nordic Journal of Botany** 28: 21–46.
- Pearce, N.R. & Cribb, P.J. 2002. The Orchids of Bhutan. In: **Flora of Bhutan** Vol. 3. Royal Botanic Garden Edinburgh, Royal Government of Bhutan.
- Seidenfaden, G. 1977. Orchid Genera in Thailand V. Orchidoideae. **Dansk Botanisk Arkiv** 31(3): 1–149.

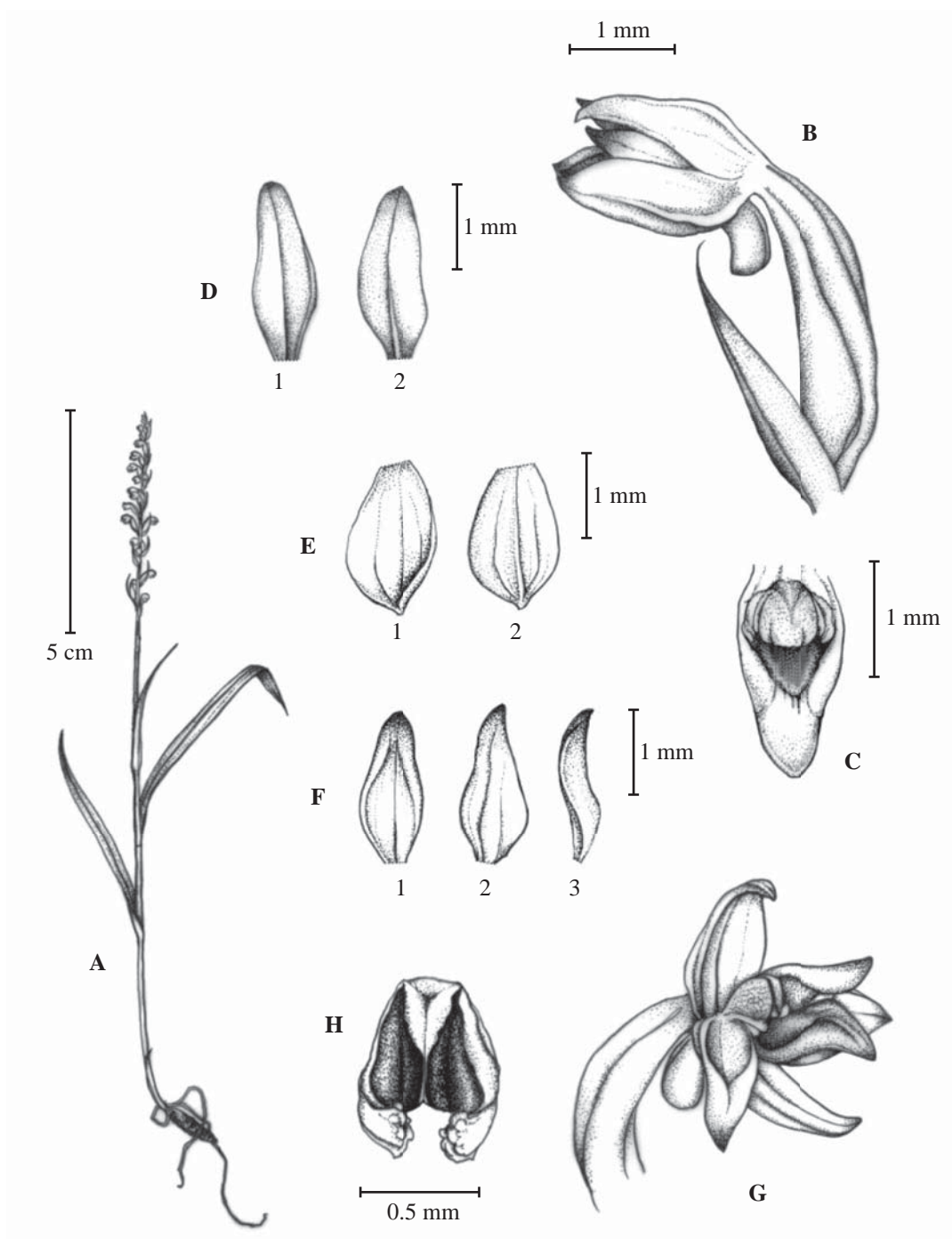


FIGURE 1. *Peristylus carnosipetalus* Kurzweil. A. plant; B. & G. flower, in G. forced open with the right petal bent down; C. lip and column from above; D. lateral sepal; E. median sepal; F. petal; H. column. (1 adaxial, 2 abaxial, 3 side view). Drawn from spirit material (*Suksathan 1033* (BCU)) by Yotsawate Sirichamorn.



FIGURE 2. *Peristylus carnosipetalus* Kurzweil. Plant habit. Photographer: Petch Tripetch.

Taxonomic study of the genus *Actinodaphne* Nees (Lauraceae) in Thailand

MONTRI TANAROS^{1*}, SRUNYA VAJRODAYA² AND KONGKANDA CHAYAMARIT¹

¹ Queen Sirikit Botanic Garden, The Botanical Garden Organization, Mae Rim, Chiang Mai 50180, Thailand

² Department of Botany, Faculty of Science, Kasetsart University, Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand

ABSTRACT. A taxonomic study of the genus *Actinodaphne* Nees in Thailand is presented. Eleven species were enumerated, namely *Actinodaphne amabilis* Kosterm., *A. angustifolia* (Blume) Nees, *A. cupularis* (Hemsl.) Gamble, *A. glomerata* (Blume) Nees, *A. henryi* Gamble, *A. montana* Gamble, *A. omeiensis* (H. Liu) C.K. Allen, *A. perglabra* Kosterm., *A. sesquipedalis* (Wall. ex Kuntze) Hook.f. & Thoms. ex Meisn. var. *cambodiana* Lecomte, *A. sesquipedalis* var. *glabra* Kochummen, *A. sikkimensis* Meisn. and *Actinodaphne* sp.1.

KEYWORDS: Taxonomy, *Actinodaphne* Nees, Thailand

INTRODUCTION

The genus *Actinodaphne* Nees comprises about 100 species (Kostermans, 1957; Rohwer, 1993; van der Werff, 2001), distributed from India and Sri Lanka to Myanmar, Thailand, Indo-China, Korea, Japan, Malaysia and the Solomon Islands. The genus was established by C.G. Nees von Esenbeck

in 1831 based on *A. pruinosa* from peninsular Malaysia. Since then, a total of 150 binomials have been published by various authors (Julia, 2005). The name of the genus *Actinodaphne* come from Greek: *aktinos* means ray and *daphne* means laurel which alluding to the arrangement of leaves in star-shaped whorls (Kochummen, 1989). The reports on *Actinodaphne* in Thailand are as follow: Kostermans (1974) found 2 new species, *i.e.* *A. amabilis* and *A. perglabra*. The Forest Herbarium, (2001) reported

* Corresponding author: pakkiano@hotmail.com

three species of *Actinodaphne*, i.e. *A. angustifolia*, *A. henryi* and *A. montana*.

MATERIALS AND METHODS

Taxonomic revision of the genus *Actinodaphne* in Thailand was conducted between March 2005 and March 2008. Species diversity, morphological characters, distribution and ecological data were examined and recorded. Field collections and phenological observation were made throughout the country. The herbarium specimens available in Thai herbaria were thoroughly studied and identified by consulting the taxonomic literature and by comparison with photographs of type specimens from Thai and foreign herbaria.

TAXONOMIC TREATMENT

ACTINODAPHNE

Nees, Wall., Pl. Asiat. Rar. 2: 61, 68. 1831.— *Iozoste* Nees, Wall., Pl. Asiat. Rar. 2: 61. 1831. Type species.— *Actinodaphne pruinosa* Nees.

Evergreen, dioecious, small to medium-sized tree; bole straight to moderately straight, sometimes with small steep buttresses up to 1 m high. *Bark* generally nearly smooth, furrowed or cracking and occasionally lenticillate, outer bark greyish brown to darkish brown or reddish brown, with green or

white patches; inner bark yellowish orange to yellow. *Terminal bud* perulate with imbricate scales, ellipsoid to ovoid, oblong or lanceolate; apex acute, glabrous to tomentose, sometimes covered with large green leaf-like, narrowly elliptic-oblong, elliptic-ovate, narrowly lanceolate-elliptic, glabrous to tomentose sometimes caducous scale; distinct scar of scale just above the whorls of leaves. *Leaves* simple, verticillate or subverticillate, apex acute, acuminate, caudate or cuspidate, base cuneate, attenuate or oblique, margin usually entire; chartaceous or thinly coriaceous to coriaceous, shining green or dull dark green above, glaucous beneath, midrib and secondary veins arching and looping near margin and obscure to slightly distinct or distinct on both surfaces; tertiary veins scalariform or reticulate-scalariform. *Petiole* slender to stout, 0.3–5.5 cm long, glabrous to tomentose. *Inflorescences* axillary or/and borne along twigs between whorls of leaves, fasciculate, cymose, umbellate arranged in raceme or umbellate on short peduncles, 5–8 flowers per umbel; involucre bracts caducous, leaving distinct scars at inflorescence base. *Flower* trimerous, unisexual, usually 0.3–1 cm in diam., greenish white or yellow, fragrant; perianth lobes 6, equal to subequal, imbricate, inner lobes glabrous, outer lobes glabrous to tomentose,

membranaceous, 3–5 veins inside, elliptic, ovate or oblong, apex acute. *Staminate flower*: fertile stamens 9 (–10), arranged in 3 whorls, the first and second whorls eglandular, the third whorl with two glands on each side at base, glands usually globose, cordate or sagittate; filament slender, 0.3–7.2 mm long, longer or shorter than anther, glabrous to hairy; anther elliptic to oblong, apex acute, 0.8–2.5 mm long, 4-locular, introrse. *Pistillate flower*: staminodes 9 (–10), elliptic, spatulate, linear or 3-lobed, 0.5–2 mm long, glabrous to hairy at base; ovary superior, narrowed toward the style, ellipsoid to globose, glabrous to hairy, stigma peltate or 4-lobed, style

slender to stout, 0.5–2 mm long, glabrous to hairy. *Infructescences* each bearing 1–5 fruits. *Fruits* drupe, globose, subglobose or ellipsoid, seated on enlarge perianth tube partly enclosing the fruits, the tube disc-shaped or cup-shaped, 0.3–1 cm in diam., glabrous to puberulous inside, outside hairy, margin entire or undulate; young fruit light to dark green, slightly shining, with white mottles, dark purplish red to black when mature; fruit apex apiculate, persistent or caducous, perianth persistent or caducous, with distinct scar on the perianth tube when fruiting; pedicels slender, thickened, 0.5–1.5 cm long, glabrous to tomentose.

KEY TO THE SPECIES

1. Shoot apex with terminal buds covered with large green scales which resemble leaf-like under-sized foliage leaves, glabrous to hairy 2
1. Shoot apex with terminal buds perulate with imbricate scales or not, glabrous to hairy 5
2. Inflorescences cymose, terminal buds glabrous **4. *A. glomerata***
2. Inflorescences umbellate on short peduncles or fasciculate, terminal buds glabrous to tomentose 3
3. Petiole slender, glabrous, 1–2 cm long **11. *Actinodaphne* sp.1**
3. Petiole stout, glabrous or yellowish hairy, 2–5 cm long 4
4. Leaf-like scales of terminal buds narrowly elliptic-oblong, 4–5 cm long; leaf blade narrowly elliptic-oblong to narrowly lanceolate, 22–45 by 3–9 cm; petiole yellowish hairy, 2–4 cm long **9a. *A. sesquipedalis* var. *cambodiana***

4. Leaf-like scales of terminal buds ovate to elliptic, 2–4 cm long; leaf blade elliptic-oblongate, 30–60 by 9–18.5 cm; petiole glabrous, 3.5–5.5 cm long **9b. *A. sesquipedalis* var. *glabra***
5. Inflorescences umbellate; the umbels themselves arranged in a raceme 6
5. Inflorescences umbellate; the umbels on short peduncles or fasciculate 7
6. Petiole slender, glabrous to puberulous, 1–2 cm long; mature perianth tube deeply cup-shaped, margin entire, 3–4 mm in diam., glabrous inside; puberulous outside; bark smooth **6. *A. montana***
6. Petiole stout, puberulous to tomentose, 2–4 cm long; mature perianth tube shallowly cup-shaped, margin entire or undulate, 7–8 mm in diam., puberulous on both sides; bark furrowed **5. *A. henryi***
7. Tertiary veins finely reticulate; leaves subverticillate above, alternate below **8. *A. perglabra***
7. Tertiary veins scalariform or reticulate-scalariform; leaves verticillate or subverticillate 8
8. Fruit ellipsoid **10. *A. sikkimensis***
8. Fruit globose or subglobose 9
9. Inflorescences umbellate on short peduncles 10
9. Inflorescences fasciculate 11
10. Mature perianth tube deeply cup-shaped, 0.5–1 cm in diam.; inflorescence 6–7-flowered; petiole 0.5–1 cm long **3. *A. cupularis***
10. Mature perianth tube shallowly disc-shaped or undulate cup-shaped, 0.5–0.6 cm in diam.; inflorescence 7–8-flowered; petiole 1.6–1.8 cm long **7. *A. omeiensis***
11. Juvenile shoots whitish wooly; inflorescences borne along twigs between whorls of leaves; mature perianth tube shallowly cup-shaped, 7–8 mm in diam. **1. *A. amabilis***
11. Juvenile shoots rusty-tomentose; inflorescences axillary or on twigs between whorls of leaves; mature perianth tube small disc-shaped, 4–5 mm in diam. **2. *A. angustifolia***

1. *Actinodaphne amabilis* Kosterm. Phota Luang Kao, alt. 1,000 m, February, Nat. Hist. Bull. Siam Soc. 25(3–4): 29. fr., *Kerr* 16931 (holo K!; iso BM). 1974. Type: Thailand, Ranong, Khao

Small tree, *ca.* 10 m high. *Twigs* slender, juvenile shoots densely white woolly. *Terminal buds* perulate with imbricate scales, elliptic to ovate, 5–6 mm long, tomentose. *Leaves* verticillate of 4–5 leaves; blade elliptic-oblong to narrowly lanceolate, 9.5–19 by 2–3 cm; apex acute to acuminate; base cuneate to attenuate; margin entire; chartaceous, shining green above, densely white woolly when young, glabrous on both surfaces when mature, glaucous beneath; midrib raised on both surfaces, glabrous on both surfaces; secondary veins 6–10 pairs, at an angle of 45°–60° from the midrib, sunken above, raised beneath, arching and looping near margin; tertiary veins scalariform, obscure or slightly distinct on both surfaces. *Petiole* slender, 1–1.5 cm long, puberulous. *Inflorescences* fasciculate, minutely tomentose, 5–7 mm in diam., tomentose, borne along twigs between whorls of leaves, *Staminate flower* not seen. *Pistillate flower*: pedicels 2 mm long, whitish pilose; perianth lobes oblong-elliptic, 2–2.5 by 0.5–1 mm, glabrous inside, velutinous outside; ovary ellipsoid-ovoid, *ca.* 1 by 0.5 mm, glabrous, style stout, *ca.* 1 mm long, pilose at base, stigma peltate; staminodes 9, spatulate, 1 mm long, pilose at base. *Infructescences* each bearing 3–4 fruits. *Fruit* globose, 7–8 mm in diam.; apex apiculate; drying black; mature perianth tube shallowly cup-shaped, 7–8 mm in

diam., puberulous on both sides; pedicels slender, *ca.* 5 mm long, whitish pilose.

Thailand.— NORTH-EASTERN: Loei (Phu Kra Dueng National Park); PENINSULAR: Phangnga (Khao Phota Luang Kao).

Distribution.— Thailand.

Ecology.— Lower montane rainforest, alt. 1,000–1,300 m; flowering: November; fruiting: February.

Vernacular.— Tong Lat Khon Khao (ตองลาดชนขาว).

Note.— Description of this species was referred to Kostermans (1974).

Specimens examined.— *R. Geesink et al.* 7697 (BKF).

2. *Actinodaphne angustifolia* (Blume) Nees in Wallich, *Pl. As. Rar.* 3: 31. 1832.— *Litsea angustifolia* Blume, *Bijdr. Fl. Ned. Ind.* 11: 566. 1826. Type: not located. Fig. 1 A.

Small to medium-sized tree, 10–12 m high, dbh 10–15 cm. *Twigs* rough, juvenile shoot rusty-tomentose. *Bark* reddish brown with green patches, lenticels grey, inner bark brownish yellow. *Terminal buds* perulate with imbricate scales, elliptic-ovate, 4–7 mm, glabrous. *Leaves* verticillate of 3–6 leaves; blade elliptic-oblong, 9–25 by 2.3–5 cm; apex acute to acuminate; base cuneate; margin entire; chartaceous, shining green above, yellowish tomentose

when young, glabrous on both surfaces when mature, glaucous beneath; midrib flat or raised above, raised beneath, glabrous on both surfaces, secondary veins 7–10 pairs, at an angle of 50°–60° from the midrib, sunken above, raised beneath, arching and looping near margin, tertiary veins scalariform, obscure or slightly distinct above, distinct beneath. *Petiole* slender, 0.5–1.3 cm long, glabrous to puberulous. *Inflorescences* fasciculate, 1–1.7 cm in diam., axillary or borne along twigs between whorls of leaves. *Staminate flower*: pedicels 2–3 mm long, glabrous to puberulous; perianth lobes ovate-elliptic, 2–2.5 by 1.5–2 mm, glabrous inside, puberulous outside; stamens 9, anther ovate-elliptic, 0.8–1.2 mm long, filament 1–1.2 mm long, sparsely hairy. *Pistillate flower*: not seen. *Infructescences* each bearing 2–3 fruits. *Fruit* subglobose, 7–8 mm in diam.; drying dark red; mature perianth tube small disc-shaped, 4–5 mm in diam., puberulous both inside and outside; pedicels slender, 3–4 mm long, glabrous.

Thailand.— EASTERN: Nakhon Ratchasima (Khao Yai National Park); SOUTH-EASTERN: Rayong (Ban Phe), Chanthaburi (Trok Nong Waterfall Substation, Nam Tok Phlio National Park), Trat (Chang Kluea); PENINSULAR: Ranong (Khao Phota Laung Kaeo), Krabi

(Dan Chumpon), Trang (Khao Chong), Yala (Banang-Sata), Narathiwat (Hala-Bala Wildlife Sanctuary).

Distribution.— India, Malay Peninsula, Java.

Ecology.— Mixed deciduous and dry evergreen forests, alt. 450–700 m; flowering: November; fruiting: February.

Vernacular.— Ka that (กาทัด) (Rayong), Ka thit nu (กาทิดหนู) (Trat), Rom Khao (ร่มเช้า) (Ranong).

Specimens examined.— *A.F.G. Kerr* 16372 (BK), 17676 (BK), 18334 (BK); *Put* 2747 (BK, K); *M. Tanaros* 5 (BKF), 8 (BKF), 9 (BKF).

3. *Actinodaphne cupularis* (Hemsl.) Gamble in Sargent, Pl. Wilson. 2: 75. 1914.—*Litsea cupularis* Hemsl., J. Linn. Soc. 26: 380. 1891. Type: not located.

Small to medium-sized tree, 3–12 m high. *Twigs* slender, juvenile shoot puberulent. *Terminal buds* perulate with imbricate scales, elliptic to lanceolate, 1.5–2 cm long, puberulous. *Leaves* subverticillate of 5–6 leaves, blade elliptic, 8.5–19 by 2–5 cm; apex acute; base cuneate; margin entire; chartaceous or thinly coriaceous, shining green above, glabrous or puberulent beneath when young, glabrous on both surfaces when mature, glaucous beneath; midrib sunken above, raised beneath, glabrous on both surfaces, secondary veins 6–12 pairs, at

an angle of 45°–60° from the midrib, flat above, raised beneath, arching and looping near margin, tertiary veins scalariform to reticulate, obscure or slightly distinct above, distinct beneath. *Petiole* slender, 0.5–1 cm long, glabrous to puberulous. *Inflorescences* umbellate on short peduncles, 1–1.5 cm in diam., densely tomentose, with 6–7 flowers per umbel, axillary and borne along twigs between whorls of leaves. *Staminate flower*: pedicels 3–4 mm long, yellowish tomentose; perianth lobes elliptic, 2.8–3.5 by 0.5–1.5 mm, glabrous inside, velutinous outside; stamens 9, anther oblong, 1–1.5 mm long, filament 4–5.5 mm long, villous at base. *Pistillate flower*: pedicels 3–4 mm long, yellowish tomentose; perianth lobes elliptic, 2.8–3.5 by 0.5–1.5 mm, glabrous inside, velutinous outside; ovary ovoid, ca. 1 by 0.5 mm, glabrous, style slender 1 mm long, glabrous, stigma peltate; staminodes 9, linear, 1–1.5 mm long, glabrous. *Infructescences* each bearing 1–3 fruits. *Fruit* globose, 1.2–1.4 cm in diam.; apex apiculate; red when mature, drying dark red; mature perianth tube deeply cup-shaped, 0.5–1 cm in diam., glabrous inside, velutinous outside; pedicels slender, 0.7–1.5 cm long, velutinous.

Thailand.— NORTHERN: Chiang Mai (Doi Chiang Dao Wildlife Sanctuary), NORTH-EASTERN: Loei (Phu Kra

Dueng National Park), EASTERN: Nakhon Ratchasima (Khao Laem).

Distribution.— China (Yunnan).

Ecology.— Lower montane rainforest, alt. 1,300–1,500 m; flowering: October–November; fruiting: August–September.

Vernacular.— Tong Lat Doi Chiang Dao (ตองลาดดอยเชียงดาว).

Uses.— Seeds contain oils which are used for making lubricant. The roots and leaves are used as folk medicine for curing ‘Hong Kong foot’, burns and piles.

Specimens examined.— *C.F. Beusekom et al.* 9621 (BKF); *A.F.G. Kerr* 5566 (K), 9947 (K); *T. Smitinand & C. Phengklai* 11567 (BKF); *J.E. Vidal* 5202 (BKF).

4. *Actinodaphne glomerata* (Blume) Nees, Syst. Laur. 597. 1836.— *Laurus glomerata* Blume, Cat. Gew. Buitenzorg (Blume): 66. 1823 (*in adnot.*). Type: not located.

Small to medium-sized tree, 10–18 m high. *Twigs* slender, juvenile shoot reddish minutely pubescent. *Bark* smooth, lenticillate, dark grey. *Terminal buds* covered with large green leaf-like scales which resemble under-sized foliage leaves, elliptic-ovate, 1–2.5 cm long, glabrous. *Leaves* verticillate of 4–7 leaves; blade ovate-obovate, 13–28 by 5.5–14 cm; apex cuspidate; base oblique; margin entire; coriaceous, dark green above, reddish minutely pubescent when young, glabrous on both surfaces when

mature, glaucous beneath; midrib raised on both surfaces, glabrous above, minutely pubescent beneath, secondary veins 11–13 pairs, at an angle of 30°–40° from the midrib, raised on both surfaces, arching and looping near margin, tertiary veins scalariform, distinct on both surfaces. *Petiole* slender, 1–2 (–3) cm long, glabrous to pubescent. *Inflorescences* cymose, 1–2 cm in diam., borne along twigs between whorls of leaves, peduncle 5–7 mm long, minutely pubescent. *Staminate flower*: pedicels 3–5 mm long, pubescent; perianth lobes elliptic-ovate, 2.5–3 by 2 mm, glabrous inside, velutinous outside; stamens 9, anther ovate-elliptic, 1–1.3 mm long, filament 0.3–0.5 mm long, yellow reddish villous at base. *Pistillate flower* not seen. *Infructescences* not seen.

Thailand.— PENINSULAR: Ranong.

Distribution.— India, Malay Peninsula, Java, Sumatra.

Ecology.— Tropical to lower montane rainforests, alt. 600–1,000 m; flowering: September.

Vernacular.— Tong Lat Bai Kai Klab (ตองลาดใบไขก๊ลับ).

Specimens examined.— *A. Cuadra* A1309 (BKF); *N. Fukuoka et al.* T-35912 (BKF).

5. *Actinodaphne henryi* Gamble, Bull. Misc. Inform., Kew 1913: 265. 1913. Type: not located. Fig. 1 B–E.

Small to medium-sized tree, 10–20 m high, dbh 15–19 cm. *Twigs* thick, glabrous to pubescent or tomentose, juvenile shoot densely yellowish tomentose. *Bark* furrowed, greyish to brownish, inner bark yellowish. *Terminal buds* perulate with imbricate scales, oblong, 2–3.5 cm long, tomentose. *Leaves* subverticillate of 4–6 leaves; blade elliptic-lanceolate, 22–29 (–40) by 5.5–7.5 (–10) cm; apex acute to acuminate; base cuneate or oblique; margin entire; coriaceous, dull dark green above, densely yellowish tomentose when young, glabrous on both surfaces when mature, greyish silvery glaucous beneath; midrib raised on both surfaces, glabrous to puberulous on both surfaces, secondary veins 9–12 pairs, at an angle of 40°–60° from the midrib, raised on both surfaces, arching and looping near margin, tertiary veins scalariform, slightly distinct above, finely distinct beneath. *Petiole* stout, 2–4 cm long, puberulous to tomentose. *Inflorescences* umbellate arranged in raceme, borne along twigs between whorls of leaves, with 5 flowers per umbel, peduncle of each umbel 0.7–1 cm long, pubescent. *Staminate flower*: pedicels 2–2.5 mm long, yellowish tomentose; perianth lobes elliptic, 2–2.5 by 0.8–1 cm, glabrous inside, velutinous outside; stamens 9, anther oblong, 1.3–1.5 mm long, filament 3.5–4 mm long, villous. *Pistillate flower*: pedicels 2–2.5 mm long,

yellowish tomentose; perianth lobes 6, elliptic, 2–2.5 by 0.8–1 cm, glabrous inside, velutinous outside; ovary ellipsoid to ovoid, *ca.* 1 by 0.5 mm, glabrous, style stout, 0.3–0.5 mm long, glabrous, stigma peltate; staminodes 9, spatulate, 1 mm long. *Infructescences* each bearing 1–3 fruits. *Fruit* globose, 0.8–1 cm in diam., young fruit greenish with white dots, red when mature, drying dark red, mature perianth tube shallowly cup-shaped, margin entire or undulate, 7–8 mm in diam., puberulous on both sides; pedicels slender, 5–7 mm long, pubescent.

Thailand.— NORTHERN: Chiang Mai (Doi Suthep-Pui National Park, Doi Inthanon National Park), Chiang Rai (Doi Aung Kha), Nan (Doi Phuaka National Park), Lampang (Chae Son National Park, Doi Khun Tan National Park), Sukhothai (Khao Luang), Phitsanulok (Phu Hin Rong Kla National Park, Thung Salaeng Luang National Park); EASTERN: Nakhon Ratchasima (Khao Laem, Khao Yai National Park); SOUTH-WESTERN: Uthai Thani (Huai Kha Khaeng Wildlife Sanctuary), Kanchanaburi (Tinuang Forest Protection Units, Thung Yai Naresuan Wildlife Sanctuary); SOUTH-EASTERN: Chon Buri (Khao Khiao).

Distribution.— China (Yunnan).

Ecology.— Lower montane forest, alt. 600–1,300 m; flowering: December–February; fruiting: July–August.

Vernacular.— Tong Lat (ตองลาด) (Chiang Mai), Ta thip thong (ต่าตีบทอง) (Nakhon Ratchasima), Saen ta kla yai (แสนตะกละใหญ่) (Sukhothai).

Uses.— The wood is used for construction, furniture and industrial timber.

Specimens examined.— *K. Iwatsuki & N. Fukuoka* T-3967 (BKF); *A.F.G. Kerr* 1643 (K), 5374 (BK), 5931 (BK, BKF); *J.F. Maxwell* 75–1117 (BK), 88–112 (BKF), 93–1557 (BKF), 96–657 (BKF); *Put* 3517 (BK, BKF); *T. Smitinand* 2128 (BKF); *S. Sutheesorn* 1529 (BK); *Th. Sørensen et al.* 3066 (BKF), 3531 (BKF), 6619 (BKF); *M. Tanaros* 3 (BKF), 26 (BKF), 27 (BKF); *P. Thongson* 77 (QBG).

6. *Actinodaphne montana* Gamble, Bull. Misc. Inform., Kew 1910: 312. 1910. Type: not located. Fig. 1 F–G.

Medium-sized tree, 15–20 m high, dbh 20–30 cm. *Twigs* slender. *Bark* smooth, lenticillate, greyish brown, inner bark yellowish orange. *Terminal buds* perulate with imbricate scales, elliptic, *ca.* 8 mm, tomentose. *Leaves* verticillate of 4–5 leaves; blade oblanceolate-elliptic, 11–19 by 4.5–6.5 cm; apex acuminate to caudate; base cuneate; margin entire; thinly coriaceous, bluish green above, glabrous on both surfaces, glaucous beneath; midrib raised or flat above, raised beneath, glabrous on both surfaces, secondary veins 7–10 pairs, at an angle

of 40°–50° from the midrib, flat or sunken above, raised beneath, arching and looping near margin, tertiary veins scalariform, obscure or slightly distinct above, finely distinct beneath. *Petiole* slender 1–2 cm long, glabrous to puberulous. *Inflorescences* umbellate arranged in raceme. *Infructescences* each bearing 1–3 fruits, axillary or borne along twigs between whorls of leaves. *Fruit* subglobose, 4–5 mm in diam.; young fruit green with white dots, drying dark red black; mature perianth tube deeply cup-shaped, 3–4 mm in diam., glabrous inside, puberulous outside; pedicels thicken, 0.7–1.5 cm long, puberulous.

Thailand.—PENINSULAR: Nakhon Si Thammarat (Khao Nan), Phatthalung, Yala (Betong), Narathiwat (Bachaow).

Distribution.— Malay Peninsula.

Ecology.— Lower montane rainforest, rarely on lowlands, alt. 600–1,500 m; fruiting: July.

Vernacular.— Mae-dae-si-ka (แมดแดะสีกะ) (Malay-Pattani).

Note.— Description of this species was based on Kochummen (1989).

Specimens examined.— *A.F.G. Kerr* 7206 (BK, K); *M. Tanaros* 10 (BKF), 29 (BKF), 32 (BKF).

7. *Actinodaphne omeiensis* (H. Liu) C.K. Allen, *Ann. Missouri Bot. Gard.* 25: 411. 1938.— *A. reticulata* Meisn. var. *omeiensis* H. Liu, *Laur. Chine et Indoch.*:

158. 1932. Type: not located.

Small tree, 3–5 m high. *Twigs* villous when young and becoming glabrous. *Terminal buds* perulate with imbricate scales, elliptic, 1.1–2.2 cm long, glabrous to tomentose. *Leaves* subverticillate of 4–6 leaves, blade oblong to lanceolate, 12–16 (–27) by 2–4 (–6) cm; apex acute to acuminate; base cuneate to oblique; margin entire; thinly coriaceous, shining green above, glabrous on both surfaces, silvery glaucous beneath; midrib raised on both surfaces, secondary veins 9–12 (–15) pairs, at an angle of 55°–60° from the midrib, sunken above, raised beneath, arching and looping near margin, tertiary veins scalariform to indistinct reticulate, obscure on both surfaces. *Petiole* slender, 1.6–1.8 cm long, glabrous. *Inflorescences* umbellate on short peduncles, with 7–8 flowers per umbel. *Staminate flower*: pedicels *ca.* 5 mm long; perianth lobes pubescent outside; stamens 9, filament *ca.* 4 mm long, villous. *Pistillate flower* not seen. *Infructescences* each bearing 1–3 fruits. *Fruit* subglobose, 1.2 cm in diam.; mature perianth tube shallowly disc-shaped or cup-shaped, margin entire or undulate, 5–6 mm in diam., puberulous inside, glabrous to puberulous outside; pedicels thick, 6–7 mm long, glabrous to puberulous.

Thailand.— SOUTH-WESTERN: Prachuap Kiri Khan (Khao Luang).

Distribution.— China.

Ecology.— Lower montane rainforest, alt. 500–1,700 m; flowering: February–March; fruiting: July–September.

Note.— Description of this species was based on Li *et al.* (2008).

Vernacular.— Tong Lat Bai Kahnan (ตองลาดไບขหนาน).

Specimens examined.— *A.F.G. Kerr* 10994 (BK), 11011 (BK).

8. *Actinodaphne perglabra* Kosterm., Nat. Hist. Bull. Siam Soc. 25(3–4): 30. 1974. Type: Thailand, Nakhon Ratchasima, Lat Bua Khao, November, buds, *Put* 4323 (holo K!).

Tree, glabrous. *Twigs* rough, slender. *Terminal buds* not seen. *Leaves* subverticillate of 4 leaves or alternate, blade oblong-elliptic, 7–13 by 2.3–3.5 cm; apex acute to acuminate; base cuneate; margin entire; chartaceous, green polished above, glabrous on both surfaces, glaucous beneath; midrib raised or flat above, raised beneath, puberulous on both surfaces, secondary veins 6–7 pairs, thread-like, at an angle of 30°–40° from the midrib, raised on both surfaces, slightly distinct, arching and looping near margin, tertiary veins finely reticulate, distinct on both surfaces. *Petiole* slender, 3–5 mm long, glabrous. *Inflorescences* fasciculate or umbellate, peduncle near to internode solitary or short branchlet.

Staminate flower not seen. *Pistillate flower*: pedicels 0.3–0.5 mm long; perianth lobes ovate-elliptic, 1–1.5 by 0.5–0.7 mm, glabrous inside, glabrous to pilose outside; ovary ellipsoid, 0.5–1 by 0.3–0.5 mm, glabrous, style thick, 1 mm long, glabrous, stigma peltate; staminode not seen. *Infructescences* not seen.

Thailand.— EASTERN: Nakhon Ratchasima (Lat Bua Khao).

Distribution.— Thailand.

Ecology.— Dry evergreen forest, elevation not known; flowering: November.

Vernacular.— Tong Lat Bai Kliang (ตองลาดไບเกลี้ยง).

Note.— Description of this species was based on Kostermans (1974).

Specimens examined.— *Put* 4308 (K).

9. *Actinodaphne sesquipetalis* (Wall. ex Kuntze) Hook.f. & Thoms. ex Meisn. in DC., Prodr. 15(1): 216. 1864.— *Luarus sesquipetalis* Wall. ex Kuntze, Rev. Gen. Pl. 2: 570. 1891. Type: not located.

a. var. *cambodiana* Lecomte, Nouv. Arch. Mus. Hist. Nat. Paris, sér. V. 5: 93. 1913. Type: Cambodia, *L. Pierre* 627 (holo P). Figs. 1 H–I, 2 A–B.

Small to medium-sized tree, 10–20 m high, dbh 8–15 m. *Twigs* thick, glabrous to puberulous, juvenile shoot yellowish hairy. *Bark* smooth, dark

brown to black, inner bark orange to yellowish, buttress root *ca.* 1 m. *Terminal buds* covered with large green leaf-like scales which resemble under-sized foliage leaves, narrowly elliptic-oblong, 4–5 cm, glabrous to puberulous. *Leaves* subverticillate of 6–10 leaves; blade narrowly elliptic-oblong to narrowly lanceolate, 22–45 by 3–9 cm; apex acute; base cuneate; margin entire; coriaceous, shining green above, yellowish velutinous when young, glabrous on both surfaces when mature, glaucous beneath; midrib thick, raised on both surfaces, puberulous on both surfaces, secondary veins 9–12 pairs, at an angle of 35°–40° from the midrib, raised on both surfaces, arching and looping near margin, tertiary veins scalariform, slightly distinct above, distinct beneath. *Petiole* stout, 2–4 cm long, yellowish hairy. *Inflorescences* umbellate on short peduncles, 2–2.5 cm in diam., borne along twigs between whorls of leaves, peduncle 7–8 mm long, densely tomentose. *Staminate flower*: pedicels 3 mm long, tomentose; perianth lobes elliptic to ovate, 5–6 by 3–3.5 mm, glabrous inside, tomentose outside; stamens 9, anther oblong, 2–2.5 mm long, filament 7–7.2 mm, villous at middle. *Pistillate flower*: pedicels 3 mm long, tomentose; perianth lobes elliptic to ovate, 5–6 by 3–3.5 mm, glabrous inside, tomentose outside; ovary ovoid, *ca.* 1 by 1 mm, densely hairy, style stout, 0.2–0.3

mm long, densely hairy, stigma peltate; staminodes 9, elliptic to spatulate, 1–1.5 mm long, yellowish hairy at base. *Infructescences* each bearing 2–4 fruits. *Fruit* globose, 1.5–2 cm in diam.; apex apiculate; young fruit green with white dots, mature fruit dark purple to black; mature perianth tube shallowly cup-shaped, 1 cm in diam., velutinous inside; glabrous outside; pedicels thick, 3–5 mm long, tomentose.

Thailand.— SOUTH-EASTERN: Chanthaburi (Chang Sae Waterfall Ranger Station), Trat (Mu Ko Chang National Park).

Distribution.— Cambodia.

Ecology.— Tropical rainforest to dry evergreen forest, alt. 100–400 m; flowering: June–July; fruiting: January–April.

Vernacular.— Tong Lat Bai Yao (ตองลาดไผ่ขาว).

Specimens examined.— *A.F.G. Kerr* 17766 (BKF); *M. Tanaros* 1 (BKF), 2 (BKF), 22 (BKF).

b. var. *glabra* Kochummen, Gard. Bull. Singapore 43: 23. 1992. Type: not located. Fig. 2 C–E.

Small to medium-sized tree, 10–12 m high, dbh 10–15 cm. *Twigs* thick, glabrous to pubescent, juvenile shoot yellowish pubescent. *Bark* smooth, dark brown or black, inner bark yellowish.

Terminal buds covered with large green leaf-like scales which resemble under-sized foliage leaves, ovate to elliptic, 2–4 cm, glabrous to pubescent. *Leaves* subverticillate of 5–8 leaves; blade elliptic-oblongate, 30–60 by 9–18.5 cm; apex cuspidate; base cuneate to oblique; margin entire; coriaceous, shining green above, glabrous to yellowish pubescent when young, glabrous on both surfaces when mature, glaucous beneath; midrib thick, raised on both surfaces, glabrous on both surfaces, secondary veins 12–16 pairs, at an angle of 40°–60° from the midrib, raised on both surfaces, arching and looping near margin, tertiary veins scalariform, slightly distinct above, distinct beneath. *Petiole* stout, 3.5–5.5 cm long, glabrous. *Inflorescences* fasciculate, 0.8–1 cm in diam., borne along twigs between whorls of leaves. *Staminate flower* not seen. *Pistillate flower*: pedicels 0.5–1 mm long, tomentose; perianth lobes 6, ovate, 2.6–2.8 by 2–2.5 mm, glabrous inside, tomentose outside; ovary ovoid, ca. 0.6 by 0.6 mm, glabrous, style stout, 0.5 mm long, glabrous, stigma peltate, 4-lobed; staminodes 9, elliptic to spatulate, 0.5–0.7 mm long, pilose at base. *Infructescences* each bearing 1–3 fruits. *Fruit* globose, 1–1.2 cm in diam.; apex apiculate; young fruit green with white dots, mature fruit dark purple to black; mature perianth tube shallowly cup-shaped, 7–8 mm in diam., glabrous

on both sides; pedicels thick 4–5 mm long, glabrous.

Thailand.—PENINSULAR: Ranong (Khao Phota Luang Kaeo), Trang (Khao Chong), Yala (Banang-Sta), Narathiwat (Hala-Bala Wildlife Sanctuary).

Distribution.—Malay Peninsula.

Ecology.—Tropical rainforest to dry evergreen forest, alt. 100–400 m; flowering: June–July; fruiting: July–August.

Vernacular.—Kan Rom (กำรรม) (Narathiwat).

Specimens examined.—*A.F.G. Kerr* 7327 (BKF); *K. Larsen & S.S. Larsen* 33591 (BKF); *B. Nimanong & S.P.* 1625 (BKF); *S. Phusomsaeng et al.* 1528 (BKF); *T. Santisuk* 1185 (BKF); *M. Tanaros* 16 (BKF).

10. *Actinodaphne sikkimensis* Meisn. in DC., Prodr. 15(1): 213. 1864. Type: not located. Fig. 2 F–H.

Small to medium-sized tree, 6–20 m high, dbh 20–30 cm. *Twigs* slender, juvenile shoot pubescent. *Bark* grey to brown, cracking, inner bark yellowish brown. *Terminal buds* perulate with imbricate scales, elliptic-oblongate, 0.8–1 cm long, velutinous. *Leaves* subverticillate of 4–6 leaves; blade lanceolate-elliptic, 10–14 by 2–4 cm; apex acuminate to caudate; base cuneate; margin entire; chartaceous, greenish and

almost shining above, velutinous when young, glabrous on both surfaces sometimes puberulous beneath when mature, glaucous beneath; midrib sunken above, raised beneath, puberulous on both surfaces, secondary veins 8–12 pairs, at an angle of 30°–50° from the midrib, raised on both surfaces, arching and looping near margin, tertiary veins reticulate-scalariform, slightly distinct above, distinct beneath. *Petiole* slender, 0.5–1 cm long, puberulous. *Inflorescences* fasciculate, 0.6–1.2 cm in diam., axillary or borne along twigs between whorls of leaves. *Staminate flower*: pedicels 3 mm long, velutinous; perianth lobes elliptic-oblong, 3–3.2 by 1–1.2 mm, glabrous inside, velutinous outside, stamens 9 (–10), anther oblong, 2 mm long, filament 4 mm long, villous. *Pistillate flower*: pedicels 3 mm long, velutinous; perianth lobes elliptic-oblong, 3–3.2 by 1–1.2 mm, glabrous inside, velutinous outside; ovary ovoid, ca. 1 by 1 mm, glabrous, style slender, 0.5–1 mm long, glabrous, stigma peltate; staminodes 9 (–10), 3-lobed, 2 mm long, glabrous. *Infructescences* each bearing 1–5 fruits. *Fruit* ellipsoid, 7–8 mm in diam.; apex apiculate; young fruits green, mature fruits red, drying black; mature perianth tube shallowly cup-shaped, 7–8 mm in diam., glabrous on both sides; pedicels thick, 0.7–1.5 cm long, puberulous.

Thailand.— NORTHERN: Nan (Doi Phuoka National Park), Phitsanulok (Phu Hin Rong Kla National Park); NORTH-EASTERN: Loei (Phu Luang Wildlife Sanctuary, Phu Kra Dueng National Park).

Distribution.— India (Sikkim).

Ecology.— Lower montane forest, near streamside, alt. 1,000–1,400 m; flowering: November–January; fruiting: March–July.

Vernacular.— Tong Lat Sikkim (ตองลาดสีกขิม).

Specimens examined.— *L.B., E.C. Abbe & T. Smitinand* 9428 (BKF, K); *P. Srisanga et al.* 2278 (QBG); *M. Tanaros* 7 (BKF), 18 (BKF), 20 (BKF), 31 (BKF).

11. *Actinodaphne* sp.1. Fig. 2 I.

Medium-sized tree, ca. 18 m high, dbh 30 cm. *Twigs* slender, juvenile shoots densely pale brown tomentose. *Terminal buds* covered with large green leaf-like scales which resemble under-sized foliage leaves, narrowly lanceolate to narrowly elliptic, 0.7–1.3 cm, tomentose. *Leaves* subverticillate of 5–7 leaves, blade lanceolate-elliptic to oblanceolate, 10–16.5 by 3.5–5 cm; apex acute; base cuneate-oblique; margin entire; thinly coriaceous, shining green above, puberulous beneath when young, glabrous on both surfaces when mature, glaucous beneath, midrib raised above, sunken beneath, glabrous on both surfaces, secondary veins 6–10 pairs, at an angle

of 50°–60° from the midrib, sunken above, arching and looping near margin, tertiary veins reticulate-scalariform, obscure or slightly distinct on both surfaces. *Petiole* slender, 1–2 cm long, glabrous. *Inflorescences* umbellate on short peduncles, borne along twigs between whorls of leaves, peduncle 5–7 mm long, velutinous. *Staminate flower* not seen. *Pistillate flower*: pedicels 3–4 mm long, velutinous, perianth lobes elliptic, 2.5–3 by 1.5–2 cm, glabrous inside, velutinous outside, ovary ovoid, *ca.* 1 by 1 mm, villous, style thick, 0.5–1 mm long, villous, stigma peltate, 4-lobed; staminodes 9, spatulate, 1–1.3 mm long, glabrous to pilose at base. *Infructescences* each bearing 1–3 fruits. *Fruit* globose, 2 mm in diam., young fruit green, mature fruit red; mature perianth tube deeply cup-shaped, 3 mm in diam., glabrous inside, pubescent outside; pedicels slender, 5–7 mm long, velutinous.

Thailand.— PENINSULAR: Krabi (Khao Phanom Benja National Park).

Distribution.— Thailand.

Ecology.— Lower montane rainforest, alt. 500–900 m; flowering: April; fruiting: June.

Vernacular.— Tong Lat Phanom Benja (ตองลาดพนมเบญจา).

Note.—*Actinodaphne* sp. cannot be placed within any existing species due a lack of data and incomplete specimens.

It is found at Khao Phanom Bencha National Park, Krabi Province. It has a unique characteristic, which do not match any descriptions of existing species. Further studies are needed and this species might be a new species to science.

Specimen examined.— *M. Tanaros* 21(BKF).

ACKNOWLEDGEMENTS

Our fieldwork was supported by TRF/BIOTEC Special Program for Biodiversity and Training grants BRT R_146008 (Study on Thai Lauraceae: Taxonomy Distribution and Economic Uses headed by Dr. Kongkanda Chayamarit).

REFERENCES

- Julia, S. 2005. A synopsis of the genus *Actinodaphne* Nees (Lauraceae) in Sabah and Sarawak, Malaysia. **Gardens' Bulletin Singapore** 57: 69–100.
- Kochummen, K.M. 1989. Lauraceae. In: **Tree Flora of Malaya**. F.P.S. Ng (Ed.), Vol. 4, pp. 98–178. Longman, Kuala Lumpur.
- Kostermans, A.J.G.H. 1957. Lauraceae. **Communication (Pengumuman) of the Forest Research Institute** 57: 1–64.
- _____. 1974. New species and combination of Lauraceae from Thailand. **Natural History Bulletin of the Siam Society** 25: 29–44.
- Li, S., Li, X.-W., Li, J., Huang, P., Wei, F.-N., Cui, H. & van der Werff, H. 2008. Lauraceae. In: **Flora of China**. Z. Y. Wu, P. H. Raven

& D. Y. Hong (Eds.), Vol. 7, p. 163. Science Press, Beijing and Missouri Botanical Garden Press, St. Louis.

Rohwer, J.G. 1993. Lauraceae. In: **The Families and Genera of Vascular Plants**. K. Kubitzki (Ed.), Vol. 2, p. 388. Springer, Heidelberg.

The Forest Herbarium, Royal Forest Department. 2001. **Thai Plant Names Tem Smitinand**, Revised Edition. Prachachon Co. Ltd., Bangkok.

van der Werff, H. 2001. An annotated key to the genera of Lauraceae in the Flora Malesiana Region. **Blumea** 46: 152–140.



FIGURE 1. A. *Actinodaphne angustifolia*, B.–E. *A. henryi*, F.–G. *A. montana*, H.–I. *A. sesquipedalis* var. *cambodiana*.



FIGURE 2. A.–B. *Actinodaphne sesquipedalis* var. *cambodiana*, C.–E. *A. sesquipedalis* var. *glabra*, F.–H. *A. sikkimensis*, I. *Actinodaphne* sp.1.

Morphological and molecular characterization of *Fusarium* spp., the fungi associated with mulberry root rot disease in north-eastern Thailand

WARAPORN SUTTHISA¹, NIWAT SANOAMUANG^{1,2*} AND SARIDIPORN CHUPRAYOON³

¹ Plant Pathology Division, Department of Plant Science and Agricultural Resources, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

² Applied Taxonomic Research Center, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

³ The Sirikit Institute of Sericulture, Ministry of Agriculture and Cooperative, Bangkok, Thailand

ABSTRACT. This study was conducted to isolate and identify *Fusarium* spp. the associated causal agents of mulberry root rot disease. One hundred and fifty-seven isolates of *Fusarium* spp. were obtained from 5 mulberry plantations during 2007 to 2008. All species were identified morphologically with particular emphasis on macroconidia, microconidia, the size and types of conidiophores, and the presence or absence of chlamydospores. The species associated with mulberry roots and surrounding rhizosphere were identified to 11 species including 102 isolates of *Fusarium solani*, 26 of *F. moniliforme*, 16 of *F. oxysporum*, 3 each of *F. phaseoli* and *F. dlamini*, 2 of *F. culmorum*, 1 each of *F. dimerum*, *F. graminearum*, *F. beomiforme*, *F. scirpi* and *F. anthophilum*. Genetic variation of 30 isolates of *Fusarium* spp. was studied using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. Four primers A02, A03, A07 and A09 produced fingerprint profiles, which clearly distinguished between the different species of *Fusarium* spp. The high level of genetic variability among species of *Fusarium* allowed fingerprinting of most of the isolates by examining patterns produced by several primers. The results suggest that RAPD-PCR is a useful method for analyzing genetic variation within and between *Fusarium* spp.

Keywords: *Fusarium* spp., mulberry root rot, RAPD

* Corresponding author: niwat@kku.ac.th

INTRODUCTION

Root rot disease is considered to be the most destructive disease of mulberry (*Morus alba* L.) in the northeast of Thailand. The disease can be found wherever the plant is grown and direct losses on the crop due to the disease can reach 100% (Sanoamuang & Saksirirat, 1984). The indirect loss on the sericulture production is very large and therefore the economic importance of these diseases should never be underestimated. The disease was first reported in 1954. Since then its etiology has been extensively studied (Sanoamuang & Saksirirat, 1984; Winidsanan, 1987; Chancharean, 1990; Yamakawa *et al.*, 1991; Chuprayoon *et al.*, 1994; Thaworn-anukulkid, 1996; Saksung *et al.*, 1997; Kaosiri, 1998). Symptoms of the disease appear as sudden leaf withering starting from the bottom of the branch upwards, followed by defoliation in isolated patches in the plantation. The bark of the roots peels off easily with a particular odour and the plants suddenly die. Through irrigation water, soil and garden implements, the disease spreads quickly to nearby mulberry trees both in the same row and the adjacent rows where the root zones are in overlapping proximity (Sanoamuang & Saksirirat, 1984; The Hindu, 2004). Sanoamuang *et al.* (1986) reported that *Fusarium solani* f.sp. *mori* was always

found associated with the mulberry roots in both healthy and diseased trees collected from all sericulture experiment stations in the northeastern of Thailand.

The genus *Fusarium* has a worldwide distribution. Its different species are considered to be some of the most important plant disease pathogens (Nelson *et al.*, 1983). Summerell *et al.* (2003) reported that a utilitarian approach to *Fusarium* identification including morphological, biological and phylogenetical species concepts. In general, morphological species concepts are based on the similarity of observable morphological characters, *e.g.* spore size and shape. Biological species concepts required that members of the same species are sexually cross-fertile and that the progeny of the crosses are both viable and fertile. Finally, DNA sequences have been used to generate characters that usually are treated cladistically to form phylogenies.

A molecular approach using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers as a diagnostic tool for the identification of *Fusarium* spp. has been reported (Achenbach *et al.*, 1996). RAPD analysis has many advantages as a mean of characterizing genetic variability such as speed, low cost, minimal requirement for DNA, and lack of radioactivity. Major polymorphisms

in RAPD pattern indicate genetic distinctness and can be used to distinguish unrelated groups. Minor polymorphisms may indicate genetic distinctness within groups or may occur because of experimental variability and therefore, must be verified by repetition (Nelson *et al.*, 1997). The purpose of this study was to isolate and identify *Fusarium* spp., the causal agent associated with mulberry root rot disease in northeastern Thailand using morphological characteristics and RAPD pattern analysis.

MATERIALS AND METHODS

Isolation of fungi

Root and soil around the rhizosphere of mulberry trees exhibiting or not exhibiting symptoms of root rot were used to isolate associated pathogens. Mulberry roots and soil were collected at fields in five different areas of northeastern Thailand in June 2007 to February 2008: Silk innovation center (Mahasarakham University, 7 June 2007), Ban Kwao-Yai (Kantarawichai District, Mahasarakham Province, 24 June 2007), Ban Kee (Cheangyuen District, Mahasarakham Province, 14 July 2007), Ban Wan-fai (Art-Sahmaht District, Roi-et Province, 6 October 2007) and Khon-Kaen University (1 February 2008).

The roots were cut from 5 infected and 5 non-infected plants and the root tissues were washed in running tap water, cut into pieces approximately 3 to 5 mm long. They were surface disinfected in 0.6% sodium hypochlorite for 5 min, rinsed twice in sterile distilled water, blotted dry on sterile filter paper, and then plated on potato dextrose agar (PDA, Merck Laboratories, Germany) added 100 mg/L rifampicin in 9 cm diameter Petri dishes. The dishes with tiny pieces of mulberry root were incubated at 28 °C and they were examined periodically after 3-5 days. Emerging fungal mycelia were transferred onto new PDA plates.

Soil samples were collected from the stem base to a depth of 15 cm 3 points around the plant (100 g per plant) and 5 plants per infected and non-infected field. In order to assay the organisms in the soil, each sample from infected field or non-infected fields were thoroughly mixed and 10 g of each mixed sample was transferred to 90 ml of de-ionized distilled water in a 250 ml Erlenmeyer flask. The flasks were agitated on a rotary shaker for 30 min and 10-fold dilutions were made serially from the original suspension. From each of the dilution, 100 µl aliquot was spread over the surface of rose bengal agar in a 9 cm diameter Petri dish. There were 3 plates per dilution, and all plates were incubated at 28 °C for 3 days.

Emerging colonies were cut and transferred individually onto new PDA plates.

Identification of isolates

All single spore cultures of *Fusarium* isolates were identified after Booth (1977), Nelson *et al.* (1994), Seifert (1996) and Aoki *et al.* (2003). After the isolates were grown on PDA for 10 days, colony growth and spore morphology and size were characterized. Slide culture technique was used to observe detailed morphological structures of taxonomic value based on the form of macroconidia and microconidia produced on monophialides or polyphialides (Rodrigues & Menezes, 2005). All single spore isolation cultures were freeze-dried and kept in a refrigerator.

Genomic DNA extraction

Isolates were grown in potato dextrose broth (PDB) for 7 days at 28 °C on a shaker at 120 rpm. Mycelia were harvested by filtration through filter paper (Whatman No.1) and freeze-dried for 24 hr. Total DNA extraction was prepared by a modified method of Zang *et al.* (2005). Approximately 50 mg of freeze-dried mycelium was grounded in liquid nitrogen. The resulting powder was suspended in 0.7 ml of lysis buffer (400

mM Tris-HCl (pH 8.0), 60mM EDTA (pH 8.0), 150 mM NaCl, 1% SDS) and 3 µl of 2-mercaptoethanol. Samples were incubated at 65 °C for 30 min and 150 µl of potassium acetate (pH 4.8) was added and mixed gently. This mixture was centrifuged for 5 min at 12,000 rpm. The aqueous phase was collected, extracted with an equal volume of chloroform : isoamyl alcohol (24:1) mixed gently and centrifuged for 5 min at 12,000 rpm. The aqueous phase was collected and DNA was then precipitated by adding with an equal volume of cold isopropanol, incubated at -20 °C for 30 min and pelleted by centrifugation for 5 min at 12,000 rpm. The DNA pellet was washed with 70% cold ethanol, air dried and resuspended in 50 µl of TE buffer (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 8.0). RNA was degraded by treatment with RNase (50 µg/ml) for 30 min at 37 °C (Lee *et al.*, 2000). DNA concentration and purity were measured using a spectrophotometer at 260 nm and 280 nm.

RAPD primer and amplification condition

For the development of the RAPD method for *Fusarium* isolates, the 4 different 10-mer primers (Kit A, Roth Germany) (Table 1) were screened for the amplification of template DNA

from 30 isolates of *Fusarium* spp. Amplification reactions were performed in 25 µl volumes containing 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 50 mM KCl, 0.1% TritonX-100, 1.5 mM MgCl₂, 0.1 mM of each dATP, dCTP, dGTP and dTTP, 2 µM of primer, 0.2 units of *Taq* polymerase, and approximately 100 µg of genomic DNA. Amplifications were performed in a Gradient DNA Thermal Cycler programmed for the following parameter : 94 °C for 1 min, followed by 40 cycles of 94 °C for 1 min, 36 °C for 1 min, 72 °C for 2 min, and a final incubation at 72 °C for 2 min (Achenbach *et al.*, 1997). Amplification products (6 µl of a 25 µl reaction) were electrophoresed in 2%

agarose gels with TBE running buffer, stained with ethidium bromide and either scanned into a computer imaging file or photographed (Sambrook *et al.*, 1989).

The computer program NTSYS-PC (version 2.1) was used to analyze the relationship among the *Fusarium* spp. studied. Similarity matrix was generated using the program Qualitative. This matrix was subjected to the unweighted pair group method with arithmetical averages (UPGMA). Cluster analysis was performed on the similarity matrix with the SAHN program using UPGMA and dendrogram was produced with the TREE program.

TABLE 1. Code and nucleotide sequence of primers used in the random amplified polymorphic DNA (RAPD) reaction and G + C content.

Primer	5'-sequence-3'	G + C (%)
A02	TGCCGAGCTG	70
A03	AGTCAGCCAC	60
A07	GAAACGGGTG	60
A09	GGGTAACGCC	70

RESULTS

Isolation and Identification of fungi

One hundred and fifty seven isolates of *Fusarium*, 121 from roots and 36 from soil, were obtained from mulberry plantations with and without showing

root rot symptoms (Table 2). *Fusarium* spp. were grouped and identified into 11 species. They included 102 isolates of *F. solani*, 26 of *F. moniliforme*, 16 of *F. oxysporum*, 3 each of *F. phaseoli* and *F. dlamini*, 2 of *F. culmorum*, one each of *F. dimerum*, *F. graminearum*,

F. beomiforme, *F. scirpi* and *F. anthophilum*. *F. solani* was significantly appeared to associate with all specimens investigated in this trial.

TABLE 2. Frequency of isolation of fungi from roots and soils of mulberry plants exhibiting symptom of root rot and symptomless.

Fungus	Number of isolates			
	Roots		Soils	
	Infected	Non-infected	Infected	Non-infected
<i>F. solani</i>	52	36	6	8
<i>F. oxysporum</i>	11	2	2	1
<i>F. moniliforme</i>	8	1	7	10
<i>F. phaseoli</i>	3	-	-	-
<i>F. culmorum</i>	2	-	-	-
<i>F. dlamini</i>	1	2	-	-
<i>F. dimerum</i>	1	-	-	-
<i>F. graminearum</i>	1	-	-	-
<i>F. beomiforme</i>	1	-	-	-
<i>F. scirpi</i>	-	-	-	1
<i>F. anthophilum</i>	-	-	1	-
Total	80	41	16	20

Detailed morphology of *Fusarium* species

F. solani (Mart.) Appel & Wollenw.

Macroconidia were type C, straight with blunt basal and apical cells. Microconidia were ellipsoidal on long simple phialides produced from the aerial mycelium. Chlamydospores appeared singly or in pairs (Figs. 1–5).

F. oxysporum Schlecht.

Macroconidia were type C, straight. Microconidia were comma

shaped or ellipsoidal produced from short phialides in the aerial mycelium. Chlamydospores produced singly or in pairs (Figs. 1–5).

F. moniliforme Sheldon

Macroconidia were usually type B, narrow and straight, and sparsely produced. Microconidia produced in chains from simple phialides in the aerial mycelium (Figs. 1–5).

F. phaseoli (Burkh.) T. Aoki & O'Donnell

Macroconidia were falcate and formed on slender conidiophores arising from hyphae. Microconidia with ellipsoidal, obovate or naviculate produced from slender aerial conidiophores on aerial mycelium. Chlamydospores formed frequently in mycelium and in conidia, mostly intercalary, single but sometimes in chains (Figs. 1–4).

F. culmorum (W.G. Smith) Sacc.

Macroconidia were very uniform in shape and produced from simple phialides with loosely branched conidiophores. Microconidia were absent. Chlamydospores appeared oval and formed singly or in chains (Figs. 1–2, 4–5).

F. dlamini Marasas, Nelson & Toussoun

Macroconidia were falcate and microconidia were ellipsoidal (Figs. 2–5).

F. dimerum Penzig

Only microconidia and chlamydospores were produced. O-shaped microconidia were produced on complex phialides. Chlamydospores produced intercalary and formed singly or in chains (Figs. 1, 3 and 5).

F. graminearum Schwabe

Macroconidia were falcate produced from simple lateral phialides. Chlamydospores were absent (Figs. 1–2 and 5).

F. beomiforme Nelson & Toussoun

Microconidia, round or ellipsoid shaped were produced from simple phialides in the aerial mycelium (Figs. 1, 3 and 5).

F. scirpi Lambotte & Fautr.

Macroconidia had various sizes with elongated apical cells and produced from single or grouped phialides. Chlamydospores were globose and appeared in chains or clumps (Figs. 1–2 and 5).

F. anthophilum (A. Braun) Wollenw.

Microconidia were fusoid to allantoids and formed from simple phialides or complex phialides. Chlamydospore was absent (Figs. 1, 3 and 5).

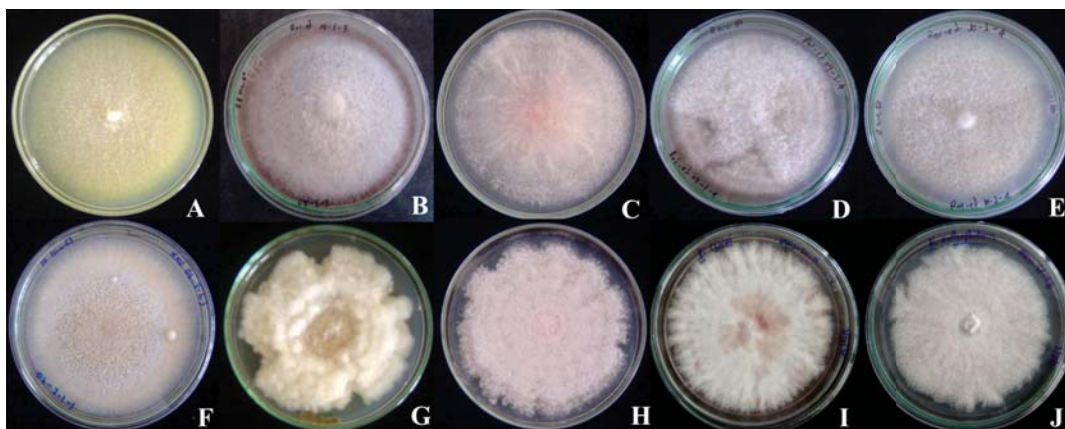


FIGURE 1. Colony morphology of *Fusarium* species on potato dextrose agar. A. *F. solani*; B. *F. oxysporum*; C. *F. moniliforme*; D. *F. phaseoli*; E. *F. culmorum*; F. *F. dimerum*; G. *F. graminearum*; H. *F. beomiforme*; I. *F. scirpi*; J. *F. anthophilum*.

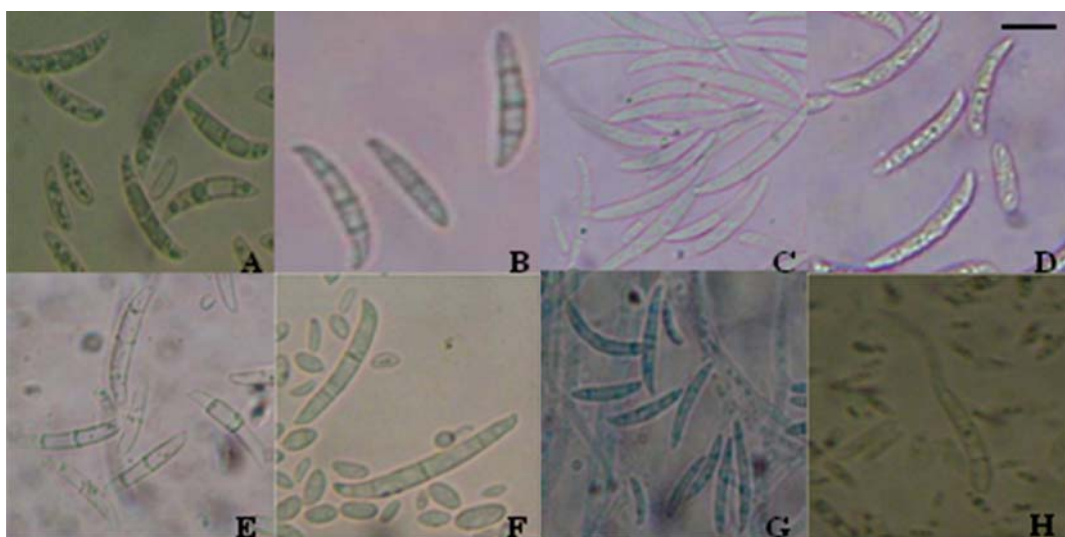


FIGURE 2. Macroconidia of *Fusarium* species. A. *F. solani*; B. *F. oxysporum*; C. *F. moniliforme*; D. *F. phaseoli*; E. *F. culmorum*; F. *F. dlamini*; G, *F. graminearum*; H. *F. scirpi*. Scale bar = 20 μm .

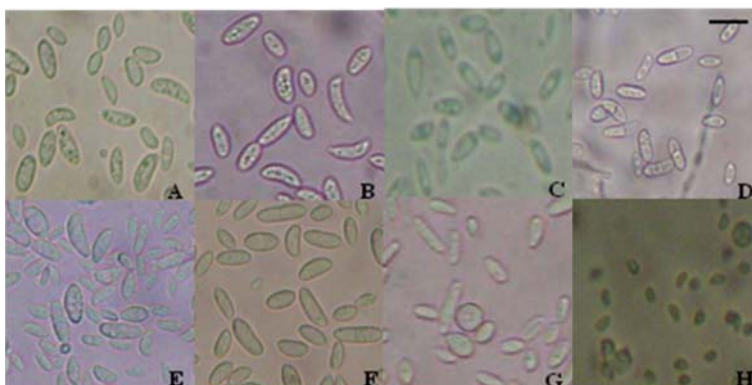


FIGURE 3. Macroconidia of *Fusarium* species. A. *F. solani*; B. *F. oxysporum*; C. *F. moniliforme*; D. *F. phaseoli*; E. *F. dlamini*; F. *F. dimerum*; G. *F. beomiforme*; H. *F. anthophilum*. Scale bar = 20 μ m.

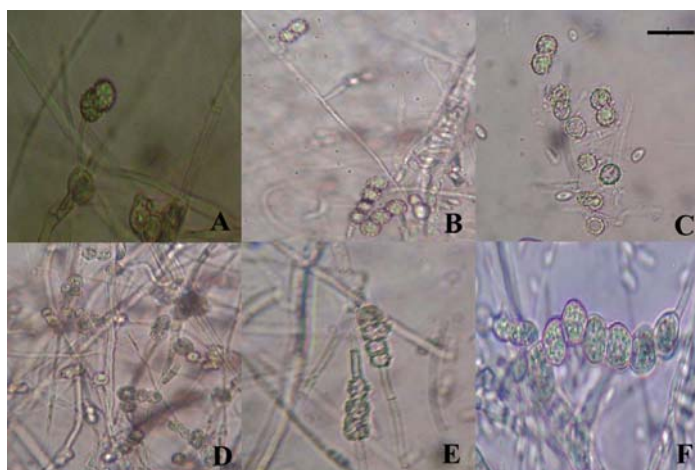


FIGURE 4. Chlamydospore of *Fusarium* species. A. *F. solani*; B. *F. oxysporum*; C. *F. moniliforme*; D. *F. phaseoli*; E. *F. culmorum*; F. *F. dlamini*. Scale bar = 20 μ m.

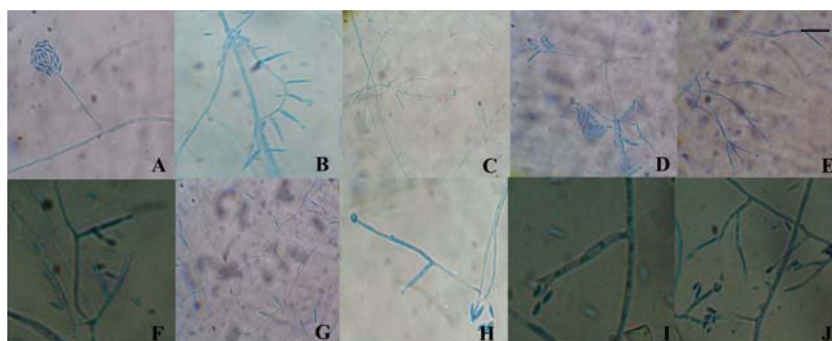


FIGURE 5. Conidiogenous cells of *Fusarium* species. A. *F. solani*; B. *F. oxysporum*; C. *F. moniliforme*; D. *F. culmorum*; E. *F. dlamini*; F. *F. dimerum*; G. *F. graminearum*; H. *F. beomiforme*; I. *F. scirpi*; J. *F. anthophilum*. Scale bar = 20 μ m.

RAPD analysis

To investigate the degree of genetic diversity among and within collections of *Fusarium* spp., a total of 30 isolates comprising 12 of *F. solani*, 3 each of *F. oxysporum*, *F. moniliforme* and

F. dlamini, 2 each of *F. phaseoli* and *F. culmorum*, 1 each of *F. graminearum*, *F. beomiforme*, *F. scirpi*, *F. dimerum* and *F. anthophilum* were analyzed, and RAPD pattern amplified with primer A02, A03, A07 and A09 (Fig. 6), to clearly differentiate between species.

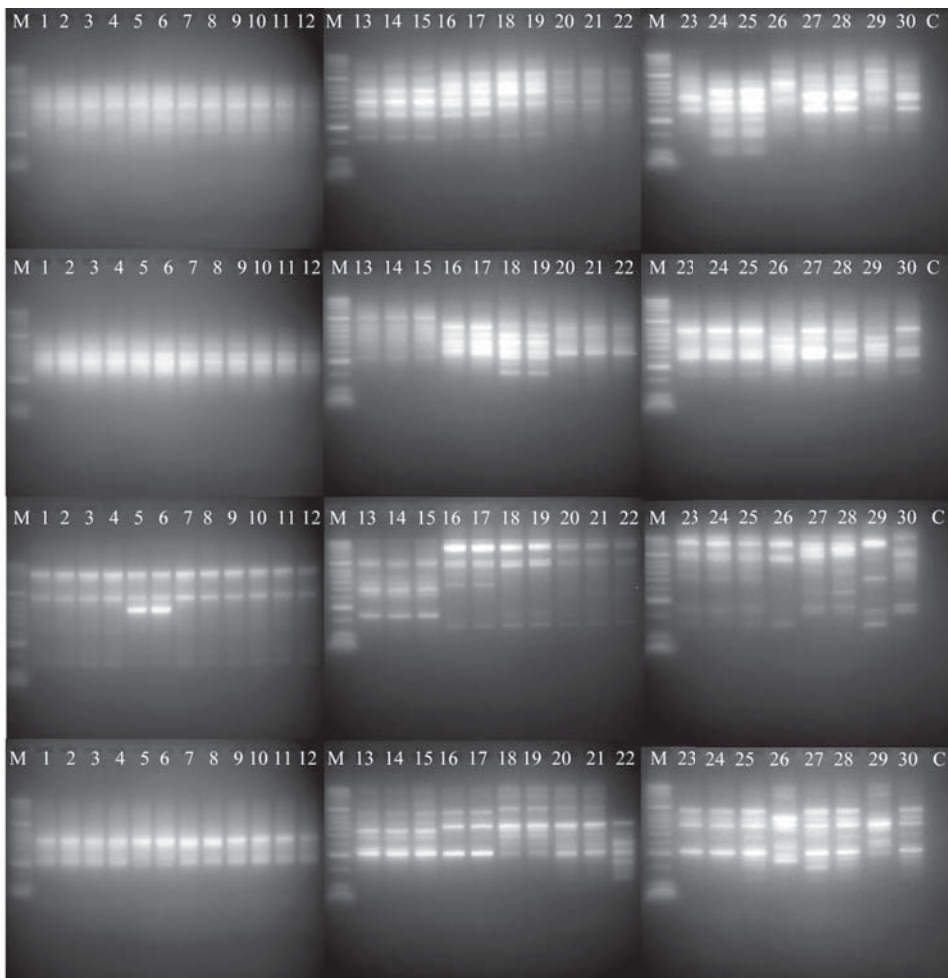


FIGURE 6. RAPD profiles of 30 isolates of *Fusarium* species obtained with primer A02, A03, A07 and A09. Lane M: Hyper ladder II molecular weight markers, Lane C: Control, Lanes 1–12: *F. solani*, lanes 13–15: *F. oxysporum*, lanes 16–17: *F. phaseoli*, Lanes 18–19: *F. culmorum*, lanes 20–22: *F. moniliforme*, lanes 23–25: *F. dlamini*, lane 26: *F. graminearum*, lane 27: *F. beomiforme*, lane 28: *F. scirpi*, lane 29: *F. dimerum*, lane 30: *F. anthophilum*.

The PCR bands were more polymorphic between the species and less variable within the species. The high level of genetic variability among species of *Fusarium* allowed fingerprinting of most of the isolates by examining patterns produced by several primers. Twenty-four bands produced by 4 primers that showed polymorphism were scored. A phylogenetic tree was constructed (Fig. 7). The resulting dendrogram showed relations and genetic distances among different species.

Genetic similarity coefficients ranged from 0.60 to 1.0 (Fig. 7). Two different major groups were obtained among the isolates. The first group consisted of 20 isolates, which included 3 sub-groups (Ia, Ib, Ic). Sub-group Ia consisted of 12 isolates of *F. solani*, all of these isolates showed 100% genetic similarity. Sub-group Ib consisted of 7 isolates including *F. dlamini*, K KU03-2-1, K W04-2-2, *F. dimerum*, *F. beomiforme*, *F. scirpi* and *F. anthophilum*. Sub-group Ic consisted of 1 isolate of *F. graminearum*. A second

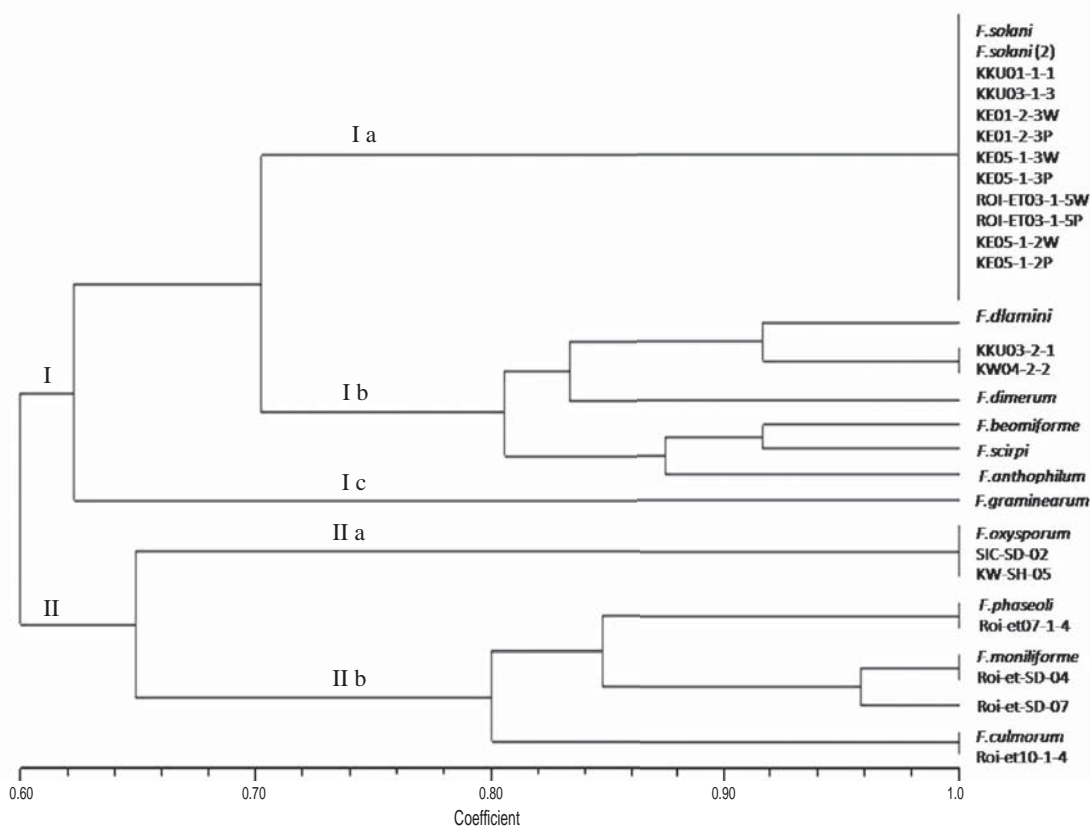


FIGURE 7. Dendrogram obtained from 30 isolates of *Fusarium* spp. with UPGMA. Isolates of different species are indicated at the termini of branches. The line below the dendrogram represents the similarity index.

group consisted of 10 isolates with two sub-group IIa and IIb. Sub-group IIa consisted of 3 isolates of *F. oxysporum*. Sub-group IIb consisted of 7 isolates including 2 isolates each of *F. phaseoli*, and *F. culmorum* and 3 isolates of *F. moniliforme*

DISCUSSION

The genus *Fusarium* contains many species of fungi that are commonly found in soil and on organic substrata and is widely distributed throughout the world (Burgess, 1981). Some species are capable of causing wilts, crown rots, root rots, or fruit rots. Others are opportunists because they colonize plant tissue after some type of stress debilitates the plant. Interestingly, many species of *Fusarium* that abound in the soil are not capable of causing disease. In conclusion, 11 species were isolated from root and soil around rhizosphere from mulberry trees. Based on morphological characteristics, the *Fusarium* spp. were identified as *F. solani*, *F. oxysporum*, *F. moniliforme*, *F. phaseoli*, *F. culmorum*, *F. dlamini*, *F. dimerum*, *F. graminearum*, *F. beomiforme*, *F. scirpi* and *F. anthophilum*. Consistently, Rodrigues and Menezes (2005) isolated and identified *Fusarium* spp. that obtained from seeds of cowpea by means of blotter tests and slide cultures. Species

were differentiated according to the morphology of the macroconidia, microconidia and their arrangement in chains or false heads, the size and type of conidiophore, and the presence or absence of chlamydospores. The species were identified as *F. semitectum*, *F. equiseti*, *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. anthophilum*, *F. sporotrichioides*, *F. moniliforme* and *Fusarium* sp. Latiffah *et al.* (2009) isolated three *Fusarium* species, *F. oxysporum*, *F. proliferatum* and *F. solani*, from roots and stem rots of *Dendrobium* orchids. Molecular characterization using PCR-RFLP of ITS + 5.8S regions showed that the isolates from the same species produced similar patterns and UPGMA analysis of PCR-RFLP of ITS + 5.8S clearly grouped *F. oxysporum*, *F. proliferatum* and *F. solani* into a separate cluster. RAPD-PCR analysis offers a convenient tool for characterization and analyzing variations of *Fusarium* spp.

RAPD analysis has been applied widely in the detection and genetic characterization of phytopathogenic fungi (Lanfranco *et al.*, 1995) including Khalil *et al.* (2003) who used RAPD analysis to study the taxonomic kinships among 5 *Fusarium* spp. Of 10 primers tested, four primers produced polymorphic amplification patterns with taxon-specific bands, in addition

to individual-specific bands. Genetic analysis indicated 2 main clusters, with the minor cluster including all *F. moniliforme* and *F. solani* at the genetic similarity of GS = 57.82%. The major cluster consisted of all *F. oxysporum*, *F. avenaceum* and *F. chlamyosporum* clustered at 71% similarity. Different workers (Grajal-Martin *et al.*, 1993; Achenbach *et al.*, 1997; Nelson *et al.*, 1997; Hyun & Clark, 1998; Migheli *et al.*, 1998; Jana *et al.*, 2003; Gupta *et al.*, 2009) have grouped *Fusarium* spp. populations from different plant hosts using RAPD analysis and they suggested that RAPD markers can be a quick and reliable alternative for differentiating isolates of *Fusarium* spp. into their respective pathogenicity group. The polymorphisms observed for RAPD markers revealed a high degree of genetic diversity in *Fusarium* spp. at the inter-specific level. Our study showed that RAPD technique is an influential tool for discrimination different *Fusarium* species as well as *Fusarium* isolates within species.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research is partially supported by the Center of Excellence on Agricultural Biotechnology, Science and Technology Postgraduate Education and Research Development Office (PERDO),

Commission on Higher Education, Ministry of Education and Agricultural Biotechnology Research Center for Sustainable Economy, Khon Kaen University.

REFERENCES

- Achenbach, L.A., Patrick, J.A. & Gray, L.E. 1996. Use of RAPD markers as a diagnostic tool for the identification of *Fusarium solani* isolates that cause soybean sudden death syndrome. **Plant Disease** 80: 1228–1232.
- Achenbach, L.A., Patrick, J.A. & Gray, L.E. 1997. Genetic homogeneity among isolates of *Fusarium solani* that cause soybean sudden death syndrome. **Theoretical Applied Genetics** 95: 474–478.
- Aoki, T., O'Donnell, K., Homma, Y. & Lattanzi, A.R. 2003. Sudden-death syndrome of soybean is caused by two morphologically and phylogenetically distinct species within the *Fusarium solani* species complex – *F. virguliforme* in North America and *F. Tucumaniae* in South America. **Mycologia** 95: 660–684.
- Booth, C. 1977. **Fusarium**. Commonwealth Mycology Institute, Kew, Surrey, England.
- Burgess, L.W. 1981. General ecology of the Fusaria. In: **Fusarium disease, biology, and taxonomy**. P.E. Nelson, T.A. Toussoun & R.J. Cook (Eds.), pp. 225–235. Pennsylvania University Press. Pennsylvania.
- Chancharan, S. 1990. **Sericulture technology**. Sericulture Institute, Department of Agriculture, Ministry of Agriculture and Cooperatives. (in Thai).
- Chuprayoon, S., Chuprayoon, S., Sukorntasing P. & Lepadakun, P. 1994. **Mulberry and their control**. Department of Agriculture,

- Ministry of Agriculture and Cooperatives. (in Thai).
- Grajal-Martin, M.J., Simon, C.J. & Muehlbauerr, F.J. 1993. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to characterize race 2 of *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi*. **Phytopathology** 83: 612–614.
- Gupta, V.K., Misra, A.K., Gaur, R., Pandey, R. & Chauhan, U.K. 2009. Studies of genetic polymorphism in the isolates of *Fusarium solani*. **Australian Journal of Crop Science** 3: 101–106.
- Hyun, J.W. & Clark, C.A. 1998. Analysis of *Fusarium lateritium* using RAPD and rDNA RFLP techniques. **Mycological Research** 102: 1259–1264.
- Jana, T., Sharma, T.R., Prasad, R.D. & Arora, D.K. 2003. Molecular characterization of *Macrophomina phaseolina* and *Fusarium* species by a single primer RAPD technique. **Microbiological Research** 158: 249–257.
- Kaosiri, T. 1998. **Study of mulberry root rot disease**. Department of Agriculture, Ministry of Agriculture and Cooperatives. (in Thai).
- Khalil, M.S., Abdel-Sattar, M.A., Aly, I.N., Abd-Elsalam, K.A. & Verreet, J.A. 2003. Genetic affinities of *Fusarium* spp. and their correlation with origin and pathogenicity. **African Journal of Biotechnology** 2: 109–113.
- Lanfranco, L., Wyss, P., Marzachi, C. & Bonranate, P. 1995. Generation of RAPD-PCR primers for the identification of isolates of *Glomus mosseae*, an arbuscular mycorrhiza fungus. **Molecular Ecology** 4: 61–68.
- Latiffah, Z., Nur Hayati, M.Z., Baharuddin, S. & Maziah, Z. 2009. Identification and pathogenicity of *Fusarium* species associated with root rot and stem rot of *Dendrobium*. **Asian Journal of Plant Pathology** 3: 14–21.
- Lee, Y.M., Yong-Keel, C. & Byung-Re, M. 2000. PCR-RFLP and sequence analysis of the rDNA ITS region in the *Fusarium* spp. **The Journal of Microbiology** 38: 66–73.
- Migheli, Q., Briatore, E. & Garibaldi, A. 1998. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to identify race 1, 2, 3 and 8 of *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* in Italy. **European Journal of Plant Pathology** 104: 49–57.
- Nelson, A.J., Elias, K.S., Arevalo, G.E., Darlington, L.C. & Bailey, B.A. 1997. Genetic characterization by RAPD analysis of isolates of *Fusarium oxysporum* f.sp. *erythroxyli* associated with an emerging epidemic in Peru. **Phytopathology** 87: 1220–1225.
- Nelson, P.E., Dignani, M.C. & Anaissie, E.J. 1994. Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. **Clinical Microbiology Reviews** 7: 479–504.
- Nelson, P.E., Toussoun, T.A. & Marrasas, W.F.O. 1983. **Fusarium species - an illustrated manual for identification**. Pennsylvania State University Press, Pennsylvania.
- Rodrigues, A.A.C. & Menezes, M. 2005. Identification and pathogenic characterization of endophytic *Fusarium* species from cowpea seeds. **Mycopathologia** 159: 79–85.
- Saksung, P., Horikawa, C., Sornchattrarak, N., Chareankan, J., Rattalung, J. & Thaworn-anukulkid, C. 1997. **Study and analysis of sericulture in Thailand**. Faculty of Science, Kasetsart University. (in Thai).
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. 1989. **Molecular cloning, a laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

- Sanoamuang, N. & Saksirirat, W. 1984. Complex root rot of mulberry. **KKU-ACNARP 1983 Technical Progress Report**. Faculty of Agriculture, Khon Kaen University.
- Sanoamuang, N., Saksirirat, W. & Paripunang, L. 1986. Complex root rot of mulberry. **KKU-ACNARP 1985 Technical Progress Report**. Faculty of Agriculture, Khon Kaen University.
- Seifert, K. 1996. *Fusarium* interactive key. **Agriculture and Agri-Food Canada**. Available Source: <http://res.agr.ca/brd/fusarium/home1.html>. June 9, 2007.
- Summerell, B.A., Salleh, B. & Leslie, J. 2003. A utilitarian approach to *Fusarium* identification. **Plant Disease** 87(2):117–128.
- Thaworn-anukulkid, C. 1996. **Sericulture**. Department of Entomology, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University. (in Thai).
- The Hindu. 2004. Root rot of mulberry. **Online edition of Indian's National Newspaper**. Available Source: <http://www.hindu.com/seta/2004/02/19/stories/2004021900141500.htm>. October 5, 2006.
- Winidsanan, T. 1987. **Farm and forage crops disease**. Department of Entomology and Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University. (in Thai).
- Yamakawa, K., Sewatanon, M., Petmeesee, C. & Panyawanit, M. 1991. **Studies on the improvement of techniques of mulberry cultivation and the prevention of root rot disease in Thailand**. Tropical Agriculture Research Center, Department of Agriculture, Ministry of Agriculture and Cooperatives.
- Zang, Z., Zhang, J., Wang, Y. & Zheng. 2005. Molecular detection of *Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum* and *Mycosphaerella melonis* in infected plant tissues and soil. **FEMS Microbiology Letters** 249: 39–47.

Regeneration and transformation of *Vanda lilacina* Teijsm. & Binn.

WARISA PILAHOME AND SUMONTIP BUNNAG*

Applied Taxonomic Research Center, Department of Biology, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

ABSTRACT. The objectives of this research were to improve the efficiency of regeneration and establish optimal condition for transformation of *Vanda lilacina* Teijsm & Binn. The new Dogashima (ND) medium supplemented with 1% potato extract was suitable for seed germination. Experiments were performed to determine the effect of plant growth regulators on the number of shoots. It was found that the shoot number per protocorm was 6 when cultured on ND medium supplemented with 1 mg/l naphthalene acetic acid and 5 mg/l benzylaminopurine. The protocorm regeneration was completely inhibited by hygromycin at 9 mg/l. *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA 4404 (pCAMBIA1305.1) was used to establish a transformation protocol. The plasmid pCAMBIA containing antisense ACC oxidase, β -glucuronidase (GUS) and hygromycin resistant (*hpt*) genes, was used. Co-cultivation of the protocorms with *Agrobacterium* LBA 4404 led to numerous positive GUS staining. Successful transformation of antisense ACC oxidase into *V. lilacina* was verified by GUS assay. The GUS assay revealed the GUS activity while PCR method indicated the integration of DNA.

KEYWORDS: *Vanda lilacina* Teijsm. & Binn., antisense ACC oxidase gene, hygromycin, cefotaxime, regeneration

* Corresponding author: sumbun@kku.ac.th

Received: 12 November 2009

Accepted: 5 April 2010

INTRODUCTION

Vanda is one of the most important types of commercial orchids used for cut flowers and potted plants. It belongs to the family Orchidaceae, which is the largest family of the flowering plants and consists of 779 genera and 22,500 species (Mabberley, 2008). About 177 genera and 1,135 species of orchids are found in Thailand (Atichart *et al.*, 2007). However, orchid flowers are extremely sensitive to ethylene, even at low levels. It induces rapid wilting of flowers, senescence or death of flowers and petals, abscission of plant parts including floral structure and discoloration of flowers (Woodson, 1994; Young *et al.*, 2004).

Ethylene is synthesized in plant tissue via conversion of S-adenosyl methionine to 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC). This reaction is catalyzed by ACC synthase. ACC is then converted to ethylene by ACC oxidase. Inhibition of ethylene biosynthesis can be achieved by the use of antisense RNA to hinder the activities of ACC synthase or ACC oxidase. Thus, ethylene biosynthesis does not occur (Henzi *et al.*, 2000). Plant genetic engineering provides an opportunity to incorporate novel traits into this orchid. In recent years, the successful *Agrobacterium*-mediated transformation of orchids has been reported. Availability of effective

transformation procedures can lead to genetic improvement of orchids. Transfer of antisense ACC oxidase gene into *V. lilacina* Teijsm. & Binn. may prolong the longevity and vase life of orchid flowers. This research was carried out to improve the efficiency of regeneration and transformation of *V. lilacina* with antisense ACC oxidase gene using *A. tumefaciens*.

MATERIALS AND METHODS

Protocorm Induction

Protocorms of *V. lilacina* were induced from seeds using *in vitro* germination. Pods of *V. lilacina* were washed with a mild detergent solution and soaked in 15% (v/v) sodium hypochlorite containing Tween-20 for 15 minutes. After being rinsed 4 times with sterile distilled water, seeds were cultured on VW (Vacin and Went, 1949) medium or ND (Tokuhara and Mii, 1993) medium containing 1% (w/v) sucrose and 1% (w/v) potato extract, pH 5.7. The explants were cultured under a 16 hour photoperiod (a light intensity of 40 $\mu\text{mole m}^{-2}\text{s}^{-1}$) at $25 \pm 2^\circ\text{C}$ for 4 weeks.

Plant Regeneration

Protocorms were placed on ND medium containing NAA at 0, 0.1 or 1 mg/l in combination with 0, 0.1, 1 and 5

mg/l BAP. The average number of shoots per protocorm was determined in five repeated experiments. The cultures were then maintained under light conditions.

Effect of Hygromycin on Plant Regeneration

Hygromycin was added to the regeneration medium at 0, 5, 7, 9, 15 or 20 mg/l. The regeneration percentage and number of shoots per callus were evaluated after 4 weeks of culture. The experiment was repeated 5 times, each treatment with 5 explants

***Agrobacterium*-Mediated Transformation**

Agrobacterium tumefaciens strain LBA 4404 pCAMBIA 1305.1 was used to establish a transformation protocol. The plasmid pCAMBIA contained antisense ACC oxidase, β -glucuronidase (GUS) and hygromycin resistant (*hpt*) gene, each of which was expressed under the CaMV35S promoter. Protocorms were immersed in *Agrobacterium* suspension for 30, 45, 60 and 75 minutes subsequently transferred to sterile filter paper for absorption of excess bacteria. They were then cultured on ND medium for 3 days. After co-cultivation, the protocorms were washed in sterile distilled water containing cefotaxime and

transferred to selection ND medium supplemented with hygromycin.

Assay for β -Glucuronidase (GUS) Activity

The histochemical GUS assay for GUS gene expression was performed according to the method of Jefferson (1987). Plant tissues were immersed in x-gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronidase) solution and incubated overnight at 37 °C.

PCR Analysis

Total genomic DNA was extracted from the non-transformed and potentially transformed protocorms by the CTAB method.

RESULTS

Protocorm Induction

Seeds of *V. lilacina* were developed into protocorms at 4 weeks after germination on VW and ND medium containing 1% potato extract (Fig. 1). It was found that ND medium was more effective than another one in promoting seed germination, giving rise to the germination percentage of 80. The protocorm developed more rapidly when cultured on solid ND medium.

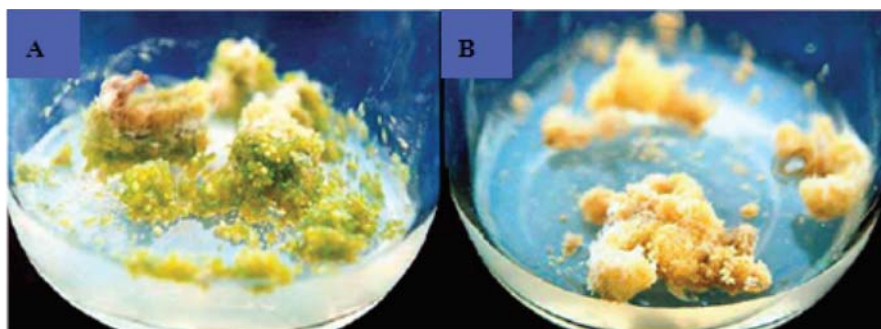


FIGURE 1. Seed germination on media: A. ND medium, B. VW medium.

Plant Regeneration

A high proliferation of the protocorms was observed after culture on ND medium supplemented with 0, 0.1 or 1 mg/l NAA in combination with 0, 0.1, 1

or 5 mg/l BAP. It was found that the protocorms successfully proliferated on the ND medium supplemented with 1 mg/l NAA and 5 mg/l BAP. The highest number of shoots per protocorm was 6 (Fig. 2).

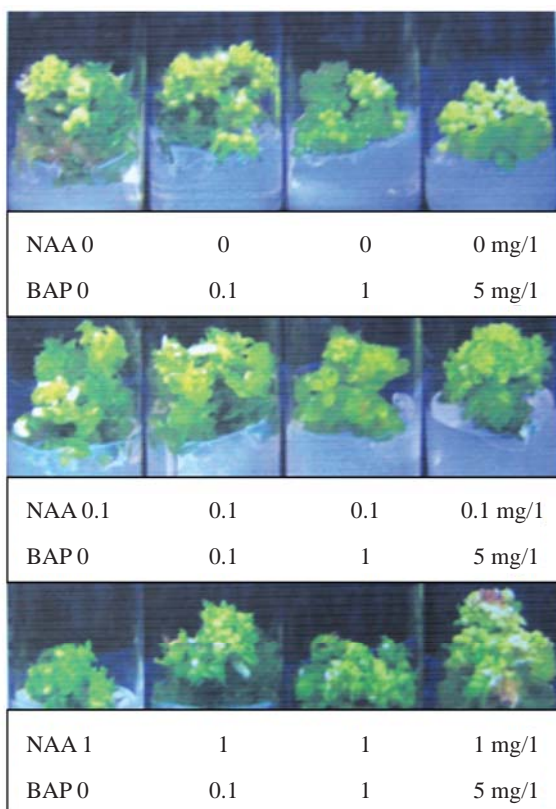


FIGURE 2. Plantlets of *V. lilacina* cultured on ND medium supplemented with 0, 0.1 or 1 mg/l NAA in combination with 0, 0.1, 1 or 5 mg/l BAP.

Effect of Hygromycin on Plant Regeneration

Hygromycin strongly reduced protocorm proliferation. The lowest dose

of hygromycin that completely inhibited protocorm regeneration was 9 mg/l. All of the protocorms turned brown and eventually died in 3 weeks (Fig. 3).

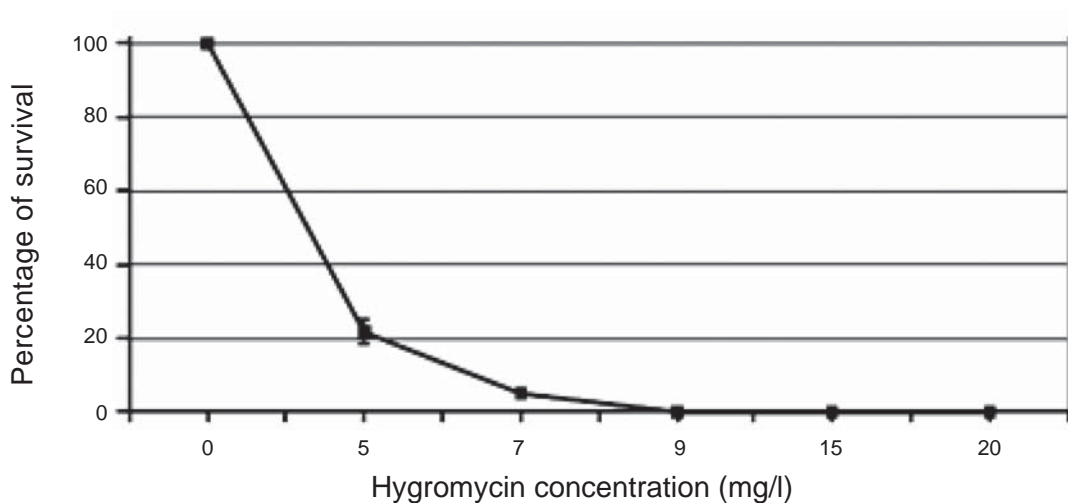


FIGURE 3. Effect of hygromycin on protocorm induction of *V. lilacina*.

Agrobacterium-Mediated Transformation

Blue coloration was observed after 5 days of co-cultivation. Co-cultivation of the protocorms with *A. tumefaciens* for 30 minutes gave rise to the highest number of blue spots (Figs. 4, 5). DNA

integration of the transformed protocorms was shown in Figure 6. The sizes of amplified fragments were 195 bp and 180 bp for the 35S and NOS, respectively. However, the non-transformed orchids did not show any expected band sizes.

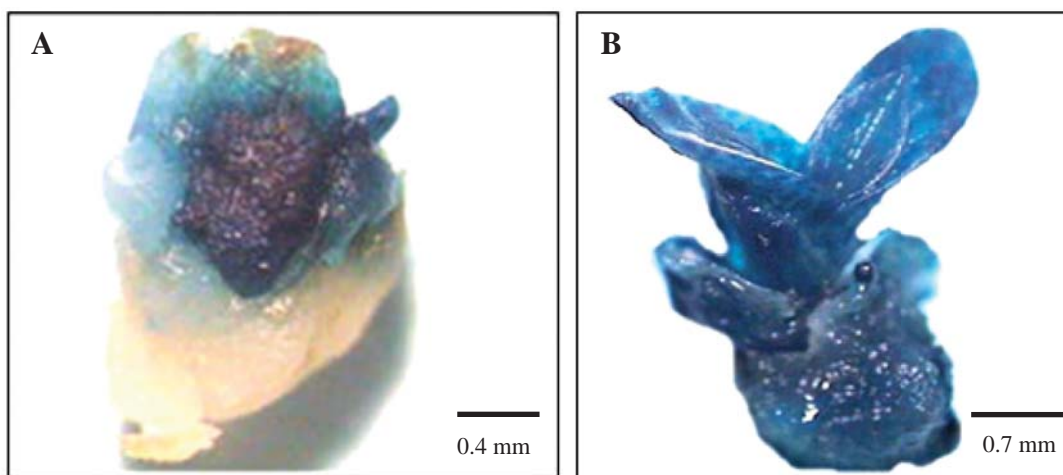


FIGURE 4. GUS activity of transgenic *V. lilacina*: A. protocorm, B. plantlet.

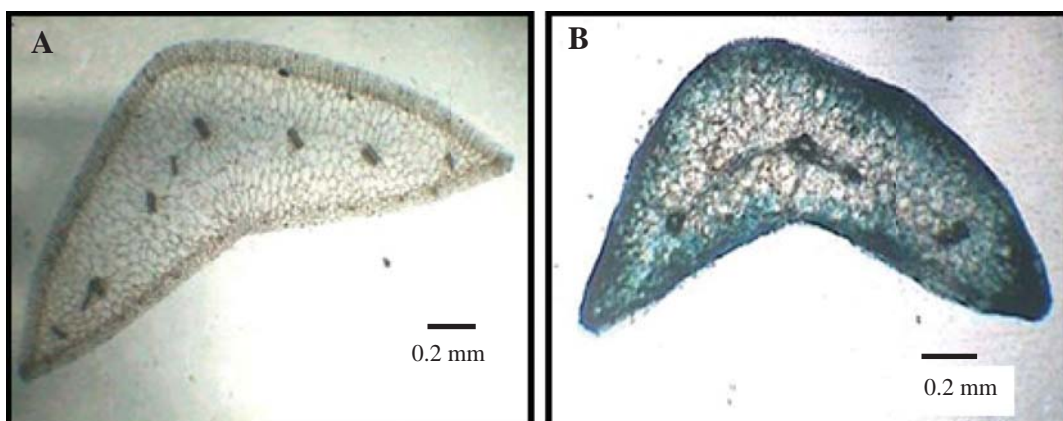


FIGURE 5. Transverse sections of leaves of *V. lilacina*: A. nontransgenic plant, B. transgenic plant.

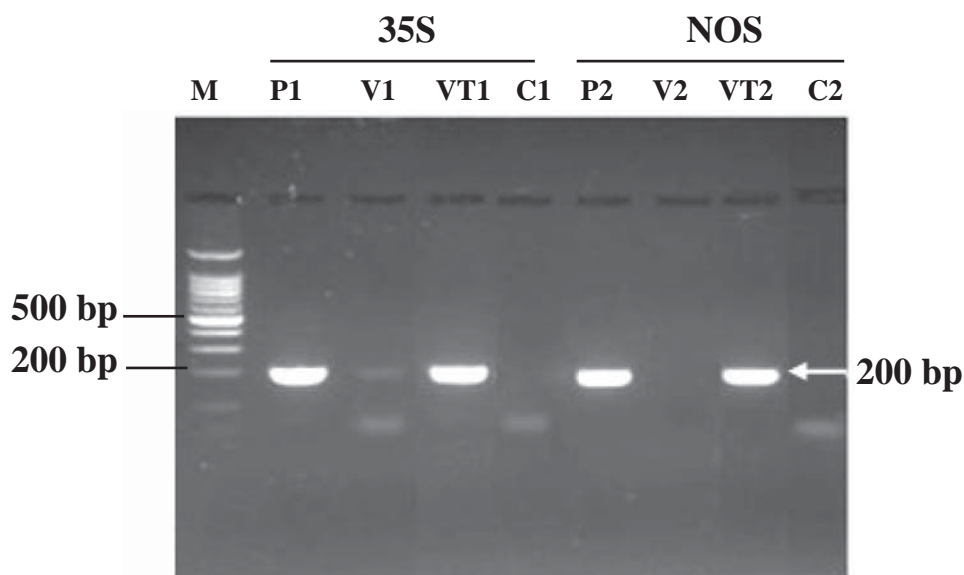


FIGURE 6. PCR analysis of transformed *V. lilacina* using primers to detect the 35S (lane P1-C1) and NOS (lane P2-C2); lane M: 100 bp DNA ladder, lane P: pCAMBIA 1305.1, V: nontransformed protocorms, VT: transformed protocorms, C: control.

DISCUSSION

The specific combination of auxin and cytokinin in culture media is one of the most important factors for *in vitro* regeneration of orchids. In this study, we found that the most suitable plant growth regulators for proliferation and regeneration of *V. lilacina* were NAA and BAP. Treatment with selective agents is needed to avoid development of undesirable numbers of escaped plants. In this experiment, the selection agent was hygromycin, an aminoglycoside antibiotic that causes death to plant cells by inhibiting transcription and translation (Datta *et al.*, 1999). We found that the effective concentration of hygromycin

for selection of the transformants was 9 mg/l.

Co-cultivation period is another factor which affects the efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation. The optimal co-cultivation time for *V. lilacina* was shown to be 30 minutes. These transformed protocorms gave a high intensity of blue staining that indicated high GUS expression. In this study, the transformation percentage of *V. lilacina* was 54. DNA integration was confirmed by PCR amplification of 195 bp and 180 bp for the 35S promoter and NOS terminator, respectively. The present research has shown the same results as those reported for *Dendrobium*

draconis and *Dendrobium* Miss Singapore (Homkrajhae, 2005).

ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported by the Applied Taxonomic Research Center, Department of Biology, Faculty of Science, Khon Kaen University.

REFERENCES

- Atichart, P., Bunnag, S. and Theerakulpisut, P. 2007. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Dendrobium secundum* (Bl.) Lindl. with antisense ACC oxidase. **Asian Journal of Plant Sciences** 6:1065-1071.
- Datta, K., Velazhahan, R. and Oliva, N. 1999. Over expression of the cloned rice thaumatin-like protein (PR-5) gene in transgenic rice plants enhanced environmental friendly resistance to *Rhizoctonia solani* causing sheath blight disease. **Theoretical and Applied Genetics** 98: 1138-1145.
- Jefferson, R.A. 1987. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. **Plant Molecular and Biology Reports** 5:387-405.
- Henzi, M.X., Christe, M.C. and McNeil, D.J. 2000. Morphological characterization and agronomic evaluation of transgenic broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica* Plenck) containing an antisense ACC oxidase gene. **Euphytica** 113: 9-18.
- Homkrajhae, B. 2005. **Transformation of *Dendrobium draconis* Rchb.f. and *D. Miss Singapore* with antisense ACC oxidase gene**. M.Sc. Thesis, Graduate School, Khon Kaen University.
- Mabberley, D.J. 2008. **Mabberley's Plant-book: a portable dictionary of plants, their classification and uses**. 3rd ed., Cambridge University Press.
- Tokuhara, K. and Mii, M. 1993. Micropropagation of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis* by shoot tips of flower stalk buds. **Plant Cell Reports** 13:7-11.
- Vacin, E. and Went, F. 1949. Some pH changes in nutrient solutions. **Botanical Gazette** 110: 605-613.
- Woodson, W. 1994. **Regulation of ethylene production during postproduction handling of flower crops**. Available Source: <http://endowment.org/archives/1994/06/regulation-of-ethylene-production-during-postproduction-handling-of-flower-crops-1994-proposal/> June 3, 2007.
- Young, T.E., Meeley, R.B. and Gallie, D.R. 2004. ACC synthase expression regulates leaf performance and drought tolerance in maize. **Plant Journal** 40: 813-825.

การแสดงออกในระยะเวลาแรกของยีน *OsNUC1* ในข้าว (*Oryza sativa* L.) หลังจากได้รับภาวะเครียดทางกายภาพและบทบาทในการทนต่อภาวะเครียดจากโลหะหนัก

The early expression of *OsNUC1* in Rice (*Oryza sativa* L.) after abiotic stresses and its role in heavy metal stress

นนทลี ชำนาญนุญธรรม^{1,2} ศิริพร ศรีภิญโญวณิชย์^{1,3} และ ศุภจิตรา ชัชวาลย์^{1*}

NONTALEE CHAMNANMANOONTHAM^{1,2}, SIRIPORN SRIPINYOWANICH^{1,3} AND

SUPACHITRA CHADCHAWAN^{1*}

¹ หน่วยปฏิบัติการวิจัยสิ่งแวดล้อมและสรีรวิทยาของพืช ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

¹ Environment and Plant Physiology Research Unit, Department of Botany, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

² สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

² Biotechnology Program, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

³ สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

³ Biological Science Program, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

บทคัดย่อ. นิวคลีโอลิน (nucleolin) เป็น multifunctional protein ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการสร้างไรโบโซม พบมากบริเวณนิวคลีโอลัส การศึกษาพบว่ายีนนิวคลีโอลินในข้าว (*OsNUC1*) สามารถเพิ่มการแสดงออกเมื่อกระตุ้นด้วยความเครียดจากความเค็ม ความเครียดจากความแล้งและโลหะหนัก ในการศึกษาบทบาทของ RNA recognition motif (RRM) และ glycine-arginine rich (GAR) domain ของนิวคลีโอลินต่อความสามารถในการทนต่อโลหะหนักโดยนำ *Arabidopsis* ที่ได้รับการถ่าย cDNA บางส่วนของนิวคลีโอลินที่สร้าง RRM และ GAR domain ภายใต้การควบคุมของ *CaMV35S* promoter มาเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีการเติม 25, 50 และ 75 μM CuSO_4

* Corresponding author: s_chadchawan@hotmail.com

Received: 15 March 2010

Accepted: 21 April 2010

หรือ 50, 75 และ 100 μM CdCl_2 เป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่า *Arabidopsis* ที่ได้รับการถ่ายยีนมีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งมากกว่าพันธุ์ปกติในทุกชุดการทดลอง ยกเว้นในอาหารสูตร MS ที่มีการเติม 100 μM CdCl_2 น้ำหนักแห้งของทั้งพืชที่ได้รับการถ่ายยีนและพืชพันธุ์ปกติไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ABSTRACT. Nucleolin is a multifunctional protein involving in metabolism of cells especially ribosome biogenesis. It mainly presents in the nucleolus. Rice *nucleolin* gene (*OsNUC1*) is up-regulated after salt, drought and heavy metal stress. In this study, we investigated the influence of RNA recognition motif (RRM) and glycine-arginine rich (GAR) domain of rice nucleolin on heavy metal tolerance ability using transgenic *Arabidopsis*, containing partial *OsNUC1* cDNA encoding RRM and GAR domain under *CaMV35S* promoter. It was found that transgenic *Arabidopsis* had a significant higher fresh weight and dry weight when grew in MS medium or MS medium containing 25, 50, 75 μM CuSO_4 or 50, 75 μM CdCl_2 for two weeks. However, growing in MS medium supplemented with 100 μM CdCl_2 , the transgenic lines showed the higher fresh weight than wild type, but the dry weights of both transgenic lines and wild type plant were not statistically different.

คำสำคัญ: นิวคลีโอลิน, ข้าว, ความเครียดจากความเค็ม, โลหะหนัก

Keyword: nucleolin, rice, salt stress, heavy metal

บทนำ

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย มีมูลค่าการส่งออกเป็นอันดับหนึ่งของโลก (FAO Rice Market Monitor, 2009) ดังนั้นจึงมีการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีผลผลิตต่อไร่สูง มีความต้านทานต่อโรคหรือแมลงศัตรูข้าวที่สำคัญ และทนต่อสภาวะแวดล้อมที่มีปัญหา เช่น

ภาวะน้ำท่วม ภาวะแล้ง และภาวะเค็ม เป็นต้น

ภาวะเค็มเป็นปัจจัยทางกายภาพที่ส่งผลต่อเมแทบอลิซึมภายในพืช ลักษณะทางสรีรวิทยาภายนอก ซึ่งส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของพืช รวมทั้งปริมาณและคุณภาพของผลผลิต (Mansour & Salama, 2004) พืชที่ได้รับภาวะเค็มจำเป็นต้องมีกลไกการปรับตัวเพื่อให้สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้

โดยกลไกการปรับตัวนี้เป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน

จากการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนในข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 (LPT123) กับยีนในข้าวสายพันธุ์เหลืองประทิว 123-TC171 (LPT123-TC171) ภายใต้ภาวะเค็ม โดยใช้เทคนิค differential display ค้นพบชิ้นส่วนของยีน *OsD1B18-18* ซึ่งมีความคล้ายกับยีน *OsNUC1* หรือ นิวคลีโอลิน โดยการแสดงออกของยีนดังกล่าวในข้าวทั้งสองพันธุ์/สายพันธุ์มีรูปแบบแตกต่างกันคือ ในข้าวพันธุ์ LPT123 ไม่พบการแสดงออกของยีนในภาวะปกติ แต่มีการแสดงออกของยีนสูงขึ้นหลังจากได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง สำหรับในข้าวสายพันธุ์ LPT123-TC171 พบการแสดงออกของยีน *OsNUC1* ในภาวะปกติและสูงขึ้นหลังจากได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง (สมพร มณีประสพสุข, 2547) แต่ยังไม่มีการรายงานการแสดงออกในระยะแรกของยีนนิวคลีโอลินในข้าวในภาวะเครียดทางกายภาพต่างๆ ได้แก่ ความแล้ง ความร้อน อุณหภูมิต่ำและโลหะหนัก เป็นต้น

นิวคลีโอลิน (nucleolin) เป็นโปรตีนที่สำคัญในยูคาริโอต เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการสร้างไรโบโซม จากการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนพบว่า มี domain ที่สำคัญอยู่ 3 ส่วน ได้แก่ (1) N-terminal domain

ประกอบด้วย acidic serine-rich region (2) Central domain ประกอบด้วย RNA-binding domain เรียกว่า RRM domain และ (3) C-terminal domain ประกอบด้วย glycine และ arginine เป็นจำนวนมาก เรียกว่า GAR domain (Lischwe *et al.*, 1982) จากโครงสร้างของนิวคลีโอลิน จะพบว่าประกอบด้วยส่วนต่างๆ ที่สามารถจับกับ DNA, RNA และโปรตีนได้ มีการรายงานว่าบทบาทหน้าที่เกี่ยวข้องในการควบคุมกิจกรรมภายในเซลล์ ได้แก่ การสังเคราะห์โปรตีน การรักษาเสถียรภาพของ mRNA การเพิ่มจำนวนเซลล์ และการเจริญเติบโต (Srivastava & Pollard, 1999)

นิวคลีโอลินในพืชค้นพบครั้งแรกในเซลล์รากหัวหอมใหญ่ ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการคลายตัวของโครมาติน rDNA transcription และในระยะแรกของการสร้าง pre-rRNA โดยจะพบนิวคลีโอลินร่วมกับส่วนประกอบอื่นของนิวคลีโอลัสระหว่างการเกิด mitosis และระยะหลังในการแบ่งตัวของ daughter cell nucleoli แสดงว่าการสร้างไรโบโซมจะเริ่มหลังจากการเกิด mitosis ในระดับ transcription และในขณะสร้าง pre-rRNA (Medina *et al.*, 1995)

Pontvianne *et al.* (2007) ศึกษา ยีนนิวคลีโอลินใน *Arabidopsis thaliana* L. (*AtNUC-L1* และ *AtNUC-L2*) พบว่านิวคลีโอลินเกี่ยวข้องในระยะแรกของการสร้างไรโบโซม

มีการแสดงออกของยีน *AtNUC-L1* ทั่วไปในภาวะปกติ การขัดขวางการทำงานของยีนนี้ทำให้เกิดผลรุนแรงต่อการเจริญและการพัฒนาของพืช และการขาดโปรตีนนี้ในพืช *Atnuc-L1 mutant* จะชักนำให้เกิด nucleolar disorganization การคลายตัวของนิวคลีโอลัส (nucleolus organizer region decondensation) และมีผลต่อการสะสมระดับของ pre-rRNA precursor นอกจากนี้ใน *Atnuc-L1 mutant* พบว่ายีน *AtNUC-L2* ถูกกระตุ้นให้มีการแสดงออก จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่ายีน *AtNUC-L2* เป็นตัวช่วยเหลือเมื่อขาดโปรตีน *AtNUC-L1* บางส่วนหรือทั้งหมด ซึ่งงานวิจัยนี้เป็นงานแรกที่ศึกษาการขัดขวาง nucleolin-like protein ในยูคาริโอตชั้นสูง และบทบาทใหม่ๆ สำหรับนิวคลีโอลินในโครงสร้างของนิวคลีโอลัส และ rDNA chromatin organization แต่อย่างไรก็ดี งานวิจัยดังกล่าวยังไม่ได้มีการศึกษาความเกี่ยวข้องกับการตอบสนองของยีนนิวคลีโอลินต่อภาวะเครียดทางกายภาพต่างๆ

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทำการศึกษารูปแบบการแสดงออกในระยะแรกของยีนนิวคลีโอลินในข้าว (*OsNUC1*) หลังจากได้รับภาวะเครียดทางกายภาพต่าง ๆ ได้แก่ ภาวะเครียดจากความเค็ม (salt stress) ภาวะเครียดจากความแล้ง (drought stress) ภาวะเครียดจากโลหะหนัก (heavy metal stress) ภาวะเครียดจากอุณหภูมิต่ำ (cold stress) และบทบาทของ

ยีนต่อความสามารถในการทนต่อภาวะเครียดจากโลหะหนัก

อุปกรณ์และวิธีการ

การศึกษาการแสดงออกช่วงแรกของยีน *OsNUC1* ในข้าวหลังจากได้รับภาวะเค็ม

เพาะเมล็ดข้าวสายพันธุ์ไม่ทนเค็ม คือ พันธุ์เหลืองประทิว 123 (LPT123) และสายพันธุ์ทนเค็ม คือ สายพันธุ์เหลืองประทิว 123-TC171 (LPT123-TC171) เป็นเวลา 3 สัปดาห์ในสารละลายธาตุอาหาร WP No.2 (Vajrabhaya & Vajrabhaya, 1991) วางในโรงเรือนทดลองที่ได้รับแสงตามธรรมชาติ เมื่อครบกำหนดย้ายต้นกล้าลงปลูกในขวดแก้วที่มีสารละลายธาตุอาหาร WP No.2 โดยแบ่งเป็น 2 ชุดการทดลอง คือ สารละลายธาตุอาหาร WP No.2 (ภาวะปกติ) และสารละลายธาตุอาหาร WP No.2 + 0.5% NaCl (w/v) (ภาวะเครียดจากความเค็ม) เก็บตัวอย่างใบข้าวที่ 0, 0.5, 1, 2, 6, 12 และ 24 ชั่วโมงโดยเริ่มเก็บตัวอย่างตั้งแต่วันที่ 6.00 น. สกัด total RNA จากใบข้าวด้วยวิธี Hot phenol ดัดแปลง (Thikart *et al.*, 2005) กำจัด DNA ออกจาก RNA ด้วยเอนไซม์ DNase I (Takara) จากนั้นสร้าง cDNA สายแรก ด้วยการทำ reverse transcription (RT) โดยใช้เอนไซม์ M-MLV reverse transcriptase (Promega) สุดท้ายนำ cDNA ที่ได้มาใช้เป็นแม่แบบในการทำ real-time PCR ด้วยเครื่อง iCycler™

Thermal Cycler (Bio-Rad) โดยใช้เอนไซม์ iQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad)

การศึกษาการแสดงออกช่วงแรกของยีน *OsNUC1* ในข้าวหลังจากได้รับภาวะเครียดทางกายภาพต่าง ๆ

เพาะเมล็ดข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123-TC171 (LPT123-TC171) เป็นเวลา 3 สัปดาห์ในสารละลายธาตุอาหาร WP No.2 (Vajrabhaya & Vajrabhaya, 1991) วางในโรงเรือนทดลองที่ได้รับแสงตามธรรมชาติ เมื่อครบกำหนดย้ายต้นกล้าลงปลูกในขวดแก้วที่มีสารละลายธาตุอาหาร WP No.2 โดยแบ่งเป็น 5 ชุดการทดลอง คือ สารละลายธาตุอาหาร WP No.2 (ภาวะปกติ) สารละลายธาตุอาหาร WP No.2 + 20% PEG6000 (ภาวะเครียดจากความแล้ง) สารละลายธาตุอาหาร WP No.2 + 100 μ M CuSO_4 สารละลายธาตุอาหาร WP No.2 + 100 μ M CdCl_2 (ภาวะเครียดจากโลหะหนัก) และสุดท้ายสารละลายธาตุอาหาร WP No.2 โดยปลูกที่ 4 องศาเซลเซียส (ภาวะเครียดจากอุณหภูมิต่ำ) จากนั้นเก็บตัวอย่างพืชที่ 0, 0.5, 1, 2, 6, 12 และ 24 ชั่วโมงโดยเริ่มเก็บตัวอย่างตั้งแต่วเวลา 6.00 น. สกัด total RNA จากใบข้าว กำจัด DNA ออกจาก RNA ด้วยเอนไซม์ DNase I และแปลงให้เป็น cDNA สุดท้ายนำ cDNA ที่ได้จากข้อมาใช้เป็นแม่แบบในการทำ RT-PCR ทำการวัดความเข้มแถบ DNA (band intensity) ด้วย

โปรแกรม Quality One (Bio-Rad, California, USA) นำค่า intensity ของยีน *OsNUC1* มาปรับเทียบกับค่า intensity ของยีน *OsActin* นำค่า intensity ที่ปรับเทียบของแต่ละเวลาที่ทำการเก็บตัวอย่าง มาหารด้วยค่า intensity ของชั่วโมงที่ 0 จากนั้นนำค่าสุดท้ายที่ได้ไปสร้างกราฟ เพื่อแสดงระดับการแสดงออกสัมพันธ์ของยีนนิวคลีโอลิน (*OsNUC1*)

การสร้าง *Arabidopsis* ดัดแปรพันธุกรรม

การสร้าง *Arabidopsis* ดัดแปรพันธุกรรมที่มีโครงสร้างยีน partial *OsNUC1* ซึ่งมีโครงสร้างยีน partial *OsNUC1* ซึ่งประกอบด้วยบริเวณ RNA recognition motif (RRM) และ glycine-arginine rich (GAR) domain ภายใต้การควบคุมด้วย 35SCaMV promoter ซึ่งชักนำให้ยีนมีการแสดงออกตลอดเวลา ไพรเมอร์ที่ใช้ในการโคลนนิ่งบริเวณของ partial *OsNUC1* ถูกออกแบบจากลำดับเบสของ cDNA หมายเลข AK063918 ซึ่งเป็นชิ้นส่วน cDNA ของยีนที่รายงานไว้ในฐานข้อมูลลำดับเบสของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) และในการโคลนยีนนี้ได้ใช้ลำดับเบสของ cDNA หมายเลข AK063918 เป็นลำดับเบสตั้งต้นในการทำ PCR

ลำดับเบสของ forward primer (F) 5'-AATCTAGACAGTAGCAGCAGTGATGATAGC-3' และ reverse primer (R) 5'-

AAGAGCTCACCAACACGGTCCCAACT-3' ทั้งนี้ลำดับเบสที่เป็นตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XbaI* และ *SacI* ได้ถูกเติมไว้ที่ปลายของสาย forward primer และ reverse primer ตามลำดับ ปฏิกริยา PCR ถูกเตรียมในสารผสมของเอนไซม์ *pfu* (Invitrogen, La Jolla, CA, USA) ในปริมาตร 25 μ l และทำปฏิกริยาในเครื่องเพิ่มปริมาณสาย DNA (MJ research, USA) ปฏิกริยาเกิดขึ้นที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที, (94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 45 วินาที, 59 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 นาที) ทำซ้ำ 40 รอบ และสุดท้ายที่ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำชิ้นส่วนยีนที่เพิ่มปริมาณโดย PCR มาโคลนเข้าสู่ T-vector (Promega, USA) จากนั้นตรวจสอบลำดับเบสด้วยวิธี DNA sequencing เพื่อยืนยันลำดับเบสของยีน partial *OsNUC1* ที่ถูกต้อง นำชิ้นส่วนยีนที่ถูกต้องมาเชื่อมใส่ในเวกเตอร์ pJim19 ซึ่งมี 35SCaMV promoter ควบคุมการทำงานของยีนอยู่ภายใน หลังจากนั้นเวกเตอร์ที่มีชิ้นส่วนของยีน partial *OsNUC1* ถูกชักนำให้เข้าสู่ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ GV3101 เพื่อใช้ในการถ่ายยีนเข้าสู่พืชต่อไป การทดลองนี้ได้ทำการถ่ายยีนเข้าสู่พืชด้วยวิธี floral dipping โดยอาศัย *Agrobacterium* เป็นพาหะ (Clough & Bent, 1998)

Arabidopsis thaliana, ecotype Columbia สายพันธุ์ดั้งเดิมใช้เป็นสายพันธุ์ควบคุมในการศึกษาในขั้นตอนต่างๆ เพื่อเปรียบเทียบกับ *Arabidopsis* ดัดแปรพันธุกรรม การคัดเลือกต้น *Arabidopsis* ดัดแปรพันธุกรรม ทำโดยการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดในสารละลาย 1.125% NaClO เป็นเวลา 15 นาที และล้างซ้ำ 4-6 ครั้งด้วยน้ำบริสุทธิ์ จากนั้นวางเมล็ดที่ผ่านการฆ่าเชื้อลงบนอาหารสูตร MS (Murashige & Skoog, 1962) และบ่มไว้ในที่มืด 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที หลังจากนั้นบ่ม *Arabidopsis* วัฏจักร 22 องศาเซลเซียส ให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงและมีมืดเป็นเวลา 8 ชั่วโมง โดยพืชดัดแปรพันธุกรรมถูกคัดเลือกในอาหารสูตร MS ซึ่งประกอบด้วย kanamycin ความเข้มข้น 50 mg/l

การศึกษาความสามารถในการทนต่อภาวะเครียดจากโลหะหนักของ *A. thaliana* ที่ได้รับการถ่ายยีน partial *OsNUC1*

เพาะเมล็ด *Arabidopsis* สายพันธุ์ปกติและสายพันธุ์ที่ได้รับการถ่ายยีน partial *OsNUC1* 3 สายพันธุ์ ได้แก่ 35S-2 35S-5 และ 35S-7 โดยทำการฟอกฆ่าเชื้อด้วย 30% clorox เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 3 รอบๆ ละ 5 นาที จากนั้นนำเมล็ดวางบนอาหารสูตร MS (Murashige & Skoog, 1962) ที่มีการเติมวิตามินและกรดอะมิโน

3% (w/v) น้ำตาลทราย และ 0.8% (w/v) ฝุ่นผง นำไปวางที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน และย้ายปลูกที่ 22 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน วางแผนการทดลองเพื่อศึกษาการเจริญของ *Arabidopsis* ทั้ง 4 สายพันธุ์เมื่อได้รับโลหะหนัก โดยทำการทดลอง 4 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ต้น ภายหลังจากการเพาะต้นกล้าเป็นเวลา 4 วัน ทำการย้ายต้นกล้าที่มีขนาดสม่ำเสมอขึ้นมาวางบนอาหารสูตร MS ที่มีการเติม 25, 50 และ 75 μM CuSO_4 หรือ 50, 75 และ 100 μM CdCl_2 ปลูกที่ 22 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน เมื่อครบกำหนดนำพีชมาชั่งน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง วิเคราะห์ความแปรปรวนของน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งต่อต้น และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

ผลการวิจัย

ภาวะเค็มชักนำให้ยีน *OsNUC1* ในข้าวแสดงออกเพิ่มขึ้นได้ทั้งในสายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123-TC171) และพันธุ์ไม่ทนเค็ม (LPT123)

จากการศึกษาการแสดงออกของยีน *OsNUC1* ในข้าวหลังจากได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 24 ชั่วโมงพบว่า ระดับการแสดงออกของยีน *OsNUC1* ในภาวะเค็มสูงกว่าในภาวะปกติ โดยมีระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่ทำการทดลอง จนกระทั่ง

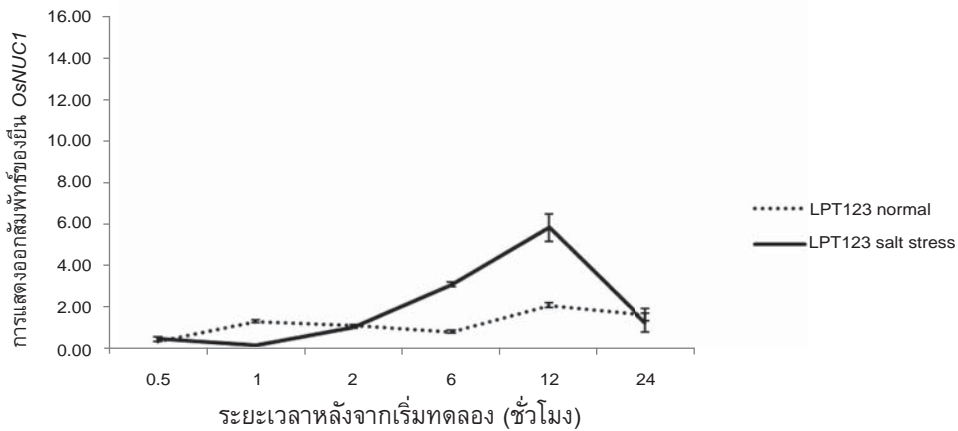
สูงสุดที่ 12 ชั่วโมงและลดลงที่ 24 ชั่วโมง เมื่อพิจารณาระหว่างพันธุ์พบว่า การแสดงออกของยีนในข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 มีระดับการแสดงออกของยีนมากกว่าในข้าวพันธุ์ไม่ทนเค็ม LPT123 ทั้งในภาวะปกติและภาวะเค็ม (ภาพที่ 1)

การตอบสนองของยีน *OsNUC1* ในข้าวหลังต่อภาวะเครียดทางกายภาพต่าง ๆ มีความแตกต่างกัน

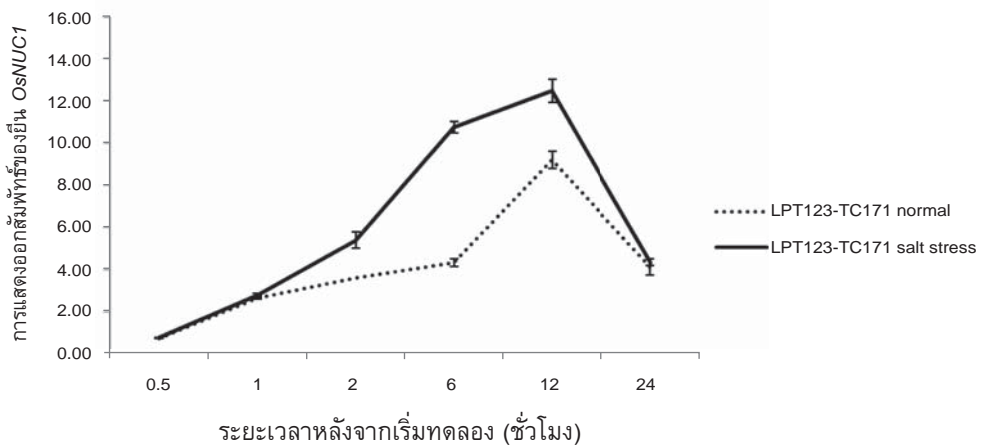
เมื่อศึกษาการแสดงออกของยีน *OsNUC1* โดยใช้เทคนิค reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) และทำการวัดความเข้มของแถบ DNA (band intensity) ของยีนในข้าวสายพันธุ์ทนเค็ม LPT123-TC171 ที่ได้รับภาวะเครียดทางกายภาพต่าง ๆ ได้แก่ ภาวะเครียดจากความแล้ง ภาวะเครียดจากโลหะหนัก (CuSO_4 และ CdCl_2) และภาวะเครียดจากความเย็น (ภาพที่ 2 ก และ ข) พบว่าการแสดงออกของยีนมีการตอบสนองที่แตกต่างกันดังนี้

ภาวะเครียดจากความแล้ง และภาวะเครียดจากโลหะหนัก CdCl_2 ชักนำให้ยีน *OsNUC1* แสดงออกเพิ่มขึ้นในช่วงแรกตั้งแต่ 0.5 ถึง 2 ชั่วโมงหลังจากได้รับภาวะเครียด ในขณะที่ CuSO_4 ชักนำให้ยีน *OsNUC1* มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนหลังจากได้รับภาวะเครียดตลอดระยะเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนภาวะเครียดจากความเย็นมีผลต่อการ

ก



ข



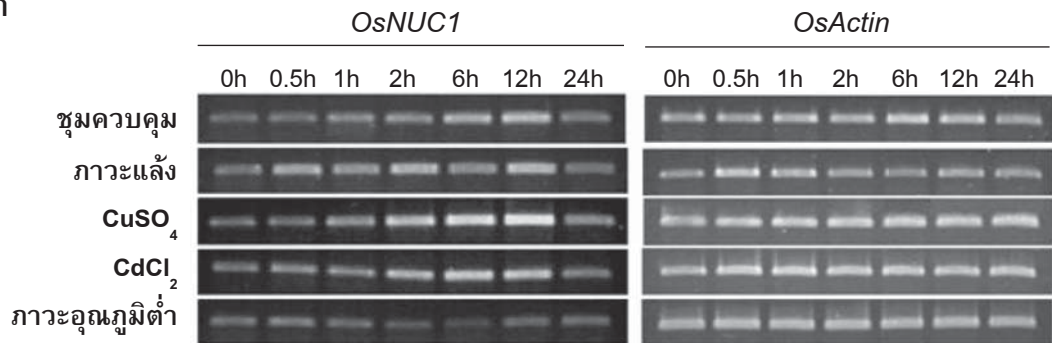
ภาพที่ 1 ระดับการแสดงออกของยีน *OsNUC1* ในข้าว LPT123 (ก) และ LPT123-TC171 (ข) หลังจากได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (สเกล = SE)

แสดงออกของยีน *OsNUC1* ที่แตกต่างจากภาวะเครียดอื่น โดยระดับการแสดงออกของยีนจะลดลงตามเวลาที่ได้รับภาวะเครียดจนต่ำที่สุดที่ 6 ชั่วโมง และค่อย ๆ เพิ่มขึ้นเล็กน้อยที่ 12 และ 24 ชั่วโมงแต่ยังคงมีระดับการแสดงออกน้อยกว่าชุดควบคุม

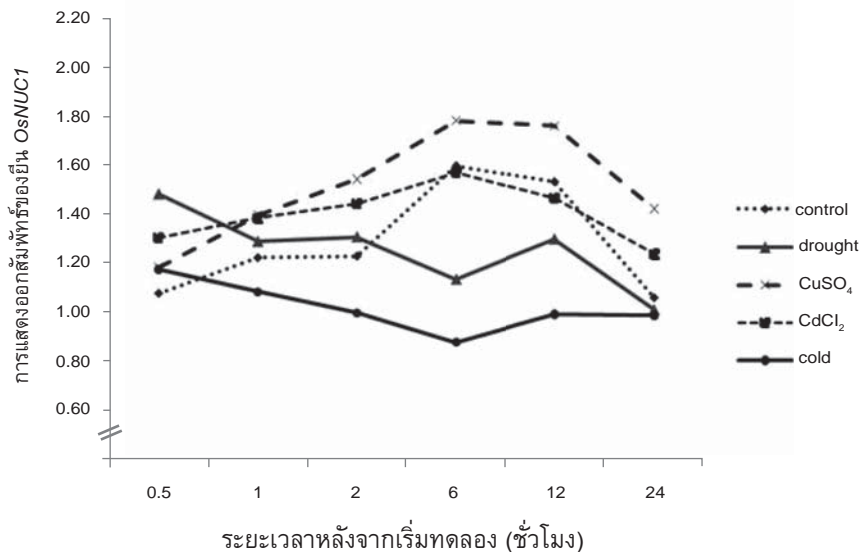
Arabidopsis ที่ได้รับการถ่ายยีน *partial OsNUC1* เจริญเติบโตในภาวะที่มีโลหะหนักได้ดีกว่า *Arabidopsis* ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน

จากการศึกษาการแสดงออกของยีนในภาวะเครียดทางกายภาพต่างๆ พบว่ามีการแสดงออกของยีน *OsNUC1* ในข้าว

ก



ข



ภาพที่ 2 ก. การแสดงออกของยีน *OsNUC1* ในข้าว LPT123-TC171 หลังจากได้รับภาวะเครียดทางกายภาพต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ข. ระดับการแสดงออกของยีน *OsNUC1* ในข้าว LPT123-TC171 หลังจากได้รับภาวะเครียดทางกายภาพต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยวิธี RT-PCR

สูงขึ้นหลังจากได้รับภาวะเครียดจากโลหะหนักทั้ง 2 ชนิด ดังนั้นจึงนำ *Arabidopsis* ที่ได้รับการถ่ายยีน partial *OsNUC1* มาทดสอบความสามารถในการทนต่อภาวะเครียดจากโลหะหนัก (CuSO_4 และ CdCl_2)

ที่ความเข้มข้นต่างๆ ผลการทดลองพบว่าโลหะหนักทั้ง 2 ชนิดมีผลทำให้การเจริญเติบโตของ *Arabidopsis* ลดลง แต่ *Arabidopsis* ที่ได้รับการถ่ายยีน ได้แก่ สายพันธุ์ 35S-2 35S-5 และ 35S-7 สามารถทนต่อภาวะเครียด

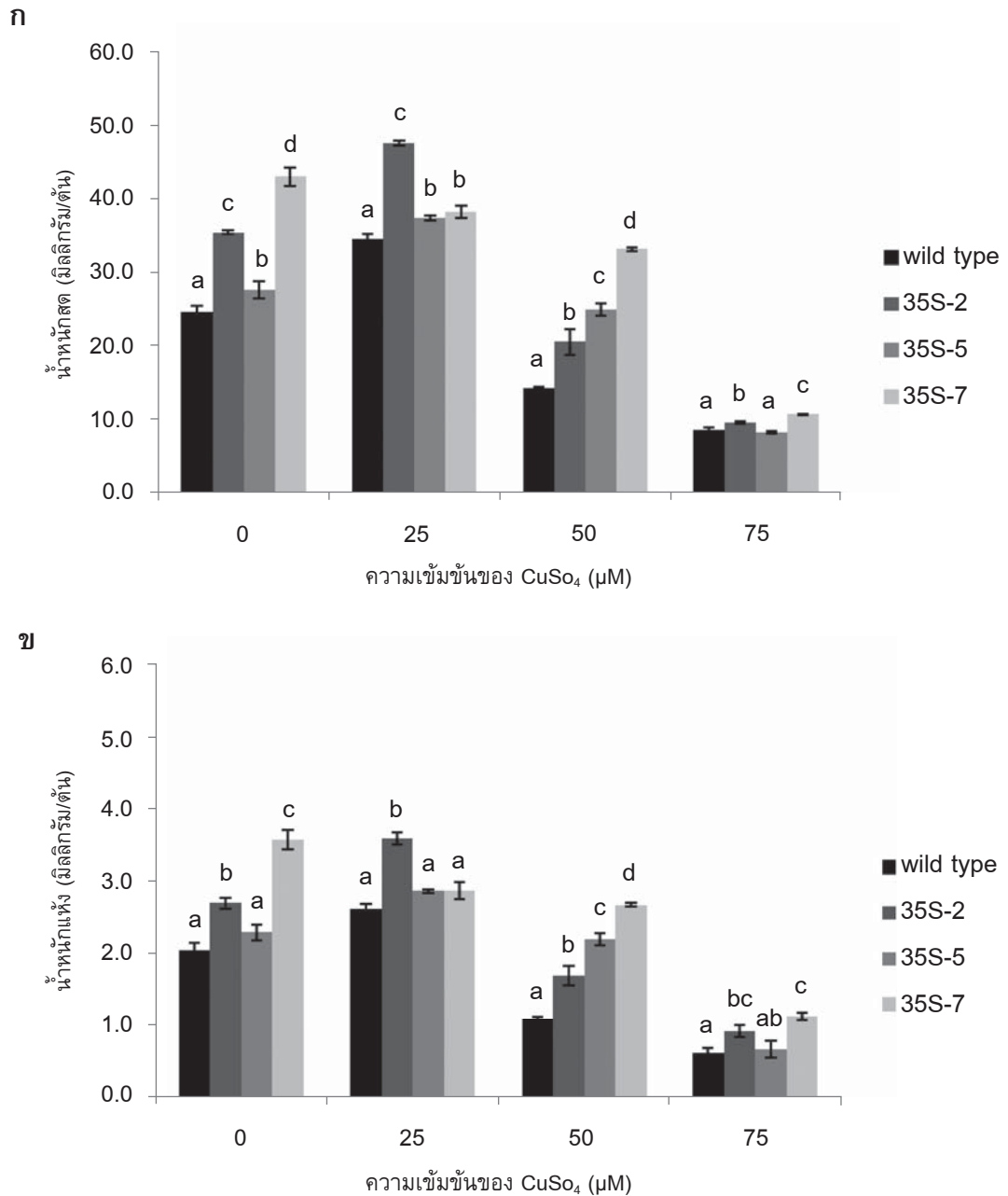
จากโลหะหนักได้มากกว่าพันธุ์ปกติ (wild type) โดยมีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งมากกว่าพันธุ์ปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกชุดการทดลอง ยกเว้นในอาหารสูตร MS ที่มีการเติม $100 \mu\text{M CdCl}_2$ น้ำหนักแห้งของทั้งพืชที่ได้รับการถ่ายยีนและพืชพันธุ์ปกติไม่มีความแตกต่างกัน (ภาพที่ 3 และ 4)

วิจารณ์ผล

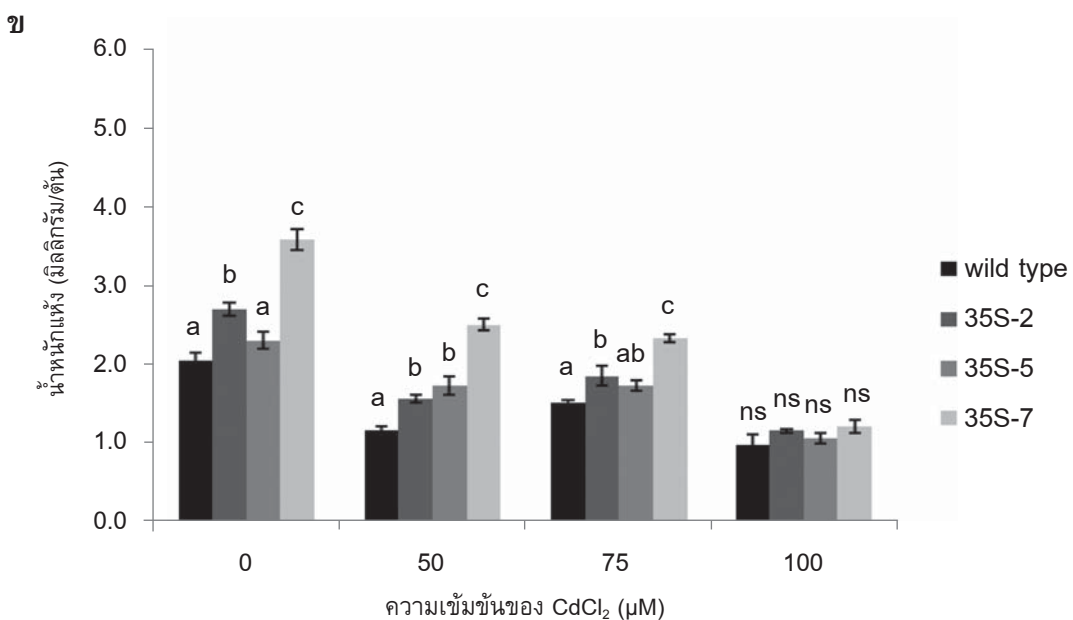
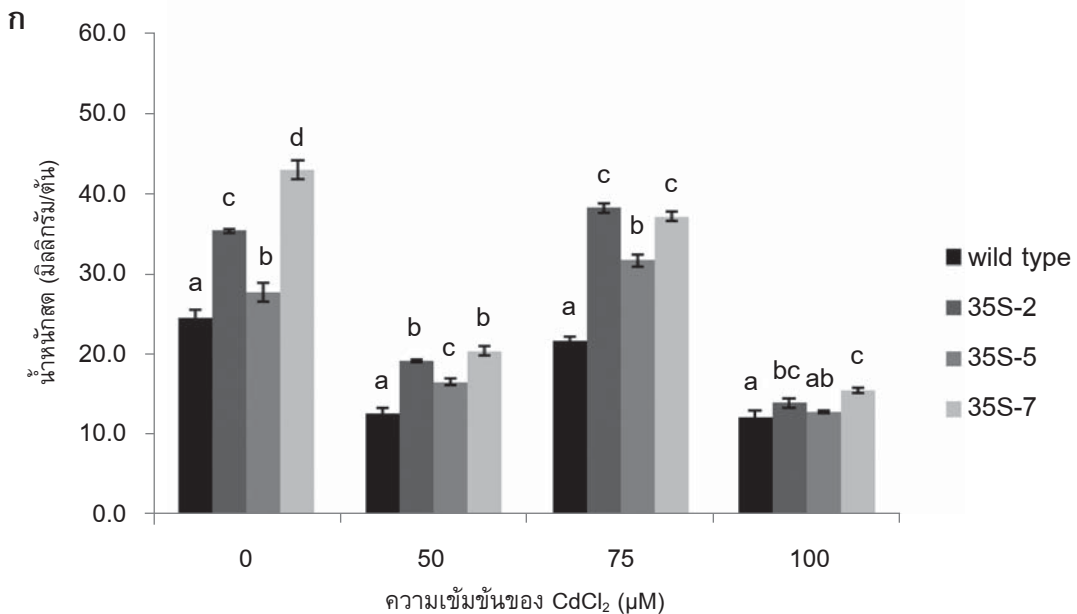
เมื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *OsNUC1* ในภาวะปกติกับในภาวะเค็ม พบว่าระดับการแสดงออกของยีนในภาวะเค็มสูงกว่าในภาวะปกติ แสดงให้เห็นว่ายีน *OsNUC1* เป็นยีนที่ตอบสนองต่อภาวะเค็ม อีกทั้งยังถูกกระตุ้นให้มีการแสดงออกมากขึ้นหลังจากได้รับภาวะเค็มภายใน 24 ชั่วโมง โดยระดับการแสดงออกสูงสุดอยู่ที่ 12 ชั่วโมง หลังจากได้รับภาวะเครียดซึ่งเริ่มเมื่อเวลา 6.00 น. ผลการทดลองนี้อาจคาดได้ว่า *OsNUC1* อาจจะมีรูปแบบการแสดงออกแบบ circadian rhythm โดยจากการศึกษาของ Heintzen *et al.* (1997) รายงานว่ายีนในกลุ่มของ glycine-rich RNA-binding proteins ซึ่งเป็นกลุ่มที่ใกล้เคียงกับโปรตีน *OsNUC1* (glycine-arginine-rich RNA-binding proteins) คือ *AtGRP7* มีรูปแบบการแสดงออกแบบ circadian rhythm โดยลักษณะการแสดงออกของยีนจะค่อย ๆ มีระดับที่สูงขึ้นจนสูงสุดในตอนค่ำจากนั้นจะลดต่ำลง ซึ่งช่วงค่า

จะตรงกับชั่วโมงที่ 12 ในการวิจัยนี้ และมีการรายงานว่าโปรตีน GRP บางชนิดมีบทบาทในการทนต่อภาวะเครียด เช่น บทบาทของโปรตีน *AtGRP2* ใน *Arabidopsis* ภายใต้ภาวะเค็ม ภาวะเย็นและออสโมติก โดยพบว่า GRP2 เพิ่มการงอกของเมล็ดในภาวะเค็ม เร่งการงอกของเมล็ดและการเจริญของต้นกล้าในภาวะเย็น แต่ไม่ส่งผลต่อการงอกของเมล็ดและการเจริญของต้นกล้าในภาวะเครียด ออสโมติก การแสดงออกของยีนดังกล่าวยังเพิ่มความสามารถในการทนต่อภาวะเย็นและภาวะเยือกแข็งได้ด้วย (Kim *et al.*, 2007)

ยีนที่ตอบสนองต่อภาวะเค็มยังอาจพบที่มีการตอบสนองกับภาวะเครียดทางกายภาพอื่นๆ อีกด้วย ดังเช่น ยีน *aldehyde dehydrogenase (AtALDH)* จาก *Arabidopsis* (Sunkar *et al.*, 2003) ซึ่งเป็นยีนที่ตอบสนองต่อความเค็ม โดยมีการแสดงออกมากขึ้นภายใน 8 ชั่วโมงหลังจากได้รับภาวะเค็ม อย่างไรก็ตามภาวะเครียดจาก H_2O_2 (oxidative stress) copper และ cadmium (heavy metal stress) สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีน *AtALDH3* ได้เช่นกัน อีกทั้งผู้วิจัยได้ทำการถ่ายยีน *AtALDH3* เข้าสู่ *Arabidopsis* เพื่อศึกษาหน้าที่ของยีน พบว่านอกจาก *Arabidopsis* ที่ได้รับการถ่ายยีนจะมีความสามารถในการทนต่อภาวะเค็มแล้ว ยังสามารถทนต่อภาวะเครียดจากความแล้ง ออกซิเดชัน และโลหะหนักได้อีกด้วย ซึ่ง



ภาพที่ 3 น้ำหนักสด (ก) น้ำหนักแห้ง (ข) ของ *Arabidopsis* เมื่อปลูกในอาหารวันสูตร MS ที่มีการเติม CuSO_4 ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 14 วัน (สเกล = SE) (wild type คือ พันธุ์ปกติ 35S-2, 35S-5, 35S-7 คือ สายพันธุ์ที่ได้รับการถ่ายยีน partial *OsNUC1*)



ภาพที่ 4 น้ำหนัสด (ก) น้ำหนักแห้ง (ข) ของ *Arabidopsis* เมื่อปลูกในอาหารวุ้นสูตร MS ที่มีการเติม CdCl₂ ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 14 วัน (สเกล = SE) (wild type คือ พันธุ์ปกติ 35S-2, 35S-5, 35S-7 คือ สายพันธุ์ที่ได้รับการถ่ายยีน partial *OsNUC1*) (ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ (P<0.05))

ลักษณะเช่นนี้ก็พบในการแสดงออกของ *OsNUC1* ดังเช่นที่เสนอไว้ในงานวิจัยนี้

การที่ *Arabidopsis* ที่ได้รับการถ่ายยีน ทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ 35S-2, 35S-5 และ 35S-7 ซึ่งต่างเป็นสายพันธุ์ที่เป็น independent transgenic lines ต่อกัน ล้วนแต่มีความสามารถในการเจริญเติบโตในอาหารที่มีโลหะหนักได้ดีขึ้นกว่าพันธุ์ปกติ แสดงให้เห็นว่าการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของ partial *OsNUC1* มีส่วนทำให้ความสามารถในการทนทานต่อโลหะหนักเพิ่มขึ้น

พิษของโลหะหนักต่อพืชมีสาเหตุหลัก 3 ประการ คือ 1. พิษอันเกิดจากโลหะหนักเข้าจับกับโปรตีนบริเวณหมู่ thioyl-, histidyl-, หรือ carboxyl- โดยตรงทำให้มีผลต่อกิจกรรมและหน้าที่ของโปรตีนต่างๆ ภายในเซลล์ 2. โลหะหนักก่อให้เกิด reactive oxygen species ซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์ และ 3. โลหะหนักบางชนิดไปเข้าแทนที่การทำงานของไอออนบางชนิด เช่น Cd^{2+} เข้าแทนที่ Ca^{2+} ในการทำงานของ Photosystem II (PSII) reaction center ทำให้เกิดการยับยั้งการกระตุ้นการทำงานของ PSII โดยแสง (Sharma & Dietz, 2008) การป้องกันตนเองของพืชจากโลหะหนักมีหลายกระบวนการทั้งการกระตุ้นการทำงานของระบบขจัดอนุมูลอิสระ (Schützendübel & Polle, 2002; Sharma & Dietz, 2008) การสังเคราะห์ phytochelatin ซึ่งมี glutathione เป็นสารตั้งต้น (Cobbet &

Goldsbrough, 2002) ซึ่ง glutathione นี้ยังมีบทบาทร่วมในระบบการขจัดอนุมูลอิสระอีกด้วย (May *et al.*, 1998) มีการรายงานว่า การเพิ่มการสังเคราะห์ phytochelatin (Zhu *et al.*, 1999) หรือ glutathione (Moontongchoon *et al.*, 2008) ในพืชตัดแปรพันธุกรรมทำให้เพิ่มความต้านทานต่อโลหะหนัก $CdCl_2$ ได้ แต่อย่างไรก็ดีกระบวนการสร้าง phytochelatin และการใช้ glutathione ในระบบการขจัดอนุมูลอิสระต้องอยู่ในสมดุล มิฉะนั้นก็อาจทำให้เกิด oxidative stress ได้ (Schützendübel & Polle, 2002; Nocito *et al.*, 2006) นอกจากนี้ในการศึกษาล่าสุดพบว่าการทำงานของ *OXS3* gene จาก *Brassica juncea* อาจมีกลไกการทำงานให้เซลล์ทนทานต่อ $CdCl_2$ โดยการตัดแปรโครมาทินทำให้สามารถปกป้องสาย DNA จากพิษของโลหะหนักหรืออาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ transcription ซึ่งนำไปสู่การแสดงออกของยีนเพื่อใช้ในการปรับตัวต่อโลหะหนัก (Blanvillain *et al.*, 2009) ดังนั้น การที่ *Arabidopsis* ตัดแปรพันธุกรรมที่มีการเพิ่มการแสดงออกของยีน *OsNUC1* บางส่วนนี้สามารถต้านทานต่อโลหะหนักได้ดีขึ้นอาจเป็นผลมาจากกระบวนการทำงานอย่างใดอย่างหนึ่งดังกล่าวข้างต้น ซึ่งน่าจะมีการศึกษาต่อไปในอนาคต

สรุป

การแสดงออกของยีน *OsNUC1* ตอบสนองต่อภาวะเครียดจากความเค็ม และถูกกระตุ้นได้ด้วยภาวะเครียดจากความแล้งและโลหะหนัก เมื่อนำ *Arabidopsis* ที่ได้รับการถ่ายยีน partial *OsNUC1* มาทดสอบความสามารถในการทนต่อภาวะเครียดจากโลหะหนัก พบว่าการแสดงออกของ partial *OsNUC1* ส่งเสริมให้ *Arabidopsis* มีความต้านทานต่อโลหะหนัก เช่น Cd^{2+} และ Cu^{2+} ได้มากขึ้น โดยมีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งมากกว่าสายพันธุ์ปกติ

เอกสารอ้างอิง

- สมพร มณีประสพสุข. 2547. การเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนในข้าว *Oryza sativa* L. พันธุ์เหลืองประทิว 123 สายพันธุ์เดิมและสายพันธุ์ทนเค็มในภาวะเค็ม. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต. สาขาวิชาพันธุศาสตร์ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- Blanvillain, R., Kim, J.H., Wu, S., Lima, A. & Ow, D.W. 2009. OXIDATIVE STRESS 3 is a chromatin-associated factor involved in tolerance to heavy metals and oxidative stress. **The Plant Journal** 57: 654-665.
- Clough, S.J. & Bent, A.F. 1998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Journal** 16: 735-743.
- Cobbett, C. & Goldsbrough, P. 2002. Phytochelatin and metallothionein: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. **Annual Review of Plant Biology** 53: 159-182.
- FAO Rice Market Monitor. 2009. **Trade and Markets Division Food and Agriculture Organization of the United Nation**. [Online]. Available from: <http://www.fao.org/docrep/012/a1004e/a1004e00.pdf> [February, 2010].
- Lischwe, M.A., Roberts, K.D., Yeoman, L.C. & Busch, H. 1982. Nucleolar specific acidic phosphoprotein C23 is highly methylated. **The Journal of Biological Chemistry** 257: 14600-14602.
- Heintzen, C., Nater, M., Apel, Ka. & Staiger, D. 1997. AtGRP7, a nuclear RNA-binding protein as a component of a circadian-regulated negative feedback loop in *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 94: 8515-8520.
- Kim, J.Y., Park, S.J., Jang, B., Jung, C.-H., Ahn, S.J., Goh, C.-H., Cho, K., Han, O. & Kang, H. 2007. Functional characterization of a glycine-rich RNA-binding protein2 in *Arabidopsis thaliana* under abiotic stress conditions. **Plant Journal** 50: 439-451.
- Mansour, M.M.F. & Salama, K.H.A. 2004. Cellular basis of salinity tolerance in plants. **Environmental and Experimental Botany** 52: 113-122.
- May, M.J., Vernoux, T., Leaver, C., Montagu, M. & Inze, D. 1998. Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development. **Journal of Experimental Botany** 49: 649-667.

- Medina, F.J., Cerdido, A. & Fernández-Gómez, M.E. 1995. Components of the nucleolar processing complex (pre-rRNA, fibrillarin and nucleolin) colocalize during mitosis and are incorporated to daughter cell nucleoli. **Experimental Cell Research** 221: 111-125.
- Moontongchoon, P., Chadchawan, S., Leepipatpiboon, N., Akaracharanya, A., Shinmyo, A. & Sano, H. 2008. Cadmium-tolerance of transgenic *Ipomoea aquatica* expressing serine acetyltransferase and cysteine synthase. **Plant Biotechnology** 25: 201-203.
- Murashige, T. & Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum** 15: 473-497.
- Nocito, F.F., Lancilli, C., Crema, B., Fourcroy, P., Davidian, J.-C. & Sacchi, G.A. 2006. Heavy metal stress and sulphate uptake in maize roots. **Plant Physiology** 141: 1138-1148.
- Pontvianne, F., Matia, I., Douet, J., Tourmente, S., Medina, F.J., Echeverria, M. & Saez-Vasquez, J. 2007. Characterization of *AtNUC-L1* reveals a central role of nucleolin in nucleolus organization and silencing of *AtNUC-L2* gene in *Arabidopsis*. **Molecular Biology of the Cell** 18: 369-379.
- Schützendübel, A. & Polle, A. 2002. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. **Journal of Experimental Botany** 53: 1351-1365.
- Sharma, S.S. & Dietz, K.-J. 2008. The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance. **Trends in Plant Science** 14: 43-50.
- Sripinyowanich, S., Maneeprasopsuk, S., Buabucha, T., Qu, L.-J., Gu, H. & Chadchawan, S. 2009. Overexpression of *OsNUC1*, a novel salt-stress responsive gene, increases growth and salt tolerance in transgenic *Arabidopsis*. **Plant Biology** 2009, Hono Lulu, Hawaii, USA. 18-22 July 2009. 136-137.
- Srivastava, M. & Pollard, H.B. 1999. Molecular dissection of nucleolin's role in growth and cell proliferation: new insights. **The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal** 13: 1911-1922.
- Sunkar, R., Bartels, D. & Kirch, H.-H. 2003. Overexpression of a stress-inducible *aldehyde dehydrogenase* gene from *Arabidopsis thaliana* in transgenic plants improves stress tolerance. **Plant Journal** 35: 452-464.
- Thikart, P., Kowanij, D., Seelanan, T., Vajrabhaya, M., Bangyeekhun, T. & Chadchawan, S. 2005. Genetic variation and stress tolerance of somaclonal variegated rice and its original cultivar. **Journal of Scientific Research of Chulalongkorn University** 30: 63-75.
- Vajrabhaya, M. & Vajrabhaya, T. 1991. Somaclonal variation of salt tolerance in rice. In: **Biotechnology in Agriculture and Forestry**. Y.P.S. Bajaj (Ed.), Vol. 14, pp. 368-382. Springer-Verlag, Berlin.

Zhu, Y.L., Pilon-Smits, E.A.H., Tarun, A.S., Weber, S.U., Jouanin, L. & Terry, N. 1999. Cadmium tolerance and accumulation in Indian mustard is enhanced by overexpressing γ -glutamylcysteine synthetase. **Plant Physiology** 121: 1169-1177.

การใช้ 1-เมทิลไซโคลโพรเพนยืดอายุหลังการเก็บเกี่ยวของกล้วยไม้สกุลมอดคารา

Use of 1-Methylcyclopropene to prolong postharvest longevity of *Mokara*

พนัสดา ทับบรจ¹ กุลนาถ ออบสุวรรณ² และ กนกวรรณ เสรีภาพ^{3*}

PANUSDA TUBBUNJONG¹, KULLANART OBSUWAN² AND KANOGWAN SERAYPHEAP^{3*}

¹ หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พญาไท กรุงเทพฯ 10330

¹ Program in Biotechnology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

² ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร พระราชวังสนามจันทร์ นครปฐม 73000

² Department of Biology, Faculty of Science, Silpakorn University, Nakhon Pathom 73000, Thailand

³ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พญาไท กรุงเทพฯ 10330

³ Department of Botany, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

บทคัดย่อ. กล้วยไม้เป็นไม้ดอกที่มีความสวยงาม มีสีสันหลากหลาย และมีอายุการปักแจกันที่ยาวนาน จึงเป็นที่นิยมของผู้บริโภคในตลาดโลก อย่างไรก็ตามการส่งออกกล้วยไม้ยังประสบปัญหาการเหี่ยวและการหลุดร่วงของดอกก่อนเวลาอันควรเนื่องจากการตอบสนองต่อเอทิลีนในบรรยากาศ ทำให้อายุการปักแจกันลดน้อยลง ดังนั้นจึงทำการทดลองเปรียบเทียบการใช้ 1-เมทิลไซโคลโพรเพนความเข้มข้นต่างๆในการยืดอายุหลังการเก็บเกี่ยวของกล้วยไม้สกุลมอดคารา ผลการทดลอง พบว่า การใช้ 1-เมทิลไซโคลโพรเพนที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 100, 250 และ 500 ppb ร่มช่อดอกสามารถชักนำให้ช่อดอกมีอายุการปักแจกันนานขึ้นและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยการรมที่ความเข้มข้น 250 ppb สามารถยืดอายุการหลุดร่วงของดอกได้ดี

* Corresponding author: kanogwan.k@chula.ac.th

ที่สุด นอกจากนี้การทดลองแช่ในสารละลายเอทิลฟอนที่ความเข้มข้น 500 ppm หลังการรมด้วย 1-เมทิลไซโคลโพรพีน ที่ความเข้มข้น 250 ppb สามารถยืดอายุการปักแจกันของช่อดอกกล้วยไม้ได้นานที่สุดเช่นกัน

ABSTRACT. Orchid is of commercial importance and popular in the global market for its attractive inflorescence and long vase-life. However, there are still problems with cut flowers quality in respond to ethylene exposure which leading to premature wilting or abscission of flower parts or whole buds. This research studied the use of 1-methylcyclopropene to prolong postharvest longevity of *Mokara* by comparing different concentrations of 1-MCP treatment including 100, 250 and 500 ppb prior to storage. The results indicated that the inflorescences fumigated with all 1-MCP treatments significantly prolong the shelf life and the treatment with 250 ppb 1-MCP could delay the abscission of florets. Moreover, 250 ppb of 1-MCP treatment following by dipping in 500 ppm ethephon can significantly delay the florets abscission of *Mokara*.

คำสำคัญ: 1-เมทิลไซโคลโพรพีน, มอคคารา, เอทิลฟอน

KEYWORDS: 1-Methylcyclopropene, *Mokara*, ethephon

บทนำ

มอคคารา (*Mokara*) เป็นกล้วยไม้ตัดดอกที่มีความสำคัญและเป็นที่ต้องการของตลาดโลกเป็นอย่างมาก เนื่องจากมีความสวยงามบานทนนานและมีสีสันทันตึงใส บางชนิดยังมีกลิ่นหอมอีกด้วย ประเทศไทยจัดว่าเป็นประเทศที่มีการส่งออกกล้วยไม้เมืองร้อนมากเป็นอันดับหนึ่งของโลก และธุรกิจการส่งออกกล้วยไม้ตัดดอกสามารถสร้างรายได้ให้กับประเทศปีละหลายพันล้านบาท ตลาดส่งออกที่สำคัญของกล้วยไม้ตัดดอกของไทยได้แก่

ญี่ปุ่น อิตาลี และละตินอเมริกา กล้วยไม้ที่มีการส่งออกในมูลค่าสูง ได้แก่ กล้วยไม้สกุลหวาย สกุลอะแรนดา สกุลมอคคารา สกุลออนซีเดียม และสกุลแวนดา (กรมวิชาการเกษตร, 2548; สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2550) แต่การส่งออกกล้วยไม้ไทยก็ยังประสบกับปัญหาสำคัญคือ อายุการปักแจกันของช่อดอกกล้วยไม้นั้นสั้นกว่าความต้องการของผู้ส่งออกและตลาด ซึ่งเป็นปัญหาใหญ่ในการส่งไม้ตัดดอกออกสู่ตลาดโลก ส่วนสาเหตุที่ทำให้อายุการปักแจกันของดอกไม้เหล่านั้นไม่

ยาวนานตามต้องการนั้นเนื่องมาจากการผลิตเอทิลีนของดอกไม้เองและจากสิ่งแวดล้อมภายนอกเป็นปัจจัยหลัก ทำให้ดอกเกิดการเหี่ยวและร่วงในที่สุด ส่งผลทำให้อายุการปักแจกันของดอกสั้นลง จากรายงานการศึกษาที่ผ่านมา การยืดอายุการปักแจกันของไม้ตัดดอกมีการใช้สารละลายซิลเวอร์ไธโอซัลเฟต (STS) แต่ก็พบกับปัญหาที่สำคัญอย่างหนึ่งคือ STS ก่อให้เกิดสารตกค้างในสิ่งแวดล้อม จากรายงานที่ผ่านมาพบว่า 1-เมทิลไซโคลโพรพีน (1-MCP) มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับ STS คือ ช่วยชะลอการหลุดร่วงของดอกตูม ดอกบาน และใบ ยับยั้งการทำงานของเอทิลีนและยังสามารถช่วยลดอัตราการหายใจในดอกไม้และการสลายของคลอโรฟิลล์ได้ (Blankenship & Dole, 2003) จากผลการทดลองของ Serek *et al.* (1995) ได้เลือกใช้ 1-MCP ในการยับยั้งการทำงานของเอทิลีนในดอกไม้ เพราะว่าสารนี้ไม่ส่งผลเสียต่อดอกไม้และค่อนข้างที่จะเสถียรเมื่ออยู่ในสภาวะแวดล้อมที่ปกติ ในดอกไม้ *Dianthus caryophyllus* L. 'Sandra' พบว่าอัตราการปักแจกันของดอกนั้นเพิ่มขึ้น ส่วนในดอกไม้ *Antirrhinum majus* L. และดอกไม้ *Penstemon hartwegii* Benth. × *P. cobaea* Nutt. 'Firebird' พบว่าอายุการปักแจกันของดอกนั้นเพิ่มขึ้นเช่นกัน และในดอกไม้ 'White Sim' carnation นั้นมีอายุการปักแจกันนานกว่าดอกไม้ที่ไม่ได้ให้สาร 1-MCP ก่อนการเก็บรักษา

เช่นเดียวกับการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างสาร 1-MCP กับ STS ในดอกไม้ *Alstroemeria*, *Antirrhinum*, *Consolida*, *Dianthus*, *Matthiola* และ *Penstemon* พบว่าอายุการปักแจกันของดอกไม้ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ สาร 1-MCP นั้นสามารถยืดอายุการปักแจกันของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์อรุณไวท์ได้ (กุลนาถ ออบสุวรรณ และคณะ, 2550) และสามารถยับยั้งการผลิตเอทิลีนในกล้วยไม้สกุลหวายอีกด้วย (Uthaichay *et al.*, 2007)

การทดลองในครั้งนี้จึงมุ่งหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสาร 1-MCP ที่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการเปลี่ยนแปลงหรือชะลอการวายของช่อดอกกล้วยไม้มอคคารา 'Judy Lim' สีแดงเพื่อให้ได้ประสิทธิภาพสูงที่สุดในการรักษาคุณภาพและยืดอายุหลังการเก็บเกี่ยวของช่อดอกกล้วยไม้

วิธีการทดลอง

การเตรียมพืชทดลอง

คัดเลือกช่อมอคคารา 'Judy Lim' สีแดงจากสวนคุณกิตติ เพื่อนบัวผัน อ.บางใหญ่ จ.นนทบุรี โดยใช้ช่อดอกที่มีความยาวเฉลี่ย 40-50 เซนติเมตร ใช้ระยะเวลาในการขนส่งถึงห้องทดลอง 2 ชั่วโมง บันทึกจำนวนดอกตูมและดอกบานในแต่ละช่อ

การทดสอบการใช้สาร 1-เมทิลไซโคลโพรพีน (1-MCP)

หาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ 1-MCP ในการรักษาคุณภาพหลังการเก็บเกี่ยวและการยืดอายุการปักแจกันของมอคคารา 'Judy Lim' สีแดง โดยรม 1-MCP ความเข้มข้น 100, 250 และ 500 ppb เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ก่อนเก็บรักษาช่อดอกกล้วยไม้ไว้ในห้องควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส ทำการทดลองทั้งหมด 4 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ช่อดอก บันทึกผลการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาการวายของดอกกล้วยไม้ทุก 3 วัน โดยบันทึกจำนวนดอกย่อยที่หลุดร่วง ให้คะแนนคุณภาพของกลีบดอก วัดการเปลี่ยนแปลงสีของกลีบดอกโดยใช้เครื่องวัดสี (Color Reader รุ่น CR-10) จนกระทั่งดอกย่อยหลุดร่วงไป 50% ของช่อดอก นำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติแบบ One way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

การทดสอบการใช้สาร 1-เมทิลไซโคลโพรพีน (1-MCP) ร่วมกับการใช้สารละลายเอทิลฟอน (ethephon)

หาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ 1-MCP ในการรักษาคุณภาพหลังการเก็บเกี่ยวและการยืดอายุการปักแจกันของมอคคารา 'Judy Lim' สีแดง โดยรม 1-MCP ความเข้มข้น 100, 250 และ 500 ppb เป็นเวลา 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำช่อดอกกล้วยไม้ไปแช่ในสาร

ละลายเอทิลฟอน ความเข้มข้น 500 ppm ก่อนเก็บรักษาช่อดอกกล้วยไม้ไว้ในห้องควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส ทำการทดลองทั้งหมด 4 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ช่อดอก บันทึกผลการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาการวายของดอกกล้วยไม้ทุก 3 วัน โดยบันทึกจำนวนดอกย่อยที่หลุดร่วง ให้คะแนนคุณภาพของกลีบดอก วัดการเปลี่ยนแปลงสีของกลีบดอกโดยใช้เครื่องวัดสี จนกระทั่งดอกย่อยหลุดร่วงไป 50% ของช่อดอก นำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติแบบ One way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

จากการทดลองให้สาร 1-MCP ความเข้มข้นต่างๆ กับช่อดอกมอคคารา 'Judy Lim' สีแดงหลังการเก็บเกี่ยว พบว่าสาร 1-MCP สามารถชะลอการร่วงของดอกย่อยดอกแรกและการร่วงของดอกย่อย 50% ของช่อดอกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ทั้งในชุดการทดลองที่ไม่ได้แช่เอทิลฟอนและแช่เอทิลฟอน (ภาพที่ 1) โดยสาร 1-MCP ที่ความเข้มข้น 250 และ 500 ppb ช่วยชะลอการหลุดร่วงของดอกย่อยดอกแรกได้ถึง 10 วันในชุดการทดลองที่ไม่ได้แช่เอทิลฟอน และสาร 1-MCP ทุกความเข้มข้นสามารถชะลอการหลุดร่วงของดอกย่อยดอกแรกได้ 6-10 วันในชุดการทดลองที่ได้แช่เอทิลฟอน ส่วนการชะลอการหลุดร่วงของดอกย่อย

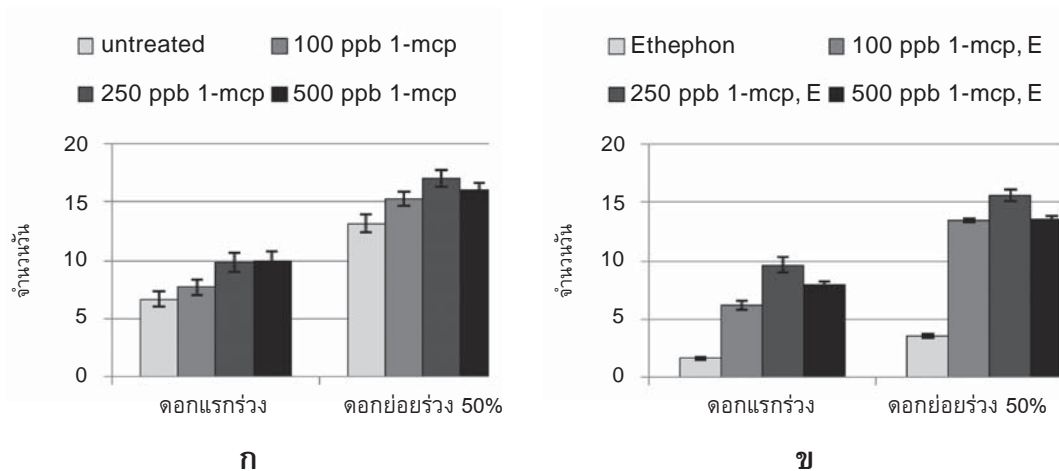
50% นั้น พบว่า ที่ความเข้มข้น 250 ppb สามารถช่วยยืดอายุการปักแจกันของดอกมอคคารา 'Judy Lim' สีแดงทั้งในชุดการทดลองที่ไม่ได้แช่และแช่ในเอทิฟอนได้ดีที่สุด

ส่วนคะแนนคุณภาพของกลีบดอกมอคคารา 'Judy Lim' สีแดง หลังจากที่ได้ รับการรมสาร 1-MCP ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันทั้งในชุดการทดลองที่ไม่ได้แช่เอทิฟอน และแช่เอทิฟอน (ภาพที่ 2) พบว่า ในชุดการทดลองที่ไม่ได้แช่ในสารละลายเอทิฟอน 500 ppm ในวันที่ 1 และ 3 ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในระหว่างชุดการทดลอง แต่ในวันที่ 6 ถึงวันที่ 15 นั้น การให้สาร 1-MCP ทุกความเข้มข้นช่วยชะลอการวายของกลีบดอกได้โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดควบคุมที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยเฉพาะที่ความเข้มข้น 250 ppb นั้น สามารถช่วยชะลอการวายของกลีบดอกได้ดีที่สุด แต่อย่างไรก็ตาม พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับความเข้มข้นอื่นๆ

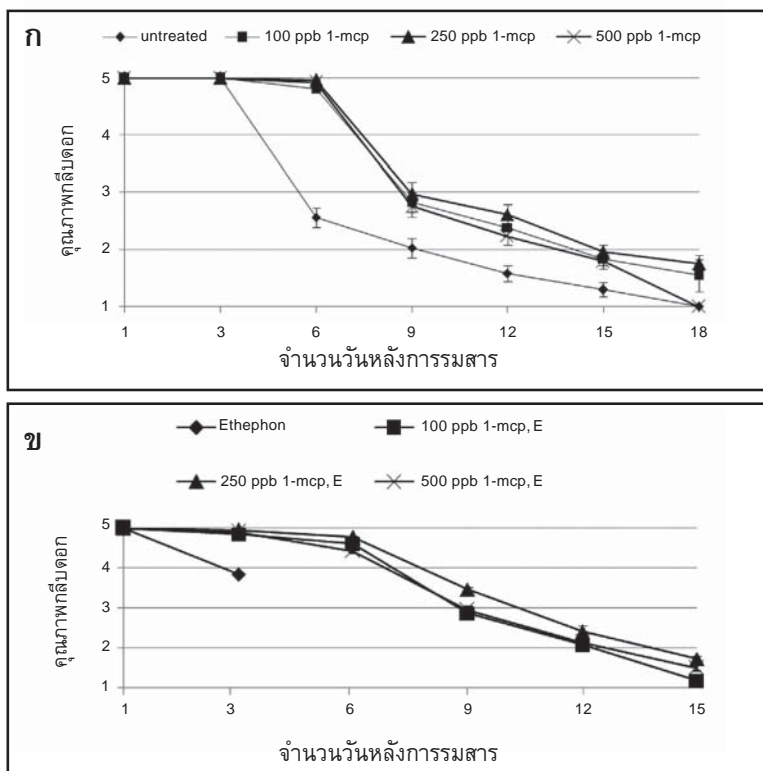
การวัดค่าการเปลี่ยนแปลงสีโดยพิจารณาจากค่าความสว่างของกลีบดอก (L), ค่าความเข้มของกลีบดอก (c) และค่าสีกลีบดอก (h) ของกลีบดอกมอคคารา 'Judy Lim' สีแดง หลังจากที่ได้รับสาร 1-MCP ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ชุดการทดลองไม่แช่ในสารละลายเอทิฟอน 500 ppm พบว่า ในวันที่ 6, 9 และ 12 ค่า L ซึ่งเป็นค่า

ความสว่างของกลีบดอกและค่า h ซึ่งเป็นค่าการเปลี่ยนแปลงของสีกลีบดอก มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดควบคุม แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่า c ส่วนชุดการทดลองที่แช่ในสารละลายเอทิฟอน 500 ppm เนื่องจากในวันที่ 3 ไปนั้น ชุดควบคุมดอกย่อยได้หลุดร่วงไป 50% ของช่อดอกแล้ว จึงไม่สามารถวัดค่าการเปลี่ยนแปลงสีหลังจากนั้นได้ อย่างไรก็ตาม ค่า L, c และ h ของกลีบดอกมอคคาราแดงที่ได้รับการรมสาร 1-MCP ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างชุดการทดลองที่ความเข้มข้นต่างๆ (ภาพที่ 3 (ข))

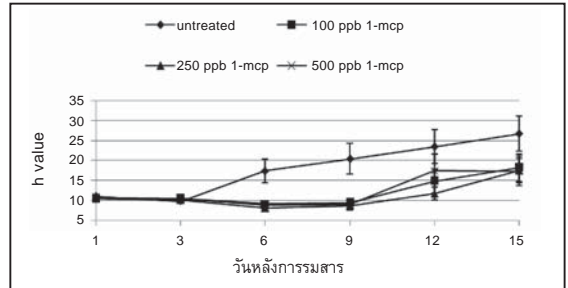
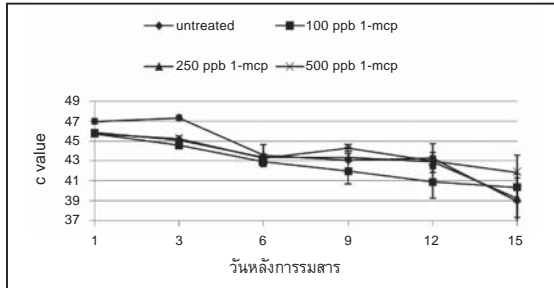
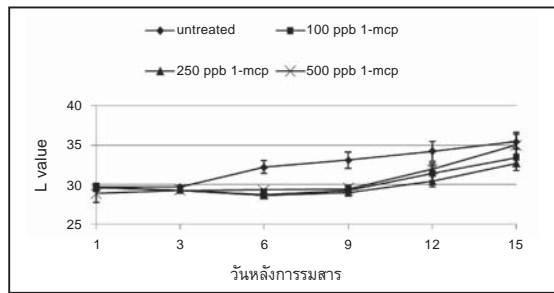
จากผลการทดลองข้างต้น พบว่าการใช้สาร 1-MCP ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 100, 250 และ 500 ppb รมช่อดอกมอคคารา 'Judy Lim' สีแดง สามารถชักนำให้ช่อดอกมีอายุการปักแจกันนานขึ้น และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยการรมที่ความเข้มข้น 250 ppb สามารถยืดอายุการหลุดร่วงของดอกได้ดีที่สุด ทั้งนี้ เนื่องจากสาร 1-MCP สามารถจับกับตัวรับเอทิลีน ทำให้กีดขวางการทำงานของเอทิลีนได้ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของศิริพิมล หงส์เหม และคณะ (2550) ที่พบว่าสาร 1-MCP ช่วยยืดอายุการปักแจกันและชะลอการเสื่อมของช่อกกล้วยไม้ลูกผสมพันธุ์ *Mokara*



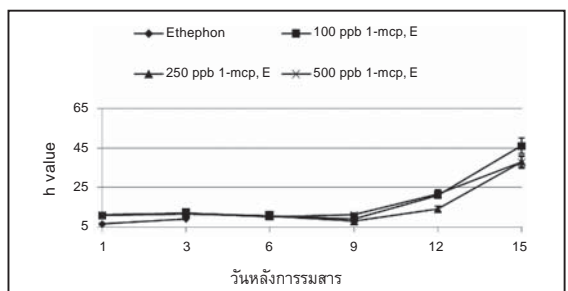
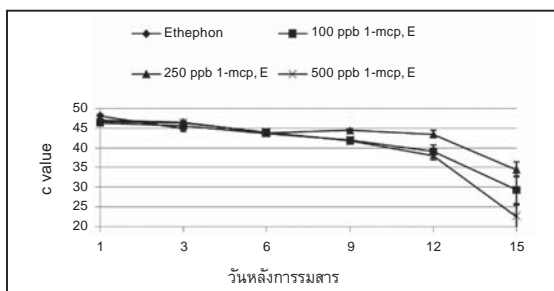
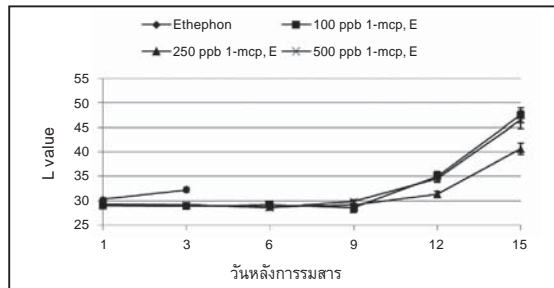
ภาพที่ 1 ค่าเฉลี่ยอายุการปักแจกันของดอกมอศคารา ‘Judy Lim’ สีแดง หลังจากที่ได้รับ การรมสาร 1-เมทิลไซโคลโพรพีน ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน (ก) ไม่แช่ในสารละลายเอทิฟอน (ข) แช่ในสารละลายเอทิฟอนความเข้มข้น 500 ppm



ภาพที่ 2 คะแนนคุณภาพของกลีบดอกมอศคารา ‘Judy Lim’ สีแดง หลังจากที่ได้รับ การรมสาร 1-เมทิลไซโคลโพรพีน ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน (ก) ไม่แช่ในสารละลายเอทิฟอน (ข) แช่ในสารละลายเอทิฟอนที่ความเข้มข้น 500 ppm



ก



ข

ภาพที่ 3 การเปลี่ยนแปลงสี (L, c, h value) ของกลีบดอกมอดแครา 'Judy Lim' สีแดง หลังจากที่ได้รับการรมสาร 1-เมทิลไซโคลโพรพีน ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน (ก) ไม่แช่ในสารละลายเอทิลฟอน (ข) แช่ในสารละลายเอทิลฟอนที่ความเข้มข้น 500 ppm

'Jairak Gold' เช่นเดียวกับผลการวิจัยของ Porat *et al.* (1995) ที่พบว่าสาร 1-MCP สามารถช่วยชะลอการเสื่อมในดอก Phlox (*Phlox paniculata*) อีกทั้งช่วยในการยับยั้งการผลิตเอทิลีนในกล้วยไม้สกุลหวายได้ (Uthaichay *et al.*, 2007) นอกจากนี้การทดลองแช่ในสารละลายเอทิลีนที่ความเข้มข้น 500 ppm ซึ่งมีผลเช่นเดียวกับการได้รับเอทิลีนในบรรยากาศและกระตุ้นให้เกิดหลุดร่วงของดอกย่อย ทำให้เกิดการวายของช่อดอกมอคคารา 'Judy Lim' สีแดงเร็วขึ้น แต่หลังการรมด้วย 1-เมทิลไซโคลโพรพีนที่ความเข้มข้นต่างๆ สามารถยับยั้งผลของเอทิลีนได้ ทำให้ยืดอายุการปักแจกันของช่อดอกกล้วยไม้ได้เช่นกัน

สรุปผลการทดลอง

การใช้สาร 1-เมทิลไซโคลโพรพีนที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 100, 250 และ 500 ppb รมช่อดอกมอคคารา 'Judy Lim' สีแดงหลังการเก็บเกี่ยว สามารถยืดอายุการปักแจกันของช่อดอก และช่วยชะลอการหลุดร่วงของดอกย่อยและการวายของกลีบดอกได้ โดยการให้สาร 1-MCP ความเข้มข้น 250 ppb สามารถช่วยยืดอายุการปักแจกัน และชะลอการหลุดร่วงของดอกย่อยและการวายของกลีบดอกได้ดีที่สุด

เอกสารอ้างอิง

- กรมวิชาการเกษตร. 2548. ข้อมูลการส่งออกกล้วยไม้. <http://www.doa.go.th> (12 พฤษภาคม 2551).
- กุลนาถ อบสุวรรณ สุภาพร สังข์งาม และ อภิรดี อุทัยรัตนกิจ. 2550. ผลของความเข้มข้น 1-MCP ต่ออายุการใช้งาน ของดอกกล้วยไม้หวายลูกผสมสายพันธุ์อรุณไวท์. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 6 (พิเศษ): 263-266.
- ศิริพิมล หงส์เหม วิไลภรณ์ บุญญกิจจินดา อภิรดี อุทัยรัตนกิจ และ กุลนาถ อบสุวรรณ. 2550. ผลของ 1-MCP ต่อ อายุการปักแจกันของกล้วยไม้ลูกผสม Mokara Jairak Gold. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 6 (พิเศษ): 70-73.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2550. การนำเข้า-ส่งออก. <http://www.oae.go.th> (8 พฤษภาคม 2551).
- Blankenship, S.M. & Dole, J.M. 2003. 1-Methylcyclopropene: a review. **Postharvest Biology and Technology** 28: 1-25.
- Porat, R., Shlomo, E., Serek, M., Sisler, E.C. & Borochoy, A. 1995. 1-Methylcyclopropene inhibits ethylene action in cut phlox flowers. **Postharvest Biology and Technology** 6: 313-319.
- Serek, M., Sisler, E.C. & Reid, M.S. 1995. Effects of 1-MCP on vase life and ethylene response of cut flowers. **Plant Growth Regulation** 16: 93-97.
- Uthaichay, N., Ketsa, S. & Van Doorn, W.G. 2007. 1-MCP pretreatment prevents bud and flower abscission in *Dendrobium* orchids. **Postharvest Biology and Technology** 43: 374-380.

วารสารพฤษศาสตร์ไทย

สมาคมพฤษศาสตร์ในพระบรมราชูปถัมภ์ และองค์การสวนพฤษศาสตร์

ข้อแนะนำสำหรับผู้เขียน

วารสารพฤษศาสตร์ไทยตีพิมพ์ผลงานวิจัย และบทความวิชาการทางด้านพืช สาหร่าย เห็ดรา ไลเคนส์ และหัวข้ออื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง และเป็นงานวิจัยที่ไม่เคยเผยแพร่หรือตีพิมพ์ในวารสารใดมาก่อน บทความวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์จะต้องผ่านการพิจารณาจากผู้ทรงคุณวุฒิ วารสารพฤษศาสตร์ไทยมีกำหนดจัดพิมพ์ปีละ 2 เล่ม ในเดือนมิถุนายน และธันวาคม สำหรับผู้ที่ส่งบทความวิจัยเพื่อพิจารณาตีพิมพ์ควรเป็นสมาชิกของสมาคมพฤษศาสตร์

การส่งต้นฉบับ

บทความสามารถเขียนเป็นภาษาอังกฤษ หรือภาษาไทยที่มีความถูกต้องของการใช้ภาษา บทความภาษาไทยต้องมีบทคัดย่อภาษาอังกฤษ ผู้เขียนต้องส่งต้นฉบับบทความวิจัย จำนวน 3 ชุด พร้อมซีดีไฟล์ข้อมูล จำนวน 1 แผ่น และจดหมายนำส่งมาที่บรรณาธิการจัดการตามที่อยู่ข้างล่างนี้

ดร.พิมพ์วิดิ พรพงษ์รุ่งเรือง

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002

ผู้เขียนจะได้รับทราบผลการพิจารณาบทความวิจัยว่ายอมรับเพื่อตีพิมพ์ ปฏิเสธ หรือต้องมีการแก้ไขภายใน 2 เดือน กรณีที่มีการแก้ไขทางวารสารจะส่งไปให้ผู้เขียนดำเนินการแก้ไขปรับปรุง หากต้องการทราบข้อมูลเพิ่มเติมสามารถติดต่อบรรณาธิการจัดการที่ email: ppimwa@kku.ac.th

การเตรียมต้นฉบับ

ต้นฉบับบทความควรมีความยาวไม่เกิน 20 หน้า ต้นฉบับบทความภาษาไทยต้องพิมพ์ด้วยอักษร

Browallia New ขนาด 16 pt ส่วนต้นฉบับภาษาอังกฤษพิมพ์ด้วยอักษร Times New Roman ขนาด 12 pt พิมพ์บรรทัดเว้นสองบรรทัด ระยะห่างจากขอบด้านละ 2.5 ซม. บทความประกอบด้วย ชื่อเรื่อง ชื่อผู้เขียน สถาบันที่สังกัด บทคัดย่อ คำสำคัญ บทนำ วิธีการศึกษา ผลการวิจัย อภิปรายผลการศึกษา กิตติกรรมประกาศ และเอกสารอ้างอิง หรืออาจมีภาคผนวก

ชื่อเรื่อง ชื่อเรื่องต้องสั้นกะทัดรัดและมีค่าที่แสดงข้อมูลเกี่ยวกับการวิจัย บทความภาษาไทยพิมพ์ด้วยอักษร Browallia New ขนาด 20 pt ตัวหนา ต้องเขียนทั้งภาษาอังกฤษและภาษาไทย บทความภาษาอังกฤษพิมพ์ด้วยอักษร Times New Roman ขนาด 16 pt ตัวหนา

ชื่อผู้เขียน ให้ระบุชื่อผู้เขียน บทความภาษาไทยพิมพ์ด้วยอักษร Browallia New ขนาด 16 pt ตัวหนา ต้องเขียนทั้งภาษาอังกฤษและภาษาไทย บทความภาษาอังกฤษพิมพ์ด้วยอักษร Times New Roman ขนาด 12 pt ตัวหนา สถาบันที่สังกัด ที่อยู่ของสถาบัน และอีเมลโทรนิคเมลล์ ของผู้วิจัยที่เป็นผู้ประสานงาน บทความภาษาไทยพิมพ์ด้วยอักษร Browallia New ขนาด 14 pt ตัวหนา ต้องเขียนทั้งภาษาอังกฤษและภาษาไทย บทความภาษาอังกฤษพิมพ์ด้วยอักษร Times New Roman ขนาด 10 pt ตัวหนา

บทคัดย่อ ต้องเขียนบทคัดย่อที่สรุปความสำคัญของเนื้อหา มีความยาวไม่เกิน 250 คำ บทความภาษาไทยพิมพ์ด้วยอักษร Browallia New ขนาด 16 pt ต้องเขียนทั้งภาษาอังกฤษและภาษาไทย บทความภาษาอังกฤษพิมพ์ด้วยอักษร Times New Roman ขนาด 12 pt

คำสำคัญ ควรมี 3-5 คำ บทความภาษาไทยพิมพ์ด้วยอักษร Browallia New ขนาด 16 pt ต้องเขียนทั้งภาษาอังกฤษและภาษาไทย บทความภาษาอังกฤษพิมพ์ด้วยอักษร Times New Roman ขนาด 12 pt

เนื้อหาบทความวิจัย บทความภาษาไทยพิมพ์ด้วยอักษร Brouallia New ขนาด 16 pt บทความภาษาอังกฤษพิมพ์ด้วยอักษร Times New Roman ขนาด 12 pt การเขียนชื่อวิทยาศาสตร์ หรือชื่อละตินเขียนตัวอักษรเอนเท่านั้น ให้ระบุตำแหน่งของภาพประกอบ และ/หรือตาราง ด้วยดินสอดตรงขอบของบทความ

การอ้างอิงในเนื้อหาในกรณีอ้างอิงบทความภาษาไทยให้ใช้ ชื่อ นามสกุล และคณะ (ปี) หรือ (ชื่อ นามสกุล และคณะ, ปี) เช่น ประนอม จันทรโณทัย และคณะ (2551) หรือ (ประนอม จันทรโณทัย และคณะ, 2551) กรณีอ้างอิงบทความภาษาอังกฤษ ให้ใช้ นามสกุล (ปี) หรือ (นามสกุล, ปี) เช่น Chantaranothai *et al.* (2008) หรือ (Chantaranothai *et al.*, 2008) หากอ้างอิงจากงานวิจัยมากกว่า 1 เรื่องให้เรียงลำดับตามปีที่พิมพ์โดยคั่นด้วยเครื่องหมายอัฒภาค (;)

ภาพประกอบ และตาราง ให้เรียงตามลำดับการใช้ อักษรตัวเลขวารบิค ภาพและตารางจะต้องมีการอ้างอิง ในเนื้อความโดยใส่ว่า ตารางที่ และ ภาพที่ ในการส่งต้นฉบับให้แยกตารางและภาพประกอบออกจากส่วนเนื้อหา โดยจัดไว้หน้าท้ายสุดของต้นฉบับ

การตีพิมพ์ภาพสี่ เจ้าของบทความจะต้องรับผิดชอบค่าใช้จ่ายในการจัดพิมพ์ โดยติดต่อสอบถามราคาจากบรรณารักษ์การจัดการ

หน่วย หน่วยที่ใช้ตามเกณฑ์ของ Systeme International d'Unités (SI)

เอกสารอ้างอิง บทความภาษาไทยพิมพ์ด้วยอักษร Brouallia New ขนาด 14 pt บทความภาษาอังกฤษพิมพ์ด้วยอักษร Times New Roman ขนาด 10 pt การอ้างอิงวารสารให้เขียนชื่อเต็มของวารสาร การเรียงเรียงเอกสารอ้างอิงให้จัดเรียงตามลำดับอักษรภาษาไทยและตามด้วยภาษาอังกฤษ ตัวอย่างรูปแบบการเขียนดังนี้

วารสาร

Norsaengsri, M. & Chantaranothai, P. 2008. A revised taxonomic account of *Paspalum* L. (Poaceae) in Thailand. **The Natural History Journal of Chulalongkorn University** 8: 99-119.

หนังสือ

เชาวน์ ชิโนรักษ์ และ พรรณี ชิโนรักษ์. 2528. **ชีววิทยา 3**. พิมพ์ครั้งที่ 5. บูรพาสาส์น, กรุงเทพฯ

Ma, H. 2006. **A molecular portrait of *Arabidopsis meiosis***. American Society of Plant Biologists, Rockville, Maryland.

บทความในหนังสือ

ธวัชชัย สันติสุข. 2532. พรรณพฤษชาติของประเทศไทย: อดีต ปัจจุบันและอนาคต. ใน: **ความหลากหลายทางชีวภาพในประเทศไทย**. สิริวัฒน์ วงศ์ศิริ และ ศุภชัย หล่อโลหการ (บรรณาธิการ). หน้า 81-90. สำนักพิมพ์ประชาชน, เชียงใหม่.

D'Arcy, W.G. 1979. The classification of the Solanaceae. In: **The biology and taxonomy of the Solanaceae**. J.G. Hawkes, R.N. Lester & A.D. Skelding (Eds.), pp. 3-48. Academic Press, London.

Renner, S. S., Clausen, G., Cellinese, N. & Meyer, K. 2001. Melastomataceae. In: **Flora of Thailand**. T. Santisuk & K. Larsen (Eds.), Vol. 7 part 3, pp. 412-497. Prachachon, Bangkok.

วิทยานิพนธ์

พิมพ์วดี พรพจน์รุ่งเรือง. 2544. **อนุกรมวิธานของพืชเผ่า Inuleae (Asteraceae) ในประเทศไทย**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทบัณฑิต สาขาชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

Thitimetharoch, T. 2004. **Taxonomic studies of the family Commelinaceae in Thailand**. Ph.D. Thesis, Khon Kaen University.

กิตติกรรมประกาศ การเขียนกิตติกรรมประกาศควรเขียนให้สั้นกะทัดรัด

ต้นฉบับบทความที่จัดพิมพ์ ผู้ประสานงานจะได้รับต้นฉบับบทความที่จัดพิมพ์แล้ว จำนวน 5 ชุด พร้อมไฟล์ PDF ของบทความวิจัย จำนวน 1 ชุด

Thai Journal of Botany

The Botanical Society under the Royal Patronage of Her Majesty the Queen
and The Botanical Garden Organization

Guide to authors

THAI JOURNAL OF BOTANY publishes original research papers and review article of relevance of all plant groups, algae, fungi and lichens and related subjects. The papers submitted are considered for publication on the understanding that they have not been published or accepted for publication elsewhere. Manuscripts are submitted to referees for evaluation. TJB is published twice a year, in June and December. Authors are encouraged to be member of the Botanical Society.

SUBMISSION OF MANUSCRIPTS

Manuscript should be consistently written in English or Thai. The manuscript in Thai have to provide an abstract on both languages. Authors are responsible for submitting their text to linguistic revision prior to submission. Manuscript should be submitted in three printout copies with CD and along with a cover letter to the managing editor at the following address:

Dr. Pimwadee Pornpongrueng
Department of Biology, Faculty of Science,
Khon Kaen University
Khon Kaen 40002, Thailand

Authors will generally be notified of acceptance, rejection, or need for revision within two months. In case of extensive editing, the manuscripts will be returned to the author for approval or revision. For further information please contact managing editor at ppimwa@kku.ac.th

PREPARATION OF MANUSCRIPTS

Length of Manuscripts should not exceed 20 pages. Manuscript in Thai language should be written with 16 pt Browalia New font, whereas English manuscript should be prepared with 12 pt Times New Roman, all with double-space the entire manuscript. All

margins should be 2.5 cm. The manuscript includes Title, Author (s), Institutes, Abstract, Keywords, Introduction, Materials and methods, Results, Discussion, Acknowledgements, References and Appendices, if necessary.

Titles should be short and contain words useful for indexing and information retrieval. The manuscript in Thai should be typed in Browalia New font, 20 pt, bold face, whereas English manuscript should be typed in Times New Roman font, 16 pt, bold face.

Author (s) includes author's name, manuscript in Thai have to provide in English and Thai languages, typing with Browalia New font, 16 pt, whereas English manuscript should be typed in Times New Roman font, 12 pt.. Institutes, postal address and corresponding author's e-mail address should be provided in Browalia New font, 14 pt for the manuscript in Thai, and Times New Roman font, 10 pt for the English manuscript.

Abstract should not exceeding 250 words in each language. The results of the work should be briefly presented. The manuscript in Thai should be typed in Browalia New font, 16 pt, whereas English manuscript should be typed in Time New Roman font, 12 pt.

Keywords should be provided with 3-5 words. The manuscript in Thai should be typed in Browalia New font, 16 pt, and provided both Thai and English, whereas English manuscript should be typed in Time New Roman font, 12 pt.

Text should be typed in Browalia New font, 16 pt for Thai manuscript and Time New Roman font, 12 pt for English manuscript. Latin names should be written in Italics. Approximate position of illustrations and/or tables in the text should be indicated with pencil in the margin.

In the text references are given as Chantaranothai *et al.* (2008), or, when appropriate, as (Chantaranothai

et al., 2008). If citing more than one reference by the author, cite chronologically and separate by commas. If citing references by different authors, cite chronologically and separate with semicolons between each author(s).

Figure and Table should have consecutive Arabic numerals. They are cited in the text as Table and Fig. They are appended separately at the end of the manuscript. Colour plates may be included at the author's expense. Contact the managing editor for price.

Units should conform to Systeme International d'Unités (SI).

References in Thai manuscript should be provided with Browalia New font, 14 pt whereas in English manuscript should be Time New Roman font, 10 pt. The journal name should be written out in full. List references in alphabetical order. Examples:

Journal:

Norsaengsri, M. & Chataranothai, P. 2008. A revised taxonomic account of *Paspalum* L. (Poaceae) in Thailand. **The Natural History Journal of Chulalongkorn University** 8: 99-119.

Book:

Ma, H. 2006. **A molecular portrait of *Arabidopsis meiosis***. American Society of Plant Biologists, Rockville, Maryland.

Book Chapter:

D'Arcy, W.G. 1979. The classification of the Solanaceae. In: **The Biology and Taxonomy of the Solanaceae**. J.G. Hawkes, R.N. Lester, & A.D. Skelding (Eds.), pp. 3-48. Academic Press, London.

Thesis:

Pornpongrueng, P. 2001. Taxonomy of tribe Inuleae (Asteraceae) in Thailand. Master of Science Thesis in Biology, Graduate School, Khon Kaen University. (in Thai)

Thitimetharoch, T. 2004. **Taxonomic studies of the family Commelinaceae in Thailand**. Ph.D. Thesis, Khon Kaen University

Acknowledgements keep them short.

Offprints. Five offprints are supplied free of charge and one PDF file will be sent to corresponding author.



สมาคมพฤกษศาสตร์ในพระบรมราชูปถัมภ์

สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ อ.แมริม จ.เชียงใหม่ 50180
โทร. 053-841001, e-mail : bots@qsbg.org , www.qsbg.org/bots

ใบสมัครสมาชิก

เลขที่สมาชิก.....

วันที่สมัคร.....

ชื่อ นาย/นาง/นางสาว.....

Name (Mr./Mrs./Miss).....

วัน/เดือน/ปีเกิด.....

สถานภาพ โสด สมรส อื่นๆ.....

ชื่อคู่สมรส สามเณร/ภรรยา.....

ที่อยู่.....

โทรศัพท์ (Tel.)..... โทรสาร (Fax)..... อีเมล (E-mail).....

ที่ทำงาน.....

โทรศัพท์..... โทรสาร.....

อาชีพ ข้าราชการ พนักงานรัฐวิสาหกิจ เอกชน

นักศึกษา อื่นๆ.....

ตำแหน่ง.....

การศึกษา ต่ำกว่าปริญญาตรี ปริญญาตรี ปริญญาโท ปริญญาเอก

ความสามารถพิเศษ.....

ความสนใจเกี่ยวกับงานทางด้านพฤกษศาสตร์

อนุกรมวิธาน สรีรวิทยา สัตุนานวิทยา

นิเวศวิทยา กายวิภาค ชีวโมเลกุล

เทคโนโลยีชีวภาพ อื่นๆ.....

สมัครสมาชิกประเภท

สมาชิกสามัญ (ตลอดชีพ ค่าสมัคร 1,000 บาท) สมาชิกสมทบ (1 ปี ค่าสมัคร 100 บาท)

ลงชื่อ.....

(.....)

ผู้สมัคร

สำหรับเจ้าหน้าที่

ชำระเงิน ใบเสร็จรับเงิน บัตรสมาชิก

อื่นๆ.....

ลงชื่อ.....

(.....)

...../...../.....



