

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของไม้วงศ์ก่อในป่าขุนแม่กวงจังหวัดเชียงใหม่



นางสาว เพลินพิศ ไชคชัยชำนาญกิจ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2548

ISBN 974-17-7005-7

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

GENETIC DIVERSITY OF FAGACEAE AT KHUN MAE KUONG FOREST , CHIANG MAI PROVINCE

Miss Ploenpit Chokchaichamnankit

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Doctor of Philosophy Program in Biological Sciences

Faculty of science

Chulalongkorn University

Academic Year 2005


ISBN 974-17-7005-7

**481737**

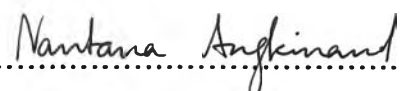
Thesis Title                      Genetic diversity of Fagaceae at Khun Mae Kuong Forest,  
Chiang Mai Province  
By                                      Miss Ploenpit Chokchaichamnankit  
Filed of study                      Biological Sciences  
Thesis Advisor                      Associate Professor Warawut Chulalaksananukul, Ph.D.  
Thesis Co-advisor                      Professor Kesara Anamthawat-Jónsson, Ph.D.

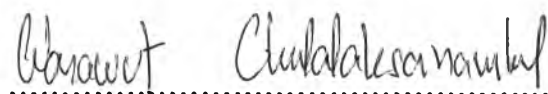
---

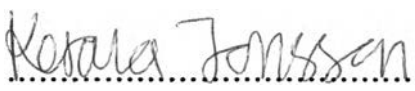
Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment  
of the Requirements for the Doctor's Degree

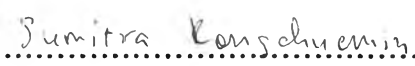
  
..... Dean of Faculty of Science  
(Professor Piamsak Menasveta, Ph.D.)

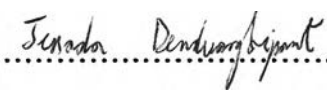
THESIS COMMITTEE


  
..... Chairman  
(Associate Professor Nantana Angkinand)

  
..... Thesis Advisor  
(Associate Professor Warawut Chulalaksananukul, Ph.D.)

  
..... Thesis Co-advisor  
(Professor Kesara Anamthawat-Jónsson, Ph.D.)

  
..... Member  
(Associate Professor Sumittra Kongcheunsin)

  
..... Member  
(Assistant Professor Jessada Denduangboripant, Ph.D.)

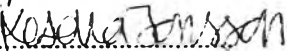
  
..... Member  
(Chamlong Phengklai, Ph.D.)

เพลินพิศ ไชคชัยชำนาญกิจ : ความหลากหลายทางพันธุกรรมของไม้วงศ์ก่อในป่าขุนแม่กวง  
จังหวัดเชียงใหม่. (GENETIC DIVERSITY OF FAGACEAE AT KHUN MAE KUONG FOREST,  
CHIANG MAI PROVINCE) อ. ที่ปรึกษา : รศ.ดร. วรวิมล จุฬาลักษณ์นากุล, Prof. เกษรา อนาม  
ธวัช-จอนสัน, PhD, 120 หน้า. ISBN 974-17-7005-7.

พรรณไม้วงศ์ก่อทางภาคเหนือของประเทศไทยประกอบไปด้วยสกุลหลัก 3 สกุล ได้แก่ *Castanopsis*,  
*Lithocarpus* และ *Quercus* ซึ่งแต่ละสกุลมีความหลากหลายของชนิดสูง การศึกษานี้ได้เลือกพื้นที่ป่าขุนแม่กวง อำเภอ  
ดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่ โดยพื้นที่ศึกษามีขนาด 550 ตารางกิโลเมตร โดยเลือกสภาพป่าที่แตกต่างกันคือ ป่าดิบเขา  
ซึ่งมีความสูงจากระดับน้ำทะเลโดยเฉลี่ย 1000-1800 เมตร และป่าผลัดใบซึ่งมีระดับความสูงจากระดับน้ำทะเลต่ำกว่า  
800 เมตร ทำการเก็บตัวอย่างไม้วงศ์ก่อจำนวน 146 ต้น โดยเก็บตัวอย่างใบ ดอก และผลเพื่อใช้ในการจัดจำแนกชนิด เก็บ  
ตัวอย่างใบอ่อน เพื่อใช้ศึกษาดีเอ็นเอ และตัวอย่างตาใบรวมทั้งตาดอก และรากเพื่อศึกษาโครโมโซม จากการศึกษา  
อนุกรมวิธานโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สามารถจัดจำแนกชนิดของไม้วงศ์ก่อได้ทั้งสิ้น 30 ชนิด โดย จำนวน 12  
ชนิดอยู่ในสกุล *Castanopsis* จำนวน 7 ชนิดอยู่ในสกุล *Lithocarpus* และจำนวน 11 ชนิดอยู่ในสกุล *Quercus* ซึ่งไม้วงศ์  
ก่อสกุล *Castanopsis* จะพบมากในพื้นที่ป่าดิบเขา และไม้วงศ์ก่อสกุล *Quercus* จะพบมากในป่าผลัดใบ ส่วนไม้วงศ์ก่อ  
สกุล *Lithocarpus* นั้นจะพบในทุกสภาพป่า จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างชนิดด้วยวิธี restriction fragment  
length polymorphism (RFLP) และ inter simple sequence repeats (ISSR) นั้น พบว่าไม้วงศ์ก่อส่วนใหญ่ถูกจัด  
จำแนกกลุ่มตามสกุล ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลทางอนุกรมวิธาน โดยไม้วงศ์ก่อสกุล *Castanopsis* มีความหลากหลายทาง  
พันธุกรรมค่อนข้างสูง ในขณะที่ไม้วงศ์ก่อสกุล *Quercus* มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้เคียงกันมาก ส่วนไม้วงศ์ก่อ  
สกุล *Lithocarpus* นั้นมีรูปแบบความหลากหลายทางพันธุกรรมที่แตกต่างกัน โดยข้อมูลที่ได้แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่ามี  
การถ่ายทอดยีนระหว่างสกุล *Lithocarpus* และสกุล *Castanopsis* และมีการถ่ายทอดยีนระหว่างสกุล *Lithocarpus* และ  
สกุล *Quercus* ซึ่งการถ่ายทอดยีนทั้งสองแบบนี้ น่าจะเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดรูปแบบความหลากหลายทาง  
พันธุกรรมของไม้วงศ์ก่อสกุล *Lithocarpus* ในพื้นที่นี้ นอกจากนี้ได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไม้วงศ์ก่อ  
ด้วยโครโมโซม และจีโนม จากคาริโอไทป์ และด้วยวิธี fluorescence *in situ* hybridization (FISH) โดยใช้ 18S-25S และ  
5S ribosomal gene ทำแผนที่ยีนบนโครโมโซม ซึ่งผลการศึกษาพบว่าไม้วงศ์ก่อเกือบทุกชนิดมีจำนวนโครโมโซมเป็นดิพ  
พลอยด์ ( $2n = 24$ ) และมีรูปแบบคาริโอไทป์ใกล้เคียงกันมาก รวมทั้งมีตำแหน่งของ ribosomal gene บนโครโมโซมที่  
คล้ายคลึงกัน แต่อย่างไรก็ตามพบว่าไม้ก่อบางต้นแสดงความเป็น aneuploid และ polyploidy และผลจาก FISH แสดง  
ให้เห็นว่าไม้ก่อบางต้นเป็นลูกผสม ผลจากการศึกษาความหลากหลายของไม้วงศ์ก่อด้วยวิธีทางด้านเซลล์พันธุศาสตร์นี้  
ให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุลและการศึกษาด้านอนุกรมวิธาน

สาขาวิชา...วิทยาศาสตร์ชีวภาพ.....ลายมือชื่อนิสิต.....

ปีการศึกษา...2548.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

# # 4473823723 : MAJOR BIOLOGICAL SCIENCES

KEY WORD: FAGACEAE / CASTANOPSIS / LITHOCARPUS / QUERCUS / GENETIC DIVERSITY / FLUORESCENCE IN SITU HYBRIDIZATION (FISH)

PLOENPIT CHOKCHAICHAMNANKIT : GENETIC DIVERSITY OF FAGACEAE AT KHUN MAE KUONG FOREST, CHIANG MAI PROVINCE.

THESIS ADVISOR : ASSOC.PROF.Dr. WARAWUT CHULALAKSANANUKUL, PhD THESIS CO-ADVISOR : PROF. KESARA ANAMTHAWAT-JÓNSSON, Ph.D., 120pp. ISBN 974-17-7005-7.

Fagaceae in northern Thailand consists mainly of three genera: *Castanopsis*, *Lithocarpus* and *Quercus*, each with extensive species diversity. A selected study area of about 550 km<sup>2</sup> called *Pa Khun Mae Kuong* at Doi Saket district in Chiang Mai province including two different types of habitats: hill evergreen forests at relatively high elevation (1000-1800 m) and deciduous forests at altitudes below 800 m. Samples were collected from 146 trees: leaves, fruits (acorns) and flowers for taxonomic identification; young leaves for DNA extraction; and leaf buds for chromosome isolation, although occasionally flower buds and root tips were also used. Based on the morphological characters, 30 species were identified from this collection, consisting of 12 *Castanopsis*, 11 *Quercus* and 7 *Lithocarpus* species. *Castanopsis* was dominant in Hill evergreen forests, whereas *Quercus* occurred mainly in Deciduous forests. *Lithocarpus* was found in all forest types. The genetic relationship among these species was analysed using data on restriction fragment length polymorphism (RFLP) in the 18S-25S ribosomal genes (rDNA) and inter-simple sequence repeats (ISSR). The results included (1) clear separation of the genera and of most species, supporting the taxonomic classification, (2) *Castanopsis* being genetically diverse, *Quercus* relatively homogeneous, but *Lithocarpus* showing a split diversity, and (3) strong indication of gene flow between *Castanopsis* and *Lithocarpus*, and between *Lithocarpus* and *Quercus*, which may have been the reason behind the diversity pattern of *Lithocarpus* in this region. The species and genetic diversity was also analysed using chromosome and genome data, from karyotypes and fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) mapping of the 18S-25S and 5S ribosomal genes on chromosomes. Most species were found to be diploid ( $2n = 24$ ), with relatively conserved karyotypes and ribosomal gene maps within each genus. Nevertheless, aneuploid and polyploid samples were detected and the FISH analysis indicated hybridity in some samples. The cytogenetic results confirmed the molecular and taxonomic diversity of this plant group.

Field of study..Biological Sciences...Student's signature.....

Academic year..2005.....Advisor's signature.....

Co-advisor's signature.....

*Plouy Ch*

*Warawut Chulalaksanankul*

*Kesara Jónsson*

## Acknowledgements

I would like to express my sincere gratitude to my supervisor, Associate Professor Dr. Warawut Chulalaksananukul, and my co-supervisor, Professor Dr. Kesara Anamthawut-Jónsson, for accepting me to work in their laboratories, the excellent guidance, valuable suggestions, patience, and strong encouragements throughout the study.

I am grateful to Associate Professor Nantana Angkinand, chairman of dissertation committee for her precious advice. I also would like to express my appreciation to Associate Professor Sumittra Kongcheunsin, Dr. Chamlong Phengklai, and Assistant Professor Dr. Jessada Denduangboripant, members of the dissertation committee, for their valuable advice.

My warmest thanks is due to Dr. Chamlong Phengklai for providing valuable information and his kind guidance and encouragements on taxonomic work.

I am most grateful for the research students and fellows at the Botany Department of Chulalongkorn University, the staff of the Icelandic Laboratory for Plant Genetics of the University of Iceland, the staff of *Huai Hong Khrai* Royal Development Study Centre in Chiang Mai, and all the friends who helped with the field work.

I would like to acknowledge the financial support from the Thailand Research Fund through the Royal Golden Jubilee PhD Program (RGJ Grant No. PHD/0073/2546), the Icelandic PhD Research Student Funds, the University Development Committee (UDC), Ministry of University Affairs, and Graduate School of Chulalongkorn University.

Finally, I would like to dedicate all the best of my dissertation to my glorious parents and my beloved brothers and sisters for their love, encouragement, help and understanding during my study.

# Contents

	Page
THAI ABSTRACT.....	iv
ENGLISH ABSTRACT.....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	viii
LIST OF FIGURES.....	ix
CHAPTER I INTRODUCTION.....	1
CHAPTER II LITERATURE REVIEW.....	5
2.1 Family Fagaceae.....	5
2.2 Molecular methods in genetic diversity studies.....	8
2.3 Molecular cytogenetics in genome studies.....	12
CHAPTER III MATERIALS AND METHODS.....	17
3.1 Field work .....	17
3.2 Molecular genetics study.....	21
3.3 Karyotype analysis and molecular cytogenetics study.....	23
CHAPTER IV RESULTS.....	28
4.1 Species diversity from field work study.....	28
4.2 Genetic diversity.....	32
4.3 Genomic diversity.....	41
CHAPTER V DISCUSSION.....	59
5.1 Species diversity and forest resources.....	59
5.2 Species diversity and genetic diversification.....	62
5.3 Genomic diversity.....	65
CHAPTER VI CONCLUSIONS.....	71
REFERENCES.....	73
APPENDICES.....	84
BIOGRAPHY.....	120

**List of Tables**

<b>Table</b>		<b>Page</b>
<b>3.1</b>	Plant materials used in this study.....	20
<b>3.2</b>	ISSR primer sequences.....	23
<b>4.1</b>	The species diversity study, number of trees examined and samples used in the DNA analysis.....	31
<b>4.2</b>	RFLP fragments generated by Southern hybridisation.....	35
<b>4.3</b>	The number and approximate size of ISSR fragments.....	37
<b>4.4</b>	Chromosome number of Fagaceae species.....	42
<b>4.5</b>	Number of 45S rDNA and 5S rDNA loci on chromosome of Fagaceae species.....	49



## List of Figures

Figure	Page
3.1 Three different types of forest: Hill evergreen forest, Hill evergreen forest with pine, and Dry deciduous forest.....	18
3.2 Map of the study site, <i>Khun Mae Kuong Forest</i> , at Doi Saket district, Chiang Mai province.....	19
4.1 Fagaceae trees, flowers, and acorns.....	30
4.2 Luminographs of ribosomal RFLP after Southern hybridisation.....	33
4.3 Genetic relationships in Fagaceae at <i>Khun Mae Kuong Forest</i> , based on restriction fragment length polymorphism (RFLP) in the 18S-5.8S-25S ribosomal genes (rDNA).....	36
4.4 Agarose gel electrophoresis showing inter-simple sequence repeats (ISSR).....	38
4.5 Genetic relationships in Fagaceae at <i>Khun Mae Kuong Forest</i> , based on inter-simple sequence repeats (ISSR).....	40
4.6 Metaphase chromosome of <i>C. echinocarpa</i> , <i>C. ferox</i> , <i>L. polystachyus</i> , <i>Q. kingianus</i> , <i>Q. lenticellatus</i> , and <i>Q. myrsinaefolius</i> Blume.....	43
4.7 Mitotic metaphases and karyotypes of <i>C. acuminatissima</i> , <i>C. argentea</i> , <i>C. armata</i> , <i>C. calathiformis</i> , <i>C. cerabrina</i> , and <i>C. diversifolia</i> .....	44
4.8 Mitotic metaphases and karyotypes of <i>C. fissa</i> , <i>C. indica</i> , <i>C. tribuloides</i> , <i>L. ceriferus</i> , <i>L. elegans</i> , and <i>L. harmandianus</i> .....	45
4.9 Mitotic metaphases and karyotypes of <i>L. recurvatus</i> Barnett, <i>L. vestitus</i> , <i>Q. brandisianus</i> , <i>Q. mespilifolius</i> , and <i>Q. rex</i> .....	46
4.10 Meiotic chromosome of <i>C. incica</i> .....	47
4.11 Mitotic metaphases and karyotypes of <i>Q. lenticellatus</i> (Sample RD17).....	47

## List of Figures (cont.)

Figure	Page	
4.12	Fluorescence in situ hybridisation of the 18S-25S and 5S rDNA to interphase chromatin mitotic metaphase chromosomes and meiotic chromosomes of <i>C. argentea</i> , <i>C. acuminatissima</i> , and <i>C. indica</i> ....	50
4.13	Fluorescence in situ hybridisation of the 18S-25S and 5S rDNA to mitotic metaphase chromosomes and interphase chromatin of <i>C. cerabrina</i> .....	51
4.14	Fluorescence in situ hybridisation of the 18S-25S and 5S rDNA to mitotic metaphase chromosomes of <i>C. armata</i> , <i>C. diversifolia</i> , and <i>C. fissa</i> .....	52
4.15	Fluorescence in situ hybridisation of the 18S-25S to interphase chromatin and mitotic metaphase chromosomes of <i>C. tribuloides</i> and <i>L. ceriferus</i> .....	53
4.16	Fluorescence in situ hybridisation of the 18S-25S and 5S rDNA to interphase chromatin of <i>L. elegans</i> and mitotic metaphase chromosomes of <i>L. polystachyus</i> .....	54
4.17	Fluorescence in situ hybridisation of the 18S-25S and 5S rDNA to mitotic metaphase chromosomes of <i>Q. brandisianus</i> and <i>Q. kerrii</i> ..	55
4.18	Fluorescence in situ hybridisation of the 18S-25S and 5S rDNA to interphase chromatin and mitotic metaphase chromosomes of <i>C. calathiformis</i> .....	56
4.19	Fluorescence in situ hybridisation of the 18S-25S and 5S rDNA to interphase chromatin and mitotic metaphase chromosomes of <i>L. vestitus</i> .....	57
4.20	Fluorescence in situ hybridisation of the 18S-25S and 5S rDNA to mitotic metaphase chromosomes of <i>Q. lenticellatus</i> .....	58
4.21	Idiogram showing localization of 18S-25S and 5S ribosomal genes on chromosomes of <i>Castanopsis</i> , <i>Lithocarpus</i> , and <i>Quercus</i> .....	58