

การศึกษาทบทวนอนุกรมวิธานของ *Hoya parasitica* complex ในประเทศไทย

นายมานิต กิตอยู่

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2547

ISBN 974-17-6747-1

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

TAXONOMIC REVISION OF THE *Hoya parasitica* complex IN THAILAND

Mr. Manit Kidyue

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

Faculty of Science

Chulalongkorn University

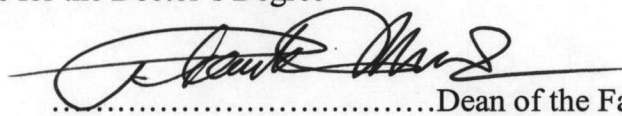
Academic year 2004

ISBN 974-17-6747-1

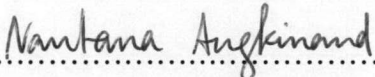
Thesis Title TAXONOMIC REVISION OF THE *Hoya parasitica*  
complex IN THAILAND  
By Mr. Manit Kidyue  
Field of Study Biological Science  
Thesis Advisor Associate Professor Thaweesakdi Boonkerd, Ph.D.  
Thesis Co-advisor Associate Professor Obchant Thaithong, Ph.D.  
Tosak Seelanan, Ph.D.

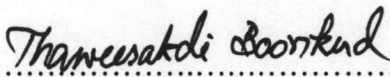
---

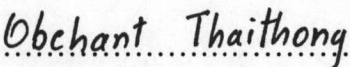
Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment  
of the Requirements for the Doctor's Degree

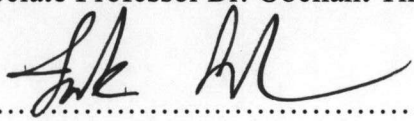
  
.....Dean of the Faculty of Science  
(Professor Piamsak Menasveta, Ph.D.)

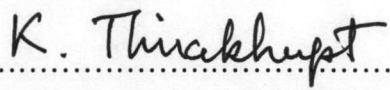
THESIS COMMITTEE

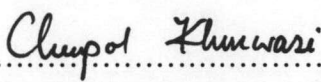
  
.....Chairman  
(Associate Professor Nantana Angkinand)

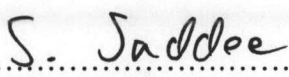
  
.....Thesis Advisor  
(Associate Professor Dr. Thaweesakdi Boonkerd)

  
.....Thesis Co-Advisor  
(Associate Professor Dr. Obchant Thaithong)

  
.....Thesis Co-Advisor  
(Dr. Tosak Seelanan)

  
.....Member  
(Assistant Professor Dr. Kumthorn Thirakhupt)

  
.....Member  
(Dr. Chumpol Khunwasi)

  
.....Member  
(Dr. Somran Suddoe)

มานิต คีตอยู่ : การศึกษาบทบาทอนุกรมวิธานของ *Hoya parasitica* complex ในประเทศไทย  
(TAXONOMIC REVISION OF THE *Hoya parasitica* complex IN THAILAND) อ. ที่  
ปรึกษา: รศ.ดร.ทวีศักดิ์ บุญเกิด, อ.ที่ปรึกษาร่วม: รศ.ดร.อบจันท์ ไทยทอง, ดร.ต่อศักดิ์  
ลีลานันท์, 127 หน้า. ISBN 974-17-6747-1

*Hoya parasitica* sensu lato เป็นไม้เลื้อยอิงอาศัย จัดอยู่ในวงศ์ Asclepiadaceae พืชชนิดนี้ที่มีการกระจายพันธุ์ในประเทศไทย ยังมีสถานะทางอนุกรมวิธานไม่ชัดเจน เนื่องจากมีความแปรผันของขนาดรูปร่าง สี ของทั้งใบและดอกสูงมาก ในการตรวจหาความไม่ชัดเจนของหน่วยอนุกรมวิธานนี้ ได้เก็บตัวอย่างจำนวน 534 ตัวอย่างจากถิ่นอาศัยตามธรรมชาติทั่วประเทศไทย เมื่อพิจารณาจากการศึกษาทางสัณฐานวิทยาและกายวิภาคเชิงคุณภาพ สามารถแบ่งพืชกลุ่มนี้ออกได้เป็น 9 แบบ ได้แก่ I-IX โดยใช้ลักษณะ รูปร่างใบ ฐานใบ การเรียงของเส้นใบ ขนที่ใบ รูปร่างของกลีบดอก รูปร่างของ กะบังรอบ (corona) และ รูปร่างของ corpusculum จากการวิเคราะห์ลักษณะสัณฐานวิทยาของตัวแปรพหุคูณจำนวน 35 ลักษณะสามารถจำแนกพืชทั้ง 9 แบบนี้ออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย แบบ I, กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยแบบ II และกลุ่ม 3 ประกอบด้วยแบบ III ถึง IX ลักษณะสำคัญที่ใช้ในการแบ่งกลุ่มนี้คือ ความยาวของกลีบเลี้ยง ความกว้างของ corpusculum และความกว้างของใบ นอกจากนี้การศึกษาความหลากหลายของคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR-RFLP พบว่า จากคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ 9 บริเวณที่เลือกศึกษานั้น หลังจากเพิ่มปริมาณคิดเป็นความยาวประมาณ 20% ของความยาวดีเอ็นเอทั้งหมด และเมื่อผลิตภัณฑ์ที่ได้จากทั้ง 9 บริเวณถูกตัดด้วยเอนไซม์ 14 เอนไซม์ พบว่ามีเพียง 9 combinations ที่แสดง polymorphic patterns ได้แก่ C1C1-*Msp*I, CD-*Ase*I, TC-*Taq*I, K2Q-*Hinf*I, K2Q-*Taq*I, VL-*Taq*I, VL-*Rsa* I, K1K2-*Eco*RI และ K1K2-*Ase*I โดยสามารถจำแนกรูปแบบของคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอออกได้เป็น 12 รูปแบบ ผลที่ได้จากการศึกษาคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอนี้ แสดงให้เห็นถึงความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของพืชชนิดเชิงซ้อน *Hoya parasitica* ซึ่งสอดคล้องเพียงเล็กน้อยกับ 9 แบบที่แบ่งได้จากการศึกษาทางสัณฐานวิทยาและกายวิภาค ผลการศึกษาทั้งหมดชี้ให้เห็นว่า *Hoya parasitica* complex ในประเทศไทย ประกอบด้วยพืช 3 ชนิด คือ *H. rigida* Kerr (แบบ I), *H. sp.* (แบบ II) และ *H. parasitica* (Roxb.) Wall. ex Wight ซึ่งประกอบด้วย 2 แบบย่อย ตามรูปร่างของ coronal scale ได้แก่ รูปไข่แกมรูปรี และรูปไข่แกมรูปหอก

สาขาวิชา ..... วิทยาศาสตร์ชีวภาพ ..... ลายมือชื่อนิสิต..... มานิต คีตอยู่  
ปีการศึกษา ..... 2547 ..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... อ.ทวีศักดิ์ บุญเกิด  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... รศ.ดร.อบจันท์ ไทยทอง  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... ดร.ต่อศักดิ์ ลีลานันท์

## 4473828923 : MAJOR BIOLOGICAL SCIENCE

KEY WORD: MORPHOLOGY/ ANATOMY / PCR-RFLP / *Hoya parasitica* complex.

MANIT KIDYUE: TAXONOMIC REVISION OF THE *Hoya parasitica* complex IN THAILAND. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. THAWEESAKDI BOONKERD, Ph.D, THESIS COADVISOR: ASSOC. PROF. OBCHANT THAITHONG, Ph.D, AND TOSAK SEELANAN, Ph.D. 127 pp. ISBN 974-17-6747-1.

*Hoya parasitica* sensu lato is a climbing epiphyte, belonged to the family Asclepiadaceae. At present, taxonomic status of this species in Thailand is still dubious due to its great variations in size, shape and color of leaf and flower. In order to investigate this doubtful taxon, 534 specimens were collected from their natural habitats throughout Thailand. Based on qualitative morphological and anatomical characters, the *H. parasitica* complex can be divided into 9 forms (form I-IX). They can be distinguished mainly based on leaf shape, leaf base, venation pattern, leaf indumentum, and shapes of sepal, corona and corpusculum. Multivariate morphometric analyses of 35 quantitative morphological characters revealed the separation of 534 specimens (OTUs) into 3 groups, i.e. form I, form II, and forms III-IX. The important characters used for separating these three groups are sepal length, corpusculum width, and leaf width. The PCR-RFLP technique was subsequently used to detect diversity of chloroplast DNA in *H. parasitica* complex. Accounting for 20% of the total chloroplast genome, nine different cpDNA regions were amplified with the universal primer pairs. The amplified products of each primer pair were then digested by fourteen restriction enzymes. Nine combinations (C1C1-*Msp*I, CD-*Ase*I, TC-*Taq*I, K2Q-*Hinf* I, K2Q-*Taq*I, VL-*Taq*I, VL-*Rsa* I, K1K2-*Eco*RI, and K1K2-*Ase*I) showed polymorphic patterns being distributed over 12 haplotypes. The result of PCR-RFLP technique showed a closely relationship among the members of *H. parasitica* complex and there is a low potential utility of this technique in characterization of the recognized nine forms of the complex. In all, it is proposed here that the *H. parasitica* complex in Thailand should be treated as 3 species; i.e. *H. rigida* Kerr (form I), *H. sp.* (form II) and *H. parasitica* (Roxb.) Wall. ex Wight which included 2 forma according to coronal scale shape (ovate-elliptic and ovate-lanceolate).

Field of study..... Biological Science..... Student's signature..... *Manit Kidyue*  
Academic year..... 2004..... Advisor's signature..... *Thaweesakdi Boonkerd*  
Co-advisor's signature..... *Obchant Thaithong*  
Co-advisor's signature..... *Tosak Seelanan*

## ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deepest thanks to my thesis advisors, Associate Professor Dr. Thaweesakdi Boonkerd, Associate Professor Dr. Obchant Thaithong and Dr. Tosak Seelanan for their encouragement and valuable advice which had a great benefit through my thesis work.

I wish to express my sincere thanks to the thesis committee, Associate Professor Nantana Angkinand, Assistant Professor Dr. Kumthorn Thirakhupt, Dr. Chumpol Khunwasi, and Dr. Somran Suddee for their valuable suggestions.

I am very grateful to Dr. Somran Suddee and Mr. Sahut Chantanaorrapint for their generous help in plant collections.

Thanks are also due to staffs and students of Plant of Thailand Research Unit, and the Department of Botany, Faculty of Science, Chulalongkorn University for providing laboratory facilities for this thesis.

Special appreciation goes to my family and Miss Aroonrat Meekijjaroenroj for their encouragement throughout the studied period.

Finally, this work was supported by the Graduate School, Chulalongkorn University and the TRF/ BIOTECH Special Program for Biodiversity Research and Training program (grant No. T\_146004).

# CONTENTS

	Page
Abstract in Thai.....	iv
Abstract.....	v
Acknowledgements.....	vi
Contents .....	vii
List of Tables .....	viii
List of Figures.....	x
List of Abbreviation.....	xii
Chapter 1 Introduction.....	1
Chapter 2 Literature Review.....	3
Taxonomic History of the <i>Hoya parasitica</i> complex.....	3
Morphological review .....	4
Chapter 3 Morphological and Anatomical Study.....	10
Introduction .....	10
Materials and Methods.....	14
Results .....	16
Discussion and Conclusion .....	43
Chapter 4 Numerical Study.....	46
Introduction .....	46
Materials and Methods.....	47
Results and Discussion.....	51
Conclusion.....	58
Chapter 5 PCR-RFLP Study.....	65
Introduction .....	65
Materials and Methods.....	67
Results .....	73
Discussion and Conclusion .....	100
Chapter 6 General Conclusion.....	104
References.....	112
Appendix.....	117
Biography.....	127

## LIST OF TABLE

Table	Page
3.1 Locality and collected-forms of the <i>Hoya parasitica</i> complex in Thailand .....	12
4.1 Thirty five quantitative characters with their methods of scoring used in the study of <i>Hoya parasitica</i> complex.....	49
4.2 Classification function coefficients of 9 categories based on 35 vegetative and reproductive characters .....	118
4.3 Pooled within canonical structure of 9 categories based on 35 vegetative and reproductive characters .....	119
4.4 Summary of canonical discriminant function of 9 categories based on 35 vegetative and reproductive characters .....	120
4.5 Classification function coefficients of 4 categories based on 35 vegetative and reproductive characters .....	121
4.6 Pooled within canonical structure of 4 categories based on 35 vegetative and reproductive characters .....	122
4.7 Summary of canonical discriminant function of 4 categories based on 35 vegetative and reproductive characters .....	123
4.8 Classification function coefficients of 3 categories based on 35 vegetative and reproductive characters .....	124
4.9 Pooled within canonical structure of 3 categories based on 35 vegetative and reproductive characters .....	125
4.10 Summary of canonical discriminant function of 3 categories based on 35 vegetative and reproductive characters .....	126
4.11 Means and standard deviation of 35 quantitative characters of the 3 taxa of <i>H. parasitica</i> complex in Thailand.....	60
5.1 Sampling sites and numbers of the <i>Hoya parasitica</i> complex in Thailand .....	68
5.2 PCR regions of amplification using 10 cpDNA universal primer pairs .....	70
5.3 List of restriction enzymes used for analyses of cpDNA variation of <i>Hoya parasitica</i> complex in Thailand .....	72
5.4 PCR conditions, size of the amplified fragments, and degree of amplification using 10 cpDNA universal primer pairs in <i>Hoya parasitica</i> complex in Thailand .....	74



<b>Table</b>	<b>Page</b>
5.5 The results of digestions of 9 amplified cpDNA regions with 14 restriction enzymes.....	84
5.6 Numbers and appoximated size of restriction fragments and number of polymorphic patterns recognized by PCR-RFLP analysis.....	85
5.7 Haplotype frequencies and composition of <i>Hoya parasitica</i> complex in Thailand .....	96

## LIST OF FIGURE

Figure	page
3.1 Sampling sites of <i>Hoya parasitica</i> complex in Thailand.....	11
3.2 Habitats of <i>Hoya parasitica</i> complex in Thailand.....	16
3.3 Stem of <i>Hoya parasitica</i> complex in Thailand.....	17
3.4 X-section of stem: secondary structure.....	18
3.5 Leaves of <i>Hoya parasitica</i> complex.....	19
3.6 Leaf anatomy of <i>Hoya parasitica</i> complex.....	20
3.7 Scanning electron micrographs on abaxial surface of leaves of <i>Hoya parasitica</i> complex.....	21
3.8 Reproductive parts of <i>Hoya parasitica</i> complex.....	22
3.9 Leaves of <i>Hoya parasitica</i> complex.....	24
3.10 Flowers of <i>Hoya parasitica</i> complex (lateral and top view).....	25
3.11 Flowers of <i>Hoya parasitica</i> complex showing coronas (bottom view).....	26
3.12 Twin-pollinia of <i>Hoya parasitica</i> complex.....	27
3.13 Flowers of <i>Hoya parasitica</i> complex.....	35
3.14 Stomata and epidermal cell on abaxial surface of leaves of nine forms.....	41
3.15 Scanning electron micrographs on abaxial surface of leaves of nine forms.....	42
4.1 Measurements of leaf and floral parts.....	50
4.2 UPGMA clustering of 534 OTUs base on 35 quantitative characters of <i>Hoya</i> <i>parasitica</i> complex in Thailand.....	52
4.3 The ordination plot of 9 forms (vegetative and reproductive character) using 9 categories as priori groups.....	55
4.4 The ordination plot of 4 forms (vegetative and reproductive character) using 4 categories as priori groups.....	56
4.5 The ordination plot of 3 clustering groups (vegetative and reproductive character) using 3 categories as priori groups.....	57
4.6 Boxplots of eighth more important characters of <i>Hoya parasitica</i> complex.....	61
5.1 Location of the nine regions in this study based on the tobacco cpDNA genome.....	71

Figure	page
5.2 Sample gel showing fragment size of total DNA extracted from fresh leaves of <i>Hoya parasitica</i> complex.....	73
5.3 PCR amplified of AS region of cpDNA of <i>Hoya parasitica</i> complex .....	75
5.4 PCR amplified of C <sub>1</sub> C region of cpDNA of <i>Hoya parasitica</i> complex.....	76
5.5 PCR amplified of CD region of cpDNA of <i>Hoya parasitica</i> complex.....	77
5.6 PCR amplified of f <sub>M</sub> A region of cpDNA of <i>Hoya parasitica</i> complex.....	78
5.7 PCR amplified of HK region of cpDNA of <i>Hoya parasitica</i> complex.....	79
5.8 PCR amplified of K <sub>1</sub> K <sub>2</sub> region of cpDNA of <i>Hoya parasitica</i> complex .....	80
5.9 PCR amplified of K <sub>2</sub> Q region of cpDNA of <i>Hoya parasitica</i> complex .....	81
5.10 PCR amplified of TC region of cpDNA of <i>Hoya parasitica</i> complex .....	82
5.11 PCR amplified of VL region of cpDNA of <i>Hoya parasitica</i> complex .....	83
5.12 PCR-RFLP in C <sub>1</sub> C region of cpDNA of “ <i>Hoya parasitica</i> complex” digested with <i>Msp</i> I.....	87
5.13 PCR-RFLP in CD region of cpDNA of <i>H. parasitica</i> complex digested with <i>Ase</i> I.....	88
5.14 PCR-RFLP in K <sub>2</sub> Q region of cpDNA of <i>H. parasitica</i> complex digested with <i>Hinf</i> I .....	89
5.15 PCR-RFLP in K <sub>2</sub> Q region of cpDNA of <i>H. parasitica</i> complex digested with <i>Taq</i> I .....	90
5.16 PCR-RFLP in KK region of cpDNA of <i>H. parasitica</i> complex digested with <i>Ase</i> I.....	91
5.17 PCR-RFLP in KK region of cpDNA of <i>H. parasitica</i> complex digested with <i>Eco</i> RI.....	92
5.18 PCR-RFLP in TC region of cpDNA of <i>H. parasitica</i> complex digested with <i>Taq</i> I.....	93
5.19 PCR-RFLP in VL region of cpDNA of <i>H. parasitica</i> complex digested with <i>Rsa</i> I.....	94
5.20 PCR-RFLP in VL region of cpDNA of <i>H. parasitica</i> complex digested with <i>Taq</i> I .....	95
5.21 The distribution of twelve haplotypes of <i>Hoya parasitica</i> complex in Thailand. ....	97
5.22 Dendrogram of 56 individuals of <i>H. parasitica</i> complex generated by cluster analysis using UPGMA based on PCR-RFLP .....	99

## LIST OF ABBREVIATION

A, T, C, G	=	nucleotide containing the base Adenine, Thymine, Cytosine, and Guanine, respectively
BCU	=	Professor Kasin Suvatabhundbu Herbarium, Department of Botany, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand
BK	=	Department of Agriculture, Bangkok, Thailand
BKF	=	National Park, Wildlife and Plant Conservation Department, Bangkok, Thailand
BM	=	The Natural History Museum, London, England
bp	=	base pair
°C	=	degree celsius
cm	=	centimeter
CNLL	=	corona lobe length in mm
CNLS	=	corona lobe shape (calculated by DBCN/CNLL)
CNLW	=	corona lobe width in mm
COAL	=	corolla lobe apex length in mm
COBW	=	corolla lobe base width in mm
COL	=	corolla length in mm
COLL	=	corolla lobe length in mm
COLW	=	corolla lobe width in mm
COPL	=	corpusculum length in micron
COPW	=	corpusculum width in micron
COTL	=	corolla tube length in mm
cpDNA	=	chloroplast DNA
DNA	=	deoxyribonucleic acid
DBCL	=	distance from base to the widest point of corolla lobe in mm
DBCN	=	distance from base to the widest point of corona lobe in mm
DBL	=	distance from base to the widest point of leaf in cm
DCN	=	diameter of corona in mm
DCNL	=	distance between corona lobes in mm
DCNR	=	diameter of coronal receptacle in mm
DCO	=	diameter of corolla in mm

DCOR	=	distance from corpuscle to the outer point of receptacle in mm
DCOT	=	diameter of corolla tube in mm
dNTPs	=	deoxyribonucleotide triphosphates
EDTA	=	ethylenediamine tetraacetic acid
g	=	gram
HCl	=	hydrochloric acid
K	=	Kew Herbarium, Royal Botanic Gardens, England
kb	=	kilobase pair
LCNL	=	lower apex of corpusculum length in micron
LL	=	leaf length in cm
LS	=	leaf shape (calculated by DBL/LL)
LW	=	leaf width in cm
M	=	molar
MgCl <sub>2</sub>	=	magnesium chloride
mg	=	milligram
min	=	minute
mm	=	millimeter
mM	=	millimolar
ml	=	milliliter
NaCl	=	sodium chloride
ng	=	nanogram
P	=	Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France
PCR	=	polymerase chain reaction
PECL	=	pedicel length in mm
PECW	=	pedicel width in mm
PETL	=	petiole length in cm
PETW	=	petiole width in cm
POLL	=	pollinium length in micron
POW	=	pollinium width in micron
PVP	=	polyvinyl propylene
RCCD	=	ratio of corona diameter and corolla tube diameter
RCRD	=	ratio of corona diameter and receptacle diameter
RFLP	=	restriction fragment length polymorphism
RNA	=	ribonucleic acid

rpm	=	revolution per minute
SEM	=	Scanning electron microscope
SPL	=	sepal length in mm
SPW	=	sepal width in mm
s.l.	=	sensu lato
Tris	=	tris (hydroxyl methyl) aminomethane
UCNL	=	upper apex of corpusculum length in micron
UV	=	ultraviolet
$\mu\text{g}$	=	microgram
$\mu\text{l}$	=	microlitre
$\mu\text{m}$	=	micrometer
V	=	volt