

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta
Katedra ekologie

Charles University in Prague, Faculty of Science
Department of Ecology

Doktorský studijní program
Ph.D. study program

Autoreferát disertační práce
Summary of the Ph.D. Thesis



Diversita, rozšíření a ochrana léčivých rostlin v Nepálu
Diversity, Distribution and Conservation of Medicinal plants in Nepal

Maan Rokaya

Supervised by: doc. RNDr. **Zuzana Münzbergová**, Ph.D.

Prague, May 2011

Papers included in the thesis:

1. Distribution patterns of medicinal plants along an elevational gradient in central Himalaya, Nepal
Manuscript
2. Ethnobotanical study of medicinal plants from the Humla district of western Nepal
Journal of Ethnopharmacology 130 (2010) 485–504
3. *Rheum australe* D. Don: A review on its botany, ethnobotany, phytochemistry and pharmacology
Manuscript. Effect of light, temperature and seed mass on germination of two species of Himalayan Rhubarb
Manuscript
4. Active constituents in *Rheum acuminatum* and *Rheum australe* (Polygonaceae) roots: a variation between cultivated and naturally growing plants
Manuscript
5. Population dynamics and harvesting strategies of Rhubarb species in Nepal: A matrix modeling approach
Manuscript
6. Impact of *Parthenium hysterophorus* L. invasion on plant species composition and soil properties of grassland communities in Nepal
Flora 206 (2011) 233–240

Abstrakt

V této práci jsou syntetizovány různé aspekty související s rozmanitostí, distribucí, použitím a uchováváním léčivých rostlin v Nepálu. Také jsem se snažil doporučit pokyny pro udržitelnost dvou velmi používaných horských druhů rostlin. Přílišné sklizení nebo lidskou činností vyvolaný úbytek nejsou jediným problémem pro biologickou rozmanitost. V poslední době se také ukázalo, že invaze nepůvodních druhů jsou závažný problém v Nepálu. Proto jsem také pokoušel se analyzovat dopad invazivních druhů na složení společenstva v posledních člancích.

První dva články se zabývaly rozmanitostí, distribucí, použitím a sklizením léčivých rostlin. **Článek I** ukázal, že léčivé rostliny v Nepálu mají unimodální vztah s nadmořskou výškou a maximální celková druhová bohatost je v nadmořské výšce 1000 m. **Článek II**, který se zabývá využitím léčivých rostlin v regionu Humla, na západ Nepál ukázal, že tam je 161 léčivých rostlin, které patří k 61 čeledím a 106 rodům používané k léčbě 72 lidských a 7 veterinárních onemocnění. Léčivé rostliny v Humla byly většinou sbírány v přírodě. Toto představuje vážnou hrozbu pro rozmanitost léčivých rostlin a je proto nezbytné vypracovat řádné metodiky pro jejich sklizení ve volné přírodě a / nebo jejich domestikace.

Rheum australe, endemická rostlina ze západu himálajské oblasti, je široce používána v tradiční medicíně pro různé nemoci v Nepálu, Číně, Indii a Pákistánu, a má široké spektrum léčebných vlastností (**článek III**). Abychom pochopili možnosti jeho domestikace, studoval jsem účinky teplot a světla na klíčivost semen pro *Rheum australe* a jeho náhradu, *Rheum acuminatum* (**článek IV**). Výsledky ukázaly, že oba druhy klíčí lépe ve světle, než v úplné tmě a vykazovali vyšší klíčení při vyšší teplotě. To naznačuje, že pěstování druhů v nižších polohách by mělo být možné.

Abych zjistil, zda existují nějaké rozdíly v dostupných látkách chemického složení pěstovaných a přirozeně rostoucí druhy *Rheum* (*R. acuminatum* a *R. australe*), srovnával jsem kořeny z přírodních stanovišť, v Nepálu a rostliny pěstované v experimentu zahradě (**článek V**). Obsah fytochemikálií ve dvou druzích byl srovnatelný a přirozeně rostoucí rostliny byly lepší než pěstované rostliny v jejich chemického složení. Některé důležité chemické však byly stejně časté u přirozeně pěstovaných a pěstovaných rostlin.

S cílem vyvinout strategie sklizení dvou hojně používaných léčivých rostlin (*R. acuminatum* a *R. australe*), byla studována populační dynamika v různých stanovištích v průběhu čtyř let (**článek VI**). Bylo zjištěno, že *R. acuminatum* rostoucí v otevřeném prostředí bylo více citlivé na různé intenzity sklizně ve srovnání s lesním stanovištěm a *R. australe* rostoucí v otevřeném prostředí. Selektivní nebo rotační (nejméně 5 let) sklizeň se jeví jako optimální strategie sklizení. Managementové plány by měly být formulovány v souladu s místními podmínkami. Tento závěr by také mohl být aplikován na mnoho jiných alpských vytrvalých léčivých rostlin.

Nakonec (**článek VII**) jsem hodnotil vliv invazních druhů (*Parthenium hysterophorus*) na složení společenstva rostlin a půdní vlastnosti. Výsledky ukázaly, že *P. hysterophorus* způsobil významné změny ve složení vegetace a vlastnostech půdy. Tento druh proto představuje vážnou hrozbu pro rozmanitost původních druhů.

1.1. Úvod

1.1. Léčivé rostliny ve světě

Rostliny byly nedílnou součástí lidského zdraví po tisíce let (Samuelsson 2004). První dokumentace k použití rostlin jako medicíny se datuje k 2600 BC z Mezopotámie, Babylon (Gurib-Fakim 2006). První izolace léčivé látky z rostliny byla izolace morfinu z opia se na počátku 19. století a je ještě dnes v použití (Kinghorn 2001; Samuelsson 2004). Z globálního množství celkem 422 000 druhů kvetoucích rostlin (Govaert 2001; Bramwell 2002), se mezi 50 000 až 80 000 kvetoucích rostlin používá jako lék (Marinelli 2005; IUCN 2007). Odhaduje se, že 70-80% lidí na celém světě - především těch z rozvojových zemí, žijících ve venkovských oblastech-spoléhají na tradiční (především rostlinné), léky pro jejich primární potřebu zdravotní péče (Farnsworth a Soejarto 1991; Hamilton 2004). Současná medicína používá alespoň 122 plně identifikovaných sloučenin odvozených od 94 druhů rostlin. 80% z nich má použití v etnomedicině velmi podobné současnému použití (Fabricant a Farnsworth 2001). Na celém světě je obrovská poptávka po bylinné medicíně a zvyšuje se o 15 - 25% ročně (Grünwald a Büttel 1996; Sharma 2004), protože rostlinné přípravky mají málo nebo žádné vedlejší účinky. V současné době jsou chemikálie rostlinného původu také používány pro výživu a kosmetické účely (Kapoor 2005; Bernal et al 2011)..

1.2. Léčivé rostliny v Nepálu

Léčivé rostliny, běžně označované jako *jadibuti* v Nepálu, se používají v různých léčivých systémech, jako jsou ajurvédské, Unani, homeopatie, přírodní medicíny, Siddha, Tibetu a v různých jiných folklórních léčebných systémech (Lacoul a Pant 2000; Sharma 20007). Léčivé rostliny jsou obecně zahrnuty do širší kategorie léčivých a aromatických rostlin (aromatické rostliny mají aroma v některých svých částech, MAPs), nebo lesních nedřevních produktů (NTFPs, NWFPs). Léčivé rostliny v Nepálu jsou rozšířeny od 60 do 6200 m nadmořské výšky (Press et al 2000; **Paper I**). Existuje více než 2300 léčivých rostlin používaných v Nepálu (**Paper I**) a asi se 200 druhů léčivých rostlin se obchoduje v Nepálu (Tiwari et al. 2004).

1.3. Ochranné aspekty léčivých rostlin

K uspokojení poptávky v regionálních a mezinárodních trzích, jsou rostlinné zdroje sklizené ve zvýšeném množství většinou z přirozených populací (Kuipers 1997; Lange 1998) a techniky sklizení s primitivními nástroji jsou obvykle destruktivní a neudržitelnou a dlouhodobě neudržitelné. Takže, naléhavou potřebou proto je racionalizovat a zdokonalit sběr léčivých rostlin a vytvoření postupů k jejich zachování (Chandrasekharan 1993).

Léčivé rostliny jsou ohroženy nejen v důsledku jejich použití v medicíně, ale také kvůli jejich použití pro jiné účely (Hamilton 2004) a také v důsledku degradace / ztráty stanovišť, lesním požárům, posunující kultivaci, pastvě dobytka a lidské populační expanzi (Ahmad 1998; Chaudhary 1998). Světový svaz ochrany přírody (IUCN) odhaduje, ~ 15 000 druhů léčivých rostlin jako ohrožené vyhynutím na celém světě (viz IUCN 2007).

51 druhů léčivých rostlin Nepálu je ohroženo (CAMP 2001). Kromě toho několik druhů lišejníků a hub je příliš využíváno díky jejich obchodu pro medicínu, jídlo a okrasné účely. Není jasné, zda některé léčivé rostliny již vymřeli v důsledku sklizení v Nepálu. To je tím, že žádná komplexní flóra nebyla dosud zveřejněna s výjimkou několika málo check-listů (např. Press et al. 2000) a podrobné studie o populační dynamice chybí (Ghimire et al. 2008). Hrozby pro léčivé rostliny jsou do značné míry důsledkem nesprávného provádění právních předpisů v Nepálu, protože regulační prostředky jsou často nejednoznačné a neúčinné (Chaudhary 2000; Larsen et al. 2000; Larsen et al. 2005; Olsen 2005; Kunwar et al. 2009) .

Vzhledem k nedostupnosti do mnoha částí země, Nepálu stále mnoho léčivých rostlin čeká na dokumentaci, identifikaci a dlouhodobé studie týkající se životního cyklu, druhů zdrojů, hustotě a četnosti a velikosti rozdělení populací (Chaudhary 2000).

2. Cíl práce

Cílem práce popsat rozšíření, užití, ochranný statut a populační biologii léčivých rostlin Nepálu. Kromě toho jsem stanovil ohrožení biodiversity Nepálu v důsledku šíření invazních druhů.

3. Materiál a metody

Tato práce je založena na terénních datech i na datech z literatury. Výzkum týkající se diversity a rozšíření léčivých rostlin (**článek I**) je založený na publikovaných datech i terénních datech z různých částí Nepálu. Další článek o využití léčivých rostlin v regionu Humla v západním Nepálu (**článek II**) je založený na sběru dat v terénu prostřednictvím polostrukturovaných rozhovorů a diskusi s klíčovými informátory. Článek o významu vysoce užívané léčivé rostliny *Rheum australe*, (**článek III**) je kompletně založený na publikovaných datech. Článek o klíčení, (**článek IV**), srovnání sekundárních metabolitů (**článek V**), o trvale udržitelných strategiích sklizení léčivých rostlin (*Rheum acuminatum* a *Rheum australe*) (**článek VI**) a o vlivu invaze (Asteraceae) v trávnicích středního Nepálu (**článek VII**) jsou plně založeny na experimentech v laboratoři (**článek IV a V**) nebo terénním sběru dat (**článek VI a VII**).

4. Výsledky a diskuse

Navzdory odchylce mezi distribucí léčivých rostlin a všech cévnatých rostlin, bohatost léčivých rostlin ukázala unimodální rozšíření podél gradientu nadmořské výšky v Nepálu a je podobné jako u jiných studií z himálajské oblasti (např. Grytnes a Vetaas 2002; Bhattarai et al. 2004; Carpenter 2005; Bhattarai a Vetaas 2006; Grau et al. 2007; Baniové et al. 2009; Acharya et al. 2010). Pozorované výškové rozmístění druhové pestrosti je do velké míry hnáno klimatickými faktory jako je vlhkost, teplota, vegetační období, srážky a intenzita světla. Rozdíly v distribuci léčivých rostlin v různých částech Nepálu lze vysvětlit modelem vlhkostně energetické dynamiky (O'Brien 1993, 1998).

V regionu Humla, který byl jen zřídka zkoumán z hlediska ethnobotaniky (Nepál a Sapkota 2005; Kunwar et al 2006), může mnoho druhů rostlin brzy čelit vymření, protože tam nejsou žádné kultivační praxe. Navíc velmi používanou částí rostlin jsou kořeny. Odstranění kořenů je méně udržitelné než odstranění listů nebo jiných nadzemních částí (Giday et al. 2003). Také bylo zjištěno, že původní znalosti o

používání přípravků jsou přenášeny nesystematicky a je pravděpodobné, že takové znalosti v budoucnu zaniknou jako se to stalo v Peru (Bussmann a Sharon 2006).

R. australe, je široce používán v tradiční medicíně v Nepálu, Číně, Indii a Pákistánu. Navzdory mnoha farmakologických zkoušek, zůstávají neprozkoumané léčby kožních onemocnění a žaludku in vivo. Listy obsahující toxické kyseliny šťavelové je někdy uváděno jako jedlá zelenina (Shinwari a Gílání 2003). Tyto informace čekají na další potvrzení a laboratorní testy. Vzhledem k tomu, rostlina je často sbírána ve volné přírodě, je třeba její pěstování pro masovou produkci pro splnění požadavků trhu.

Klíčení semen ze dvou druhů *Rheum acuminatum* a *R. australe* je ovlivněno váhou semene, teplotou a světlem. Pro oba druhy, klíčení bylo významně vyšší ve světle, než v temných podmínkách a účinek světla silně interagoval s vlivem teploty. To může být přízpůsobením, aby se zabránilo klíčení semen, pokud je pohřbeno hluboko v půdě nebo pod sněhem v zimě, kdy jsou podmínky obvykle tmavší a chladnější než ve volném vzduchu (např. Socolowski et al. 2008). Odlišné doby potřebné pro klíčení semen 50% ukazuje, že načasování růstu obou druhů je jiné a druhy se liší ve své schopnosti klíčit za různých stanovištních podmínek.

Stejně fytochemikálie byly nalezeny v *R. acuminatum* a *R. australe* a mohly by tedy být používány jako náhrada jeden druhého. Antrachinony a stilbeny, které jsou běžně pozorovány u různých druhů *Rheum* (Aburjai 2000; Komatshu et al 2006; Lin et al. 2006; Krafczyk et al. 2008; Wang et al. 2010) jsou přítomny také v *R. acuminatum* a *R. australe*. Koncentrace chrysophanol, emodin, aloe-emodin, physcion a rhein nalezené v naší studii byly mírně nižší než v druzích *Rheum* rostoucích v Číně, ale koncentrace chrysophanolu a emodinu byly vyšší v našich studovaných rostlinách (Shang a Yuan 2003; Li et al. 2004; Komatsu et al. 2006). Obsah výše uvedených fytochemikálií byla mnohem nižší než v *Tora Cassia*, *Rumex japonicus* a *Rhamnus purshiana* (Koyama et al. 2003). Přítomnost většího počtu látek v přírodních a dospělých rostlinách než pěstovaných rostlinách (který byl mladší než rostliny na přirozených stanovištích) je srovnatelná se závěry výzkumů prováděných v Indii pro *R. australe* (Malik et al. 2010). V kořenech *R. acuminatum* a *R. australe* je více resveratrolu než ve víně a to i v pěstovaných rostlinách. To znamená, pěstované rostliny *Rheum* by mohly být cenným zdrojem resveratrolu bez poškození přírodních populací.

Výsledky ukázaly nejvyšší podíl vegetativních rostlin následovaný kvetoucími rostlinami a semenáčky pro oba druhy a stanoviště *R. acuminatum* a *R. australe*. Produkce semen a jejich hmotnost byla nižší u *R. acuminatum* než u *R. australe*. Růst, přežití a úmrtnost *R. acuminatum* byly závislé na stanovišti a roku a lišili se mezi těmito dvěma druhy v otevřeném prostředí. Při 0,5% klíčivosti dosahovala asymptotická rychlost růstu (λ) hodnot 1,02 - 1,09 pro *R. acuminatum* v lesních stanovištích 0,87-1,05 pro *R. acuminatum* v otevřených stanovištích a 1,03-1,17 pro *R. australe* pěstovaném v otevřeném prostředí. *R. acuminatum* z otevřených stanovišť byla více citlivá na sklizeň, než *R. acuminatum* v lese, nebo *R. australe* v otevřeném prostředí. Negativní vliv sklizně kořenů u druhů *Rheum* byla podobná jako v předchozích studiích (Nault a Gagnon 1993; Nault et al. 1996; Rock et al 2004; Ghimire et al 2008). Vzhledem k tomu, jak s vysokým objemem rebarbory se ročně obchoduje je nutné použít selektivní nebo rotační (nejméně 5 let) sklizeň. Formulace plánů sklizení by měla být provedena v souladu s místními podmínkami.

Invaze *Parthenium hysterophorus* má významný vliv na složení nadzemní vegetace a vlastnosti půdy ve třech různých lokalitách ve střední Nepálu. Silné negativní vlivy *Parthenium hysterophorus* na složení vegetace jsou tím, že roste rychle a snadno šíří různými vektory jako jsou zvířata, vítr a voda, a dokáže se poměrně dobře uchytit v otevřených a narušených plochách (např. Navie et al. 1996; Javaid et al. 2007). Velké množství nadzemní biomasy spolu s velkou rychlostí rozkladu přispělo ke zvýšení obsahu organické hmoty a dusíku v půdě (Koutika et al. 2007). Vyšší pH půdy v invadovaných pozemcích by mohlo být způsobeno zvýšenou koncentrací draslíku (Ehrenfeld 2003). *P. hysterophorus* je také hlášeno, že způsobuje řadu zdravotních problémů u lidí a zvířat, a představuje velkou hrozbu pro místní flóru (např. Evans 1997; Adkins a Navie 2006), a proto v Nepálu potřebuje řádnou kontrolu.

5. Závěry

Hlavní závěry studie jsou: (i) léčivé rostliny vykazují vyšší druhová bohatost v nižších nadmořských výškách? To by mohlo být vysvětleno hypotézou o rovnováze uhlíku a živin. Vzhledem k tomu, je distribuční model léčivých rostlin byl vytvořen metodou interpolace, která předpokládá, že léčivé rostliny vyskytují v celém jejich rozsahu výškového gradientu bez ohledu na prostředí, je však třeba ověřit závěry praktickým odběrem vzorků v oblasti s naměřenými klimatickými proměnnými; (ii) I když je oblast Humla bohatá na léčivé rostliny, je etnobotanický průzkum oblasti stále v počátcích a chybí nám fytochemické a farmakologické studie ověřující jejich využití. Většina rostlin je zde sbírána ve volné přírodě by měla být kultivována pro jejich dlouhodobé zachování; (iii) *Rheum australe* má úzký areál rozšíření a je velmi využíván pro svoje léčivé účinky. Pro dlouhodobé zachování druhu je nezbytná jeho kultivace; (iv) *Rheum acuminatum* a *Rheum australe* by dobře rostly pokud by se přesunuly do nižších nadmořských výšek než jsou jejich skutečná stanoviště. V teplejších podmínkách s dostatkem světla měli druhy vyšší klíčivost; (v) srovnání koncentrací chemických sloučenin v kořenech *R. acuminatum* a *R. australe* odhalily, že tyto dva druhy mohly být použity jako náhrada jednoho druhým, díky přítomnosti téměř stejných sekundárních metabolitů, které se používají pro široký rozsah nemocí. Kultivované i přirozeně rostoucí rostliny mohou být využívány stejně, protože sloučeniny důležité pro jejich léčivé vlastnosti se vyskytují jak u přirozeně rostoucích, tak pěstovaných rostlin; (vi) Studie o populační dynamice ukázala, že *R. acuminatum* rostoucí v otevřeném prostředí roste hůře než v lesních stanovištích nebo *R. australe* v otevřených stanovištích. Himálajské rebarbory jsou citlivé na sklízení kořenů. Sklizně má silný negativní dopad na velikost populace. Přírodní populace by měly být sklizeny selektivní nebo rotační sklizní. Formulace plánů sklízení by měla být provedena v souladu s místními podmínkami; (vii) Invazní *Parthenium hysterophorus* roste v celé řadě stanovišť a je schopen změnit celé ekosystémy a místní biologickou rozmanitost v důsledku jeho negativních dopadů na vegetaci i půdní podmínky. Proto je důležité, aby byl *P. hysterophorus* důsledně likvidován, aby se předešlo možným hrozbám v budoucnu v Nepálu.

Abstract

In this thesis I synthesized different aspects related to diversity, distribution, uses and conservation of medicinal plants in Nepal and also have attempted to recommend guidelines for sustainability of two highly used alpine plant species. The over-harvesting or human induced activities are not the only problem for biodiversity but recently invasion of alien species has also emerged as serious problem in Nepal. I thus also attempted to analyze the effect of invasive species on community composition in the last paper.

The first two papers deal with diversity, distribution, uses and harvesting. **Paper I** showed that medicinal plants in Nepal have unimodal relationship with elevation and the maximum total species richness is at 1000 m. **Paper II** which deals with the uses of medicinal plants in the Humla region, west Nepal showed that there are 161 medicinal plant species belonging to 61 families and 106 genera used for treating 72 human and 7 veterinary ailments. Medicinal plants in Humla were mostly collected in wild. This induces a serious threat to diversity of the medicinal plants and it is therefore necessary to develop proper management guidelines for their harvesting in wild and/or their domestication.

Rheum australe, an endemic plant to west Himalayan region, is widely used plant in traditional medicine for various diseases in Nepal, China, India and Pakistan and has a wide range of medical properties (**Paper III**). To understand possibilities of its domestication, I observed the effects of temperatures and light on germination of seeds for *Rheum australe* and its substitute, *Rheum acuminatum* (**Paper IV**). The results showed that both species germinated better in light than in complete darkness and showed higher germination rates in higher temperature. This suggests that cultivation of the species in lower altitudes should be possible.

To see if there exist any differences in available chemical contents of cultivated and naturally growing species of *Rheum* (*R. acuminatum* and *R. australe*), I collected roots from natural habitats, Nepal and plants grown in experiment garden (**Paper V**). Content of phytochemicals in the two species was comparable and naturally growing plants were better than cultivated plants in their available chemical contents. Some important chemical were, however, equally common in naturally grown and cultivated plants.

In order to develop the proper harvesting strategies of two highly used medicinal plants (*R. acuminatum* and *R. australe*), populations in various habitats were studied over four years time (**Paper VI**). It has been found that *R. acuminatum* growing in open habitat was more sensitive to different harvesting intensities compared to forest habitat and *R. australe* growing in open habitat. Therefore selective or rotational (at least 5 years) harvesting strategies should be adopted. Management plans should be formulated in accordance to local prospective. This conclusion could also be applied to many other alpine perennial medicinal plants.

Finally (**paper VII**), I evaluated the impact of invasive species (*Parthenium hysterophorus*) on the composition plant community and soil properties. The results showed that due to *P. hysterophorus* there was significant changes in above ground vegetation composition and below ground soil properties in there different study sites in central Nepal and thus represent serious threat to native diversity.

1. Introduction

1.1. Medicinal plants in the world

Plants have been an integral part of human health for thousands of years (Samuelsson 2004). The first documentation on uses of plants as medicine dated back to 2600 B.C. from Mesopotamia, Babylon (Gurib-Fakim 2006). The earliest plant isolation started with morphine from opium in the beginning of 19th century and is still in use today (Kinghorn 2001; Samuelsson 2004). Out of the global total of 422 000 flowering plant species (Govaert 2001; Bramwell 2002), between 50 000 to 80 000 flowering plants are used medicinally (Marinelli 2005; IUCN Species Survival Commission 2007). It is estimated that 70–80% of people worldwide - primarily those of developing countries living in rural areas- rely on traditional (mostly herbal) medicine for their primary health care needs (Farnsworth and Soejarto 1991; Hamilton 2004). Still, current medicine uses at least 122 fully identified compounds derived from 94 species of plants. 80% of them have had an ethnomedical use similar to the current use (Fabricant and Farnsworth 2001). There is a huge demand in herbal medicine worldwide and it is growing at the rate of 15 to 25% annually (Grünwald and Büttel 1996; Sharma 2004) because herbal preparations have little or no side effects. Nowadays plant derived chemicals are also used in nutraceuticals and cosmaceuticals (Kapoor 2005; Bernal et al. 2011).

1.2. Medicinal plants in Nepal

Medicinal plants, commonly called as *jadibuti* in Nepal, are used in different medical systems such as Ayurvedic, Unani, Homeopathy, Naturopathy, Siddha, Tibetan and in various other folklore healing system (Lacoul and Pant 2000; Sharma 20007). Medicinal plants in general are included in broader categories of medicinal and aromatic plants (aromatic plants is the one having aroma in any of its parts, MAPs) or in non-timber forest products (NTFPs) or non-wood forest products (NWFPs). Medicinal plants in Nepal are distributed from 60-6200 m altitude (Press et al. 2000; Paper I). There are more than 2300 medicinal plant species used in Nepal (Paper I) and around 200 medicinal plant species are traded in Nepal (Tiwari et al. 2004).

1.3. Conservation issues of medicinal plants

To meet the demand in the regional and international markets, the plant sources are harvested in increasing volumes mostly from wild populations (Kuipers 1997; Lange 1998) and harvesting techniques with primitive tools are generally rudimentary, destructive and unsustainable in nature. So, an urgent need, therefore, is to rationalize and improve harvesting systems and practices to conserve the plants (Chandrasekharan 1993).

Medicinal plants are not only threatened due to their use in medicine but also due to their uses for other purposes (Hamilton 2004) and also due to habitat degradation/loss, forest fires, shifting cultivation, livestock pasturing and human population expansion (Ahmad 1998; Chaudhary 1998). The World Conservation Union (IUCN) has estimated ~15 000 medicinal plants species as threatened with extinction worldwide (see IUCN Species Survival Commission 2007).

51 species of Nepal's medicinal plants are threatened (CAMP 2001). In addition to this, several species of lichens, fungi are also over-exploited due their trade for medicine, food and ornamental purposes. But it is not clear if some medicinal plant species have already been drawn to extinction due to harvesting in Nepal as no comprehensive flora has been published except few checklists (e.g., Press et al. 2000) and detail studies on population dynamics are lacking (Ghimire et al. 2008). Threats to medicinal plants are largely due to improper implementation of laws in Nepal because the policies and regulatory environments are often ambiguous and ineffective (Chaudhary 2000; Larsen et al. 2000; Larsen et al. 2005; Olsen 2005; Kunwar et al. 2009).

Due to the lack of inaccessibility to many parts of the country, many medicinal plants in Nepal still await documentation, identification and long-term studies related to life-cycle characteristics, type of resources, density and abundance and size class distribution of populations (Chaudhary 2000).

2. Aims of the study

The main aim of the thesis is to describe distribution, uses, conservation status and population biology of medicinal plants in Nepal. Additionally, it is also aimed to assess the threat of biodiversity due to invasive species in Nepal.

3. Material and methods

The thesis is based on the field-survey data and also on secondary data from published materials. The research related to diversity and distribution of medicinal plants (**Paper I**) is based on published sources and on field sampling in different parts of Nepal. The paper related to uses of plants in traditional herbal medicine in the Humla district of western Nepal (**Paper II**) is based on data collected in field through semi-structured interviews and key informant discussion. Research paper on importance of highly used Himalayan endemic plant, *Rheum australe*, (**Paper III**) is completely based on published sources. Paper on seed germination (**Paper IV**), comparison of secondary metabolites (**Paper V**), paper on the harvesting strategy of highly used medicinal plants (*Rheum acuminatum* and *Rheum australe*) (**Paper VI**) and study related to impacts of *Parthenium hysterophorus* (Asteraceae) invasion in grasslands of central Nepal (**Paper VII**) are fully based on experiments carried out in laboratory (**Papers IV and V**) or on field samplings (**Papers VI and VII**).

4. Results and discussion

In spite of deviations between the distribution of medicinal plants and all vascular plants, medicinal plant species richness showed a unimodal distribution pattern along an elevation gradient in Nepal and is similar to other findings from Himalayan region (e.g., Grytnes and Vetaas 2002; Bhattarai et al. 2004; Carpenter 2005; Bhattarai and Vetaas 2006; Grau et al. 2007; Baniya et al. 2009; Acharya et al. 2010). The observed elevational distribution of species richness is largely driven by climatic factors such as moisture, temperature, growing season, rainfall and light intensity. The differences of distribution of medicinal plants in different east, centre and west Nepal could be explained by the water-energy dynamics model (O'Brien 1993, 1998).

In the Humla region, which was only rarely been studied in terms of ethnobotany (Nepal and Sapkota 2005; Kunwar et al. 2006), many plants species could soon face depletion because there are no cultivation practices. Moreover, the highly used plant parts are roots. Removal of roots is less sustainable than the removal of leaves or other aboveground parts (Giday et al. 2003). It has also been found that indigenous knowledge on use of plant is transmitted without any systematic process and is probable that such knowledge is at risk of disappearance in the future as observed in Peru (Busmann and Sharon 2006).

R. australe is widely used in traditional medicine in Nepal, China, India and Pakistan. Despite many pharmacological tests, treatments of skin and stomach diseases remain unexplored *in vivo* and leaves containing toxic oxalic acids are sometimes reported as edible vegetables (Shinwari and Gilani 2003). So, such reports await further confirmation and laboratory tests. As the plant is reported to be highly collected in wild, it needs cultivation for mass productions to meet market demands.

Germination of seeds of two *Rheum acuminatum* and *R. australe* is affected by seed mass, temperature and light. For both species, germination was significantly higher in light than in dark and the effect of light strongly interacted with the effect of temperature. This may be an adaptation to avoid germination if seeds are buried deep in the soil or under snow during winter where the conditions are usually darker and colder than in free air (e.g., Socolowski et al. 2008). The unequal time taken for germination of 50 % seeds indicated that the growing timing of both Rhubarb species is different indicating that they have variable ability to adapt in different habitats where abiotic conditions would be different.

The same phytochemicals were found in *R. acuminatum* and *R. australe* and they could thus be used as substitute of one another. Anthraquinones and stilbenes that are commonly observed in different *Rheum* species (Aburjai 2000; Komatshu et al. 2006; Lin et al. 2006; Krafczyk et al. 2008; Wang et al. 2010) are also present in *R. acuminatum* and *R. australe*. The concentrations of chrysophanol, emodin, aloe-emodin, physcion and rhein found in our study were slightly lower in cultivated plants than in *Rheum* species growing in China but concentrations of chrysophanol and emodin were higher in naturally growing plants in Nepal (Shang and Yuan, 2003; Li et al., 2004; Komatsu et al. 2006). The content of above mentioned phytochemicals was much lower than in *Cassia tora*, *Rumex japonicus* and *Rhamnus purshiana* (Koyama et al. 2003). The presence of higher number of compounds in natural and mature plants than cultivated plants (which were younger than plants in natural habitats) is comparable to the conclusions of research carried out in India for *R. australe* (Malik et al. 2010). There is more resveratrol in roots of *R. acuminatum* and *R. australe* than in wine even in cultivated plants which means cultivated *Rheum* species could be a great sources of resveratrol without damaging the natural populations.

The results showed that there were highest proportion of vegetative plants followed by seedlings and flowering individuals for both rhubarb species and habitats in *R. acuminatum* and *R. australe*. Seed production and seed mass was lower in *R. acuminatum* than in *R. australe*. The growth, survival and mortality of *R. acuminatum* were depended on habitats and years and differed between the two species when growing in open habitats. At 0.5 % germination rates, asymptotic growth rates (λ) varied from 1.02- 1.09 for *R. acuminatum* growing in forest habitats, 0.87-1.05 for *R. acuminatum* growing in open habitats and 1.03- 1.17 for *R. australe* growing in open habitat. *R. acuminatum* growing in open habitat was more sensitive to

harvesting than *R. acuminatum* growing in forest or *R. australe* in open habitat. Negative impact of root harvest in *Rheum* species was similar to previous studies (Nault and Gagnon 1993; Nault et al. 1996; Rock et al. 2004; Ghimire et al. 2008). Since high volume of rhubarb plants is being traded annually it is necessary to use selective or rotational (at least 5 years) harvesting. Formulation of management plans should be done in accordance to local prospective.

Invasion of *Parthenium hysterophorus* showed significant impact in aboveground vegetation composition and belowground soil properties in three different localities of central Nepal. The strong negative effects of *Parthenium hysterophorus* on vegetation composition is because it grows fast and spreads easily as transported by various vectors, such as animals, wind and water, and establish quite well in open and disturbed areas (e.g. Navie et al. 1996; Javaid et al. 2007). The high amount of aboveground biomass together with the higher decomposition has contributed in increase in organic matter nitrogen content of the soil (Koutika et al. 2007). The higher soil pH in invaded plots could be due to the increased concentration of potassium observed in invaded plots (Ehrenfeld 2003). This highly noxious *P. hysterophorus* is also reported to cause many health problems in humans and livestock, and it poses a large threat to native flora (e.g., Evans 1997; Adkins and Navie 2006) and thus needs proper management in Nepal.

5. Conclusions

The major conclusions of the studies are: (i) medicinal plants show higher species richness in lower elevations that could be explained by carbon-nutrients balance-hypothesis. Since, distributional pattern of medicinal plants is based on interpolation method which assumes that medicinal plants occur throughout their elevational range regardless of habitats, it is however necessary to verify the conclusions with practical sampling in the field with measured climatic variables; (ii) Although the Humla district is rich in medicinal plants, it still remains exploration and the traditional uses of plants need phytochemical or pharmacological studies and as most of the plants are collected in wild they should be domesticated for conservation; (iii) *Rheum australe* is narrowly restricted in its distributions and is highly exploited due to trade, cultivation practices are necessary to meet the market demands; (iv) *Rheum acuminatum* and *Rheum australe* would grow well if shifted to low altitudes than their actual habitats as there were higher percentages of growth at warm alternating temperatures with good sunlight; (v) The comparison of concentration of active chemical compound in roots of *R. acuminatum* and *R. australe* have revealed that these two species could be used as substitute of one another due to the presence of almost same secondary metabolites that are used for wide ranges of diseases. Either cultivated or naturally growing plants are equally important as they contain some important chemical were, however, equally common in naturally grown and cultivated plants; (vi) Study on population dynamics showed that *R. acuminatum* growing in open habitat perform less well than in forest habitat or *R. australe* mostly growing in open habitat. The Himalayan rhubarb species are sensitive to harvesting of roots harvesting has strong negative impacts on population sizes. Natural populations should be harvested by selective or rotational harvesting. The formulation of management plans in accordance to local prospective is necessary; (vii) the noxious *Parthenium hysterophorus* growing in a wide variety of

habitat is capable of changing ecosystem or local biodiversity due to its negative impacts in above-ground vegetation as well as in below ground soil nutrients. Thus, it is important to manage *P. hysterothorus* to avoid potential threats in the future in Nepal.

6. References

- Aburjai T.A. 2000. Anti-platelet stilbenes from aerial parts of *Rheum palaestinum*. *Phytochemistry* 55: 407-410.
- Ahmad B. 1998. Plant exploration and documentation in view of land clearing in Sabah. In: Nair M.N.B., Ganapathi N. (Eds.) *Medicinal Plants. Cure for the 21st Century. Biodiversity Conservation and Utilization of Medicinal Plants. Proceedings of a seminar, 15-16 October 1998*, pp. 161-162. Serdang, Malaysia, Faculty of Forestry, Universiti Putra Malaysia.
- Balunas M.J., Kinghorn A.D. 2005. Drug discovery from medicinal plants. *Life Sciences* 78: 431-441.
- Bernal J., Mendiola J.A., Ibáñez E., Cifuentes A. 2011. Advanced analysis of nutraceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 55: 758-774.
- Bramwell D. 2002. How many plant species are there? *Plant Talk* 28: 32-34.
- CAMP. 2001. Conservation assessment and management prioritization report. International Development Research Centre (IDRC), Canada/Ministry of Forest and Soil Conservation, HMG, Nepal.
- Edwards D.M. 1996. The Trade in Non-Timber Forest Products from Nepal. *Mountain Research and Development* 16: 383-394.
- Fabricant D.S., Farnsworth N.R. 2001. The Value of Plants Used in Traditional Medicine for Drug Discovery. *Environmental Health Perspectives* 109: 69-75.
- Farnsworth N.R., Soejarto D.D. 1991. Global importance of medicinal plants. In: O. Akerele, Heywood V., Syngé H. (Eds.) *The conservation of medicinal plants*, Cambridge University Press, UK, pp. 25-51.
- Ghimire S.K., Gimenez O., Pradel R., McKey D., Aumeeruddy-Thomas Y. 2008. Demographic variation and population viability in a threatened Himalayan medicinal and aromatic herb *Nardostachys grandiflora*: matrix modelling of harvesting effects in two contrasting habitats. *Journal of Applied Ecology* 45: 41-51.
- Govaerts S. 2001. How many species of seed plants are there? *Taxon* 50: 1085-1090.
- Grünwald J., Büttel K. 1996. The European phytotherapeutics market. *Drugs Made In Germany* 39: 6-11.
- Gurib-Fakim A. 2006. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine* 27: 1-93.
- Hamilton A.C. 2004. Medicinal plants, conservation and livelihoods. *Biodiversity and Conservation* 13: 1477-1517.
- Chandrasekharan C. 1993. Issues involved in the sustainable development of non-wood forest products.
- Chaudhary R.P. 1998. *Biodiversity in Nepal: Status and Conservation*. S. Devi, Saharanpur, India and Tecpress Books, Bangkok, Thailand.
- Chaudhary R.P. 2000. Forest conservation and environmental management in Nepal: a review. *Biodiversity and Conservation* 9: 1235-1260.

- IUCN Species Survival Commission Medicinal Plant Specialist Group. 2007. Why Conserve and Manage Medicinal Plants? www.iucn.org/themes/ssc/sgs/mpsg/main/Why.html.
- Kapoor V.P. 2005. Herbal cosmetics for skin and hair care. *Natural Products Radiance* 4: 306-314.
- Kinghorn A.D., Su B.N., Jang D.S., Chang L.C., Lee D., Gu J.Q., Carcache-Blanco E.J., Pawlus A.D., Lee S.K., Park E.J., Cuendet M., Gills J.J., Bhat K., Park H.S., Mata-Greenwood E., Song L.L., Jang M., Pezzuto J.M. 2004. Natural inhibitors of carcinogenesis. *Planta Medica* 70: 691-705.
- Komatshu K., Nagayama Y., Tanaka K., Ling Y., Cai S.-Q., Omote T., Meselhy M.R. 2006. Comparative study of chemical constituents of Rhubarb from different origins. *Chem. Pharm. Bull.* 54: 1491-1499.
- Koyama J., Morita I., Kawanishi K., Tagahara K., Kobayashi N. 2003. Capillary electrophoresis for simultaneous determination of emodin, chrysophanol, and their 8- β -D-glucosides. *Chem. Pharm. Bull.* 51: 418-420.
- Krafczyk N., Kötke M., Lehnert N., Glomb M.A. 2008. Phenolic composition of Rhubarb. *Eur Food Res Technol.* 228: 187-196.
- Kuipers S.E. 1997. Trade in medicinal plants. In: Bodeker G., Bhat K.K.S., Burley J., Vantomme P. (Eds.) *Medicinal plants for forest conservation and health care*, Rome, FAO (Non-wood Forest Products 11), pp. 45–59.
- Kunwar S.C., Ansari A.S., Luintel H. 2009. Non-timber forest products enterprise development: regulatory challenges and experienced in the Koshi hills of Nepal. Discussion paper. Kathmandu, Forest Action, pp 15.
- Lacoul R., Pant R.S. 2000: An overview: Medicinal and aromatic plants of Nepal. In: Watanabe T., Takano A., Bista M.S., Saiju H.K. (eds.) (2002) *The Himalayan plants: Can they save us?* Proceedings of Nepal-Japan Joint Symposium on Conservation and Utilization of Himalayan Medicinal Resources, Society for the Conservation and Development of Himalayan Medicinal Resources (Japan), pp 182-188.
- Lange D. 1998. *Europe's medicinal and aromatic plants: Their use, trade and conservation*. Cambridge, UK, TRAFFIC International.
- Larsen H.O., Olsen C.S., Boon T.E. 2000. The non-timber forest policy process in Nepal: Actors, objectives and power. *Forest Policy and Economics* 1: 267-281.
- Larsen H.O., Smith P.D., Olsen C.S. 2005. Nepal's conservation policy options for commercial medicinal plant harvesting: stakeholders view. *Oryx* 39: 435-441.
- Li F., Cao Q.-E., Ding Z. 2004. Separation and determination of five anthraquinones in *Rheum* and *Rheum*-containing preparations by capillary zone electrophoresis. *Chromatographia* 59: 753-757..
- Lin C.-C., Wu C.-I., Lin T.-C., Sheu S.-J. 2006. Determination of 19 Rhubarb constituents by high performance liquid chromatography–ultraviolet–mass spectrometry. *J. Sep. Sci.* 29: 2584-2593.
- Malik S., Sharma N., Sharma U.K., Singh N. P., Bhushan S., Sharma M., Sinha A.K., Ahuja P.S. 2010. Qualitative and quantitative analysis of anthraquinone derivatives in rhizomes of tissue culture-raised *Rheum emodi* Wall. plants. *Journal of Plant Physiology* 167: 749-756.
- Marinelli J. 2005. *Plant: The Ultimate Visual Reference to Plants and Flowers of the World*. New York: DK Publishing, Inc.

- Nantel P., Gagnon D. Nault A. 1996. Population viability analysis of American ginseng and wild leek harvested in stochastic environments. *Conservation Biology* 10: 608-621.
- Nault A., Gagnon D. 1993. Ramet demography of *Allium tricoccum*, a spring ephemeral, perennial herb. *Journal of Ecology* 81: 101-119.
- Olsen C.S. 2005. Quantification of the trade in medicinal and aromatic plants in and from Nepal. *Acta Horticulture* 678: 29-35.
- Press J.R., Shrestha K.K., Sutton D.A. 2000. Annotated Checklist of the Flowering Plants of Nepal. The Natural History Museum, London.
- Rock J.H., Beckage B., Grossb L.J. 2004. Population recovery following differential harvesting of *Allium tricoccum* Ait. in the southern Appalachians. *Biological Conservation* 116: 227-234.
- Samuelsson G. 2004. *Drugs of Natural Origin: a Textbook of Pharmacognosy*, 5th Swedish Pharmaceutical Press, Stockholm.
- Sharma A.B. 2004. Global medicinal plants demand may touch \$5 trillion by 2050. *Indian Express* Monday March 29.
- Sharma U. 2007. Medicinal and aromatic plants: a growing commercial sector of Nepal. *The Initiation* 4-8.
- Tiwari N.N., Poudel R.C., Uprety Y. 2004. Study of medicinal and aromatic plants (MAPs) in Kathmandu Valley. Winrock International BDS/MaPS, Bukhundole, Lalitpur, Nepal.
- Wang X.-M. 2010. Optimization of DNA isolation, ISSR-PCR system and primers screening of genuine species of rhubarb, an important herbal medicine in China. *Journal of Medicinal Plants Research* 4: 904-908.

Curriculum Vitae

Maan Bahadur ROKAYA

Born 28th May 1976, Simikot, Humla, NEPAL

rokayamaan@gmail.com

Fields of Interest: Conservation biology, Resource management, Plant systematics, Phytogeography, Ethnoecology.

Education

- 2006-2011 Ph.D. Scholar, Department of Ecology, Charles University in Prague, Czech Republic
Thesis title: (Diversity, distribution and Conservation of Medicinal plants in Nepal (Supervised by doc. RNDr. Zuzana Münzbergová, Ph.D.)
- 1999-2001 M.Sc. in Botany with thesis (Central Department of Botany, Tribhuvan University, Kathmandu - First Division, 69.6 %; Main Subjects: Ecology, Taxonomy, Cytogenetics, Pathology, Physiology etc.).
Thesis title: Ethnoecology of Medicinal Plants in Dho-Tarap Area in Buffer Zone of Shey Phoksundo National Park, Dolpa, Nepal (Supervised by Dr. Suresh Kumar Ghimire) (defended on February 2003).
- 1996-1999 **B.Sc.** in Biology (Amrit Science Campus, Tribhuvan University – IInd Division; Main Subject: Botany, Chemistry, and Zoology and English); Amrit Science Campus, Tribhuvan University
- 1993-1995 **I.Sc.** in Biology (Amrit Science Campus, Tribhuvan University – IInd Division; Main Subject: Biology, Physics, and Chemistry)
- 1993 **S.L.C.** (School Leaving Certificate), (Budhanilkantha School, Kathmandu – Ist Division)

Publications in Impacted Journals

1. **Rokaya M.B.**, Münzbergová Z., Timsina B. 2010. Ethnobotanical study of medicinal plants from the Humla district of western Nepal. *Journal of Ethnopharmacology* 130: 485–504.
2. Timsina B., Shrestha B.B, **Rokaya M.B.**, Münzbergová Z. 2011. Impact of *Parthenium hysterophorus* L. invasion on plant species composition and soil properties of grassland communities in Nepal. *Flora* 206: 233–240.

Other Publications

1. Acharya K.P., **Rokaya M.B.** 2010. Medicinal Orchids of Nepal: Are They Well Protected? - Our Nature 8: 82-91.
2. **Rokaya M.B.** 2006. Systematics Of Nepalese Genus Clerodendrum L., *Botanica Orientalis*, Vol. 5.
3. Shrestha M.R., **Rokaya M.B.**, Ghimire S. K. 2006. Checklist of Trans-Himalayan Dicot Flora of Northwest Nepal: Dolpo and Its Surroundings. *Scientific world*: 4: 84-95.
4. **Rokaya M.B.**, Shrestha M. R.; Ghimire S. K. 2005. Ethnoecology of Natural Environment in Trans-Himalayan Region of West Nepal. *Banko Jankari* 15: 33-38.
5. Shrestha M.R., **Rokaya M.B.**, Ghimire, S.K. 2005. Vegetation patterns of Trans-Himalayan Zone in the North West Nepal. *Nepal Journal of Plant Sciences* 1: 129-135.
6. Acharya K.P., **Rokaya M.B.** 2005. Ethnobotanical survey of Medicinal plants traded in the streets of Kathmandu valley. *Scientific world* 3: 44-48.
7. **Rokaya M.B.**, Ghimire S.K. 2004. Vegetation analysis of Medicinal plants in Dho-Tarap area of Upper Dolpo, Mid-western Nepal. *Botanica Orientalis* 4:46-50.
8. **Rokaya M.B.**, Ghimire, S.K. 2003. Phytogeography of Medicinal Plants in Dho-Tarap Area in Upper Dolpo, *Botanica Orientalis* 3: 128-132.

Publications in Proceedings

1. **Rokaya M.B.**, Ghimire S.K. 2006. Ethnobotany and conservation status of highly used medicinal plants in Dho-Tarap, Upper Dolpa, west Nepal. In: Fourth conference on Science and Technology, March 23-26, 2004, Nepal Academy of Science and Technology (NAST), pp. 752-760.
2. **Rokaya M.B.**, Kurungang N., Ghimire S.K. 2005. Local use and conservation status of medicinal plants in upper Dolpo, Nepal. In: Himalayan medicinal and Aromatic plants, Balancing use and Conservation. (Eds.) Thomas, Y. M. Karki, K. Gurung and D. Parajuli. Proceedings of the Regional workshop on wide practices and Experiential Learning in Conservation and Management of Himalayan Medicinal Plants. Dec 15-20, 2002. Kathmandu, Nepal. pp. 511-513.

Abstracts

1. Timsina B., Shrestha B.B., **Rokaya M.B.** 2010. Impact of *Parthenium hysterophorus* L. invasion on soil and plant species composition of grasslands in central Nepal. In: International Conference on Biodiversity, Livelihood and Climate Change in the Himalayas, December 12-14, 2010, Kathmandu, Nepal. (In process)
2. **Rokaya M.B.**, Münzbergová Z. 2010. Population dynamics and harvesting techniques of Himalayan Rhubarb species from Nepal. In: Plant Population Biology Crossing Borders Nijmegen, 13-15 May 2010.

3. **Rokaya M.B.**, Timsina B., Shrestha B.B, Münzbergová Z. 2009. Effect of *Parthenium hysterophorus* L. invasion on plant community composition and soil properties. In *Abstracts: Plant Population Biology in a changing world*, Bern, 2009.
4. **Rokaya M.B.**, Münzbergová Z., Shrestha M.R., Timsina B. 2008. Species richness and patterns of uses of medicinal plants along a central Himalayan elevational gradient, Nepal. In: *Plant Population Biology for the coming decade 2008*, Luxembourg.
5. Shrestha M.R., **Rokaya M.B.**, Ghimire S.K. 2005. Vegetation pattern and ethnoecology of trans-Himalayan zone of northwest Nepal. In: *Asia Section - 1st Regional Conference, The Society for Conservation Biology*, 17- 20 November 2005.
6. **Rokaya M.B.**, Ghimire S.K. 2005. Indigenous Knowledge and Uses of Medicinal Plants by Local People of Tsarka Bhot, Dolpo, West Nepal. In: *Third National Botanical conference: Conservation and Utilization of Plant Wealth of Nepal and 14th Annual General Meeting: May 12-13, 2005*, organized by Nepal Botanical Society, Kathmandu, Nepal.
7. **Rokaya M.B.**, Ghimire S.K. 2004. Ethnobotany and Conservation status of highly used medicinal plants in Dho-Tarap Area, Upper Dolpo, West Nepal. In: *Fourth conference on Science and Technology*, March 23-26, 2004, RONAST, pp. 124.
8. **M.B. Rokaya**, Kurungbang N., Ghimire S.K. 2004. Ethno-ecology and conservation status of medicinal plants in Dho-Tarap area, Upper Dolpo, West Nepal. In: *Workshop Organized by Ecological Society, Post-Graduate Campus, Biratnagar and Nepal Biological Society Biratnagar, Nepal*, pp. 49.