



INFORME PREVIO SOBRE LA CARACTERIZACION DE  
LA ESPECIE *Desmodium ovalifolium*, UTILIZANDO  
PATRONES ELECTROFORETICOS DE PROTEINAS.

Hernando Ramírez

José Marcelino Sobrinho

Mayo 10, 1982

026594

15 NOV 1982

## INTRODUCCION

*Desmodium ovalifolium* Wall, es una especie Asiática del género, que recientemente ha recibido considerable atención como planta forrajera en los trópicos. En el Sur de Asia, hace muchos años ha sido utilizada como planta de cobertura en plantaciones de caucho y coco. Se tornó común su uso en su centro de origen por sus características de tolerancia a sombra y cubrir bien el suelo sin competir con los cultivos. Sólo recientemente fué traída a América tropical donde evidenció su promisorio potencial como una nueva opción de grande impacto en la producción ganadera en áreas tropicales. Reconocidos atributos de productividad, adaptabilidad y persistencia en suelos ácidos e infértiles con estaciones cortas están siendo demostrados en variadas situaciones.

Recientemente el Programa de Pastos Tropicales del Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT, ha logrado excelentes resultados con la accesión CIAT 350. Esta accesión en ensayos bajo pastoreo conducidos en los Llanos Orientales de Colombia, mostró ser altamente competitiva y compatible con gramíneas estoloníferas y agresivas como *Brachiaria decumbens* Stapf y *Brachiaria humidicola* (Rendle) Schwick. Con los resultados de éstos logros el CIAT ha dirigido esfuerzos hacia la obtención de nuevos germoplasmas de ésta especie. De esta forma recibimos material genético procedente de diversas instituciones de diferentes partes del mundo. Además, expediciones de búsqueda y recolección de germoplasma nativo del Sur de Asia, específicamente Tailandia; proporcionó gran incremento en la colección y también proporcionó una gran variación en cuanto a características agronómicas, morfológicas, y fisiológicas de las plantas.

La presencia de duplicados en la colección es posible, debido a que las descripciones de muchas accesiones provenientes de diferentes fuentes están incompletas para dar informaciones exactas de su origen. Además, muchas accesiones tienen características en general tan parecidas que no permiten ser claramente distinguidas unas de las otras.

La literatura sobre *Desmodium ovalifolium* Wall es muy restringida y conflictiva. Incluso su descripción taxonómica no está muy clara, pues algunos

autores que abordaron el asunto no están de común acuerdo en sus descripciones de especies evolutivamente cercanas al *Desmodium ovalifolium* Wall y *Desmodium heterocarpon* (L). DC.. Ohashi (1973), no obstante, trabajó posteriormente a otros autores y no reconoció a *Desmodium ovalifolium* Wall como una especie, y lo considero como *Desmodium heterocarpon* (L). DC. subesp. *heterocarpon* var. *heterocarpon*. En su trabajo, el *Desmodium heterocarpon* (L). DC. fué considerado una de las especies más polimórficas del género y aún variablemente delimitado.

Electroforesis de proteínas totales e isoenzimas como las esterases, en tejidos vegetales, principalmente semillas, han sido una herramienta muy útil en estudios evolutivos de plantas cultivadas. Esto proporciona informaciones que pueden ser utilizadas como una ayuda adicional para indicar relaciones entre especies y hasta accesiones. Recientemente el CIAT ha logrado excelentes resultados con *Stylosanthes* a nivel de distinción de ecotipos. Para esto, utilizaron electroforesis de las proteínas totales de semillas, basándose en trabajos desarrollados por científicos de otras partes del mundo. A continuación una serie de ensayos fueron conducidos para tratar de desarrollar una metodología adecuada y que pueda ser utilizada, para que a través de electroforesis, indique relaciones entre especies de *Desmodium*. Inclusive se trató de desarrollar para un posible uso en el que se indiquen relaciones entre ecotipos o accesiones de *Desmodium ovalifolium* Wall.

Este informe presenta resultados previos obtenidos por pruebas de electroforesis de las proteínas totales y de esterases en diferentes tejidos y de *Desmodium ovalifolium* Wall, principalmente en semillas. Fueron ensayados diferentes buffers de extracción, diferentes concentraciones de muestras y diferentes técnicas de preparación de las muestras. Finalmente la colección total de *Desmodium ovalifolium* Wall del CIAT y *Desmodium heterocarpon* (L). DC. CIAT 365 fueron ensayadas para proteínas totales y esterases. Además, en el informe se presentan algunas sugerencias para mejorar la metodología y desarrollo de los ensayos comenzados.

## METODOLOGIA

Los extractos crudos de la proteína de la semilla se obtuvieron maseando en un mortero previamente enfriado, 0.2 gr de semilla detestada por pre-germinación (Aprox. 10 horas), en un volumen de 5 ml de buffer THCa (Tris, HCl, CaCl<sub>2</sub>) 0.06M, pH = 8,1, preparado según : Ladizinsky y Hamel (1980). El extracto obtenido se centrifugó a 5000 RPM por 20 minutos en una Srovall RC-2B refrigerada a 4°C.

El sobrenadante se utilizó en la separación de las proteínas, lo cual se hizo en un equipo vertical Bio-Rad en geles planos de polyacrylamida y en un sistema discontinuo de buffers : Tris-borato 0.065M pH = 9.0 (Fobes 1979) como buffer del electrodo, y Tris-HCl 1,5M pH = 8,8 (Weber y Osborn 1969) como buffer del gel de separación.

Para la electroforesis se usó 30 microlitros del extracto crudo de proteínas de cada muestra. La corrida se hizo a 250 voltios por 3 horas, utilizando azul de bromofenol al 0.05% como colorante guía en la corrida. Terminada la electroforesis, uno de los geles se tiñó para proteínas totales con azul de Coomassie al 0.25% por espacio de una hora y a temperatura ambiente. El otro gel se tiñó para las isoenzimas esterases con  $\alpha$ -Naftil Acetato (40 mg) como sustrato y Fast Blue RR Salt (100 mg) para la tinción de las bandas de esterases. La incubación se hizo por una hora a temperatura ambiente. La decoloración de los geles se hizo por difusión de acuerdo al método de Stegemann, que consiste en una solución de Metanol al 29% y Acido Acético al 5% para proteínas totales, y de una solución de Metanol al 20% y Acido Acético al 5% para las esterases. Una vez decolorados los geles, estos se guardan en bolsas de polietileno las cuales son selladas con calentamiento, y los geles así empacados se guardan en un lugar fresco y oscuro.

## RESULTADOS PREVIOS Y DISCUSION

En la tabla anexa se resume todo lo que hemos hecho hasta el momento en el intento de la caracterización de la especie *Desmodium ovalifolium*. Al principio se siguió la metodología utilizada por Robinson y Megarrity (1975), quienes caracterizaron especies del género *Stylosanthes* utilizando patrones

electroforéticos de proteínas de semillas; pero la metodología no fué lo suficientemente sensible para detectar diferencias entre individuos dentro de una misma especie (Robinson, Date y Megarrity. 1976.).

En nuestro trabajo previo con el género *Stylosanthes* encontramos que a nivel de especie se observó muy buenas diferencias en los patrones de bandas de proteínas de semillas, no así en individuos dentro de una misma especie, en donde sólo en casos especiales se observaron diferencias.

En la especie *Desmodium ovalifolium* ésta metodología no fué muy efectiva, por lo cual, fué necesario hacer una serie de modificaciones hasta obtener unos zymogramas aceptables como los obtenidos en las electroforesis No. 36 y No. 37. Uno de los primeros problemas que se tuvo en la separación de las proteínas del *Desmodium ovalifolium* fué el alto contenido de taninos de las semillas (Aprox. 11%) las cuales forman complejos taninos-proteínas (Van Buren y Robinson 1969), impidiendo una buena separación en los patrones de bandas de éstas. Dichos patrones mejoraron cuando adicionamos polyvinylpirrolidona (PVP) al 2% al Buffer de extracción, la cual atrapa en buena parte los taninos evitando que éstos formen complejos con las proteínas (Jones, Lyttleton y Clarke 1970), y (Jones y Lyttleton 1971).

El patrón de bandas también mejoró cuando empezamos a utilizar el buffer THCa (Tris, HCl, Cloruro de Calcio) (Ladizinsky y Hamel 1980), como buffer de extracción; finalmente se tuvo mayor resolución en el patrón de bandas cuando empezamos a remover la testa de las semillas colocando éstas a pre-germinar por un tiempo de aprox. 10 horas; demostrándose de esta forma de que los taninos (polifenoles) se encuentran en su totalidad en la testa de dichas semillas.

A pesar de que se mejoró bastante en los patrones de bandas, estas no son lo suficientemente satisfactorios como para poder apreciar diferencias entre ecotipos de la especie *Desmodium ovalifolium*, ni creemos que se puedan mejorar mucho, pues ya hemos visto que el método de los patrones electroforéticos de proteínas totales no es lo suficientemente sensible como para detectar diferencias a nivel de ecotipos, y esto ocurría también en los trabajos de Robinson, Date y Megarrity (1976) y Shunichiro Nakamura (1977). Debido a este limitante que hacía que las electroforesis de proteínas totales no tenían

mucha validez como criterio de clasificación, a nivel de ecotipos, fué necesario desarrollar toda una metodología con marcadores isoenzimáticos (Brew Baker et. al. 1968), (Brewer, G.J. 1970), lo suficientemente sensibles como para poder detectar diferencias entre individuos muy estrechamente relacionados (Gates y Boulter 1978), con gran aplicación en estudios genéticos y evolutivos (Rick, Fobres y Holle 1977) lo mismo que en la determinación de la pureza de semillas comerciales (Woods y Thurman 1976), (Wills y Wiseman 1980), (Tanksley y Jones 1981).

Finalmente, debemos admitir de que la Quimiotaxonomía no es la última palabra en cuanto a clasificación, más sí, una herramienta muy útil a la taxonomía botánica y agronómica, y tanto los patrones de proteínas totales, como los patrones isoenzimáticos son importantes porque aportan nuevos criterios para una mejor y más acertada clasificación.

ELECTROFORESIS No.	FECHA	MUESTRAS	PREPARACION DE LA MUESTRA	BUFFER DE EXTRAC.	OBJETIVO DE LA ELECTROFORESIS
E-10	Feb 16/82	D.O. 350	0,3 gr de semilla no determinada en 10 Ml de buffer	1) Robinson pH= 8.3 2) Tris-Ac. Asc. 0,06M pH = 8,0 3) Tris-Gly 0,05M pH=8,3 4) Fosfato 0,01M pH=7.0	Encontrar el buffer de extracción más adecuado.
E-14	Mar 2/82	D.O.350A D.O.3666 D.H. 365	0,2 gr de semilla no detestada en 7 Ml de buffer	Robinson pH = 8.3	Observar si hay diferencias en los patrones de bandas en estos 3 ecotipos seleccionados.
E-16	Mar 8/82	D.O. 350 D.O. 3666 D.H. 365	0,2 gr de semilla no detestada en 10 Ml de buffer	Fosfato 0.01M pH=7.0 + PVP	Observar si el buffer Fosfato 0.01M pH = 7.0 + PVP mejora el patrón de bandas en las muestras.
E-17	Mar 10/82	D.O. 350 D.O. 3666 D.H. 365	0,25 gr de semilla no detestada en 10 Ml de buffer	Robinson modificado + PVP+ DIECA pH = 8,3	Observar si el buffer de Robinson modificado mejora las bandas en los ecotipos de D.O. seleccionados'

ELECTROFORESIS No.	FECHA	MUESTRAS	PREPARACION DE LA MUESTRA	BUFFER DE EXTRAC.	OBJETIVO DE LA ELECTROFORESIS
E-18	Mar 12/82	D.O. 350 D.O. 3666 D.O. 365	0,25 gr de semilla no detestada en 10 Ml de buffer	Robinson modificado pH = 8,3	Observar si la diálisis por 20 horas de las muestras, mejora los patrones de bandas de los ecotipos de D.O. seleccionados
E-19	Mar 16/82	D.O. 350	0,25 gr de semilla no detestada en 10 Ml de buffer	1) Rob+PVP 2) Rob-PVP 3) Fosf+ PVP 4) Fosf-PVP	Observar el efecto del PVP en la resolución de los patrones de bandas en <i>Desmodium ovalifolium</i> .
E-24	Abr 5/82	D.O. 3668	0,25 gr de semilla no detestada en 10 Ml de buffer	1) Robinson 2) Rob+PVP 3) THCa 4) THCa+PVP	Observar si el nuevo buffer de extracción THCa (Tris: 0.06M) pH=8,1 mejora el patrón de bandas.
E-25	Abr 6/82	D.O. 3663	0,2 gr de semillas detestadas : a) Mecanicamente b) por pre-germinac	1) Robinson 2) Rob+PVP 3) THCa 4) THCa+PVP	Observar el efecto de la remoción de la testa de las semillas, en los patrones de bandas de <i>Desmodium ovalifolium</i> .
E-29	Abr 12/82	D.O. 350	0,2 gr de semilla detestada por prégerminación	1) THCa 2) Robinson 3) THCa+Rob	Observar el tiempo de pre-germinación (para remover la testa de las semillas) y ver cómo afecta este los patrones de bandas.



ELECTROFORESIS No.	FECHA	MUESTRAS	PREPARACION DE LA MUESTRA	BUFFER DE EXTRAC.	OBJETIVO DE LA ELECTROFORESIS
E-30	Abr 13/82	D.O. 3668	1) semilla 0,2gr/7Ml 2) plántula (3 días) 0,27gr/7Ml 3) hoj.plant.(3días) 0,18gr/7Ml 4) Tall.plant(3días) 0,08 gr/5Ml	THCa 0,06M pH = 8,1	Observar el patrón de bandas de diferentes tejidos de D.O. 3668: semilla, plántula (3 días), tallo (3 días), hojas (3 días).
E-31	Abr 17/82	D.O. 3652 D.O. 3673 D.O. 3788 D.O. 3784 D.O. 350	0,17 gr de semilla detestada por pre-germinación ( 5h) en 5Ml de buffer	THCa 0.06M pH = 8.1	Comparar los patrones de bandas de 5 ecotipos de <i>Desmodium ovalifolium</i> seleccionados.
E-33	Abr 24/82	D.O. 350 D.O. 3652 D.O. 3788 D.O. 3784	Semilla 0,2 gr/5ml plántula 0,3gr/5ml	THCa 0.06M pH = 8,1	Observar los patrones de bandas en plántulas germinadas en la luz y en la oscuridad.
E-34	Abr 27/82	D.O. 3673 D.O. 3788 D.O. 3784 D.O. 350 D.O. 3652	0,2 gr de semilla detestada por pre-germinación (6h) en 5 Ml de buffer	THCa 0.06M pH = 8.1	Observar el patrón de bandas de estos 5 ecotipos de <i>D. ovalifolium</i> seleccionados.
E-35	Abr 28/82	D.O. 3784 D.O. 3673 D.O. 3652 D.O. 3788 D.O. 350	0,2 gr de semilla detestada por pre-germinación 96h) en 5Ml de buffer	THCa 0.06M pH = 8.1	Observar el efecto de la diálisis en el patrón de bandas de estos 5 ecotipos de <i>Desmodium ovalifolium</i> seleccionados.

ELECTROFORESIS No.	FECHA	MUESTRAS	PREPARACION DE LA MUESTRA	BUFFER DE EXTRAC.	OBJETIVO DE LA ELECTROFORESIS
E-36	May 4/82	D.H. 365 D.O. 350 D.O. 3776 D.O. 3778 D.O. 3780 D.O. 3784 D.O. 3793 D.O. 3788 D.O. 3673 D.O. 3666	0,2 gr de semilla detestada por pre- germinación en 5 Ml de buffer. La extracción se dejó toda la noche en la nevera, y se centri- fugó 18 h después.	THCa 0.06M pH = 8.1	Primera serie : de 10 ecotipos seleccionados para comparar sus patrones de bandas.
E-37	Mayo 6/82	D.O. 350 D.O. 350A D.O. 3663 D.O. 3794 D.O. 3781 D.O. 3668 D.O. 3608 D.O. 3607 D.O. 3674 D.O. 3652	0,2 gr de semillas detestadas por pre- germinación (15h) en 5 Ml de buffer. La extracción se dejó toda la noche en la nevera y se centri- fugó después de 18h.	THCa 0.06M pH = 8.1	Segunda serie : de otros 10 ecotipos de <i>D. ovalifolium</i> para comparar sus patrones de bandas.

## REFERENCIAS

- 1) G. Ladizinsky and A. Hamel. (1980). Seed Protein Profiles of Pigeon pea (Cajanus cajan) and some Atylosia species. Euphytica 29 : 313-317.
- 2) Jon F. Fobres. (1980). Trisomic analysis of isozymic loci in tomato species : Segregation and dosage effects. Biochemical Genetics, Vol.18, Nos. 3/4.
- 3) Klaus Weber and Mary Osborn. (1969). Proteins and sodium dodecyl sulfate molecular weight determination on polyacrylamide gels and related procedures.
- 4) P.J. Robinson and R.G. Megarrity (1975). Characterization of Stylosanthes introductions by using seed protein patterns. Aust. J. Agric. Res. 26: 467-479.
- 5) P.J. Robinson, R.A. Date, and R.G. Megarrity (1976). Nodulation of Stylosanthes guyanensis : Prediction of Rhizobium effectiveness response with seed isozyme patterns. Aust. J. Agric. Res. 27 : 381-389.
- 6) J.P. Van Buren and W.B. Robinson (1969). Formation of complex between protein and tannic acid. J. Agric. Food Chem. 17: 772-777.
- 7) W.T. Jones, J.W. Lyttleton and R.T.J. Clarke (1970). The soluble proteins of legume forages in New Zealand, and their relationship to bloat. N.Z. J. Agric. Res. 13: 149-156.
- 8) W.T. Jones, and J.W. Lyttleton (1971). A survey of legume forages that do and do not produce bloat. N.Z. Journal of Agric. Res. 14 : 101-107.
- 9) Shunichiro Nakamura (1977). Studies on the determination of species and cultivars on the basis of electrophoretic patterns of seed protein and seed enzymes. I. Brassica spp.; Radish and Cucurbita spp. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 46(1) : 32-47.

- 10) P. Gates and D. Boulter (1979). The use of seed isoenzymes as an aid to the breeding of field beans. (*Vicia faba*). *New Phytol.* 83: 783-791.
- 11) S. Woods and D.A. Thurman (1976). The use of seed acid phosphatases in the determination of the purity of F<sub>1</sub> hybrid. *Brussels Sprout Seed. Euphytica* 25 : 707-712.
- 12) A.B. Wills and Eveline M. Wiseman (1980). Acid phosphatase isoenzymes of *Brassica oleracea* seedling and their application to sib testing in F<sub>1</sub> hybrids. *Ann. Appl. Biol.* 94 : 137-142.
- 13) S.D. Tanksley and R.A. Jones (1981). Application of Alcohol dehydrogenase allozymes in testing the genetic purity of F<sub>1</sub> hybrids of tomato. *Hortscience* 16 (2) : 179-181.
- 14) Charles M. Rick, Jon, F. Fobres, and Miguel Holle (1977). Genetic variation in *Lycopersicon pimpinellipolium* : Evidence of evolutionary change in mating systems. *Plant Syst. Evol.* 127 : 139-170.
- 15) Brewbaker, J.L. M.D. Upadhy, Y. Makinen, and T. MacDonald (1968). Isoenzyme polymorphism in flowering plants. III. Gel electrophoresis methods and applications. *Physiol. plant.* 21: 930-940.
- 16) Brewer, G.J. (1970). *An introduction to isozyme techniques* (Academic Press, New York).
- 17) Ohashi, H. (1973) *The asiatic species of Desmodium and its allied genera. Gingkoana.* Academic Scientific Book Inc., Tokyo.