

**Universität Hohenheim**  
**Institut für Pflanzenproduktion in den Tropen und Subtropen**  
**Fachgebiet Weidewirtschaft und Futterbau in den Tropen und Subtropen**  
**Prof. Dr. R. Schultze-Kraft**

**Isoenzym-Charakterisierung einer Kollektion der**  
**tropischen Weideleguminose**  
*Desmodium ovalifolium*

**Diplomarbeit**  
von Bettina Klein, Bietigheim-Bissingen  
Oktober, 1997  
Biologie (Diplom)

Diese Arbeit wurde aus Mitteln der Eiselen-Stiftung, Ulm gefördert

## 6 Zusammenfassung

*Desmodium ovalifolium* (syn. *Desmodium heterocarpon* (L.) DC. subsp. *ovalifolium* (Prain) Ohashi) gilt als eine Futter- und Bodendeckerleguminose mit hohem Nutzungspotential in den humiden Tropen und Subtropen. Sie erlaubt nicht nur eine Erhöhung der Tierproduktion v.a. auf sauren und mageren Böden, sondern trägt auch zu Bodenerhaltung und -verbesserung bei.

In dieser Studie wurden 83 Herkünfte von *D. ovalifolium* mittels einer Isoenzym-Analyse charakterisiert. Hierbei wurde die Methode der vertikalen Poly-Acrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) angewandt. Diese Herkünfte repräsentieren den größten Teil der im CIAT, Cali, Kolumbien aufbewahrten Weltkollektion von *D. ovalifolium*. Auf diese Weise sollte die genetische Variabilität der Spezies ermittelt und mögliche genetische Duplikate identifiziert werden, um die Evaluierung und die Handhabung des Genmaterials gesammelter Wildpflanzen zu optimieren.

In der ersten Phase dieser Studie wurden ein geeigneter Extraktionspuffer und das Pflanzengewebe mit der höchsten Enzymaktivität ermittelt. Darüber hinaus wurden die Gele auf verschiedene Isoenzyme gefärbt, um zu bestimmen, welche deutlichen Polymorphismus zeigen. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wurde bei der anschließenden Charakterisierung mit einem modifizierten Robinson-Puffer und mit Keimlingsgewebe weitergearbeitet. So konnte die störende Wirkung von Polyphenolen (Tanninen), die bei *D. ovalifolium* in relativ hoher Konzentration auftreten, weitgehend unterbunden werden.

Von den 13 untersuchten Isoenzymen der ersten Phase zeigten nur zwei deutlichen Polymorphismus: die Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) und die  $\alpha,\beta$ -Esterase ( $\alpha,\beta$ -EST). Die Bandenmuster der GOT konnten in fünf Gruppen eingeteilt werden. Die Mehrheit der Herkünfte (fast 80 %) zeigte allerdings dasselbe Bandenmuster. Bei der  $\alpha,\beta$ -EST konnten sogar nur drei Herkünfte mit einem deutlich abweichenden Bandenmuster ausgemacht werden, obwohl dieses Enzym durchweg viel komplexere Bandenmuster aufweist, als die GOT. Die Bandenmuster von drei weiteren Herkünfte wichen nur leicht vom gängigen Grundtypus ab. Die restlichen 77 Herkünfte konnten nicht unterschieden werden.

Nur die Resultate der GOT wurden statistisch ausgewertet (mittels einer Korrespondenzanalyse, gefolgt von einer Cluster-Analyse). Die Ergebnisse der  $\alpha,\beta$ -EST dienten der Bestätigung einzelner Ergebnisse der GOT.

Eine Korrelation zwischen geographischen oder agronomischen Parametern und abweichenden Strukturen der Bandenmuster konnte nicht konstatiert werden. Ebenso wenig waren qualitative Marker auszumachen, die z.B. eine Aussage über den Tanningehalt erlauben.

Dennoch konnten für einige Herkünfte, die bereits in Feldversuchen durch besondere morphologische oder agronomische Eigenschaften aufgefallen waren, Besonderheiten in der Bandenstruktur nachgewiesen werden. Zu diesen Herkünften gehören die CIAT-Nummern 13113, 13119, 13645, 23197, 33058 und 33060.

Abschließend ist festzustellen, daß die Methodik der Isoenzym-Analyse mittels PAGE nicht dafür geeignet ist, die geringe genotypische Variabilität von *D. ovalifolium* zu charakterisieren. Es wird empfohlen, in Zukunft mit DNS-Markern (RAPD, RFLP) zu arbeiten, da diese wesentlich umweltunabhängiger sind und eine sicherere Aussage über den Genotyp ermöglichen. Außerdem sind auf diese Weise auch kleinste Unterschiede in der DNS nachweisbar.

## 8 Summary

*Desmodium ovalifolium* (syn. *D. heterocarpon* (L.) DC. subsp. *ovalifolium* (Prain) Ohashi) is considered as a pasture and cover legume of high potential in the humid and subhumid tropics. It can contribute not only to increased livestock production mainly on acid, low-fertility soils but also to soil protection and enhancement.

This study aimed to characterise biochemically 83 accessions of *D. ovalifolium* using isozyme analysis. These accessions represent the major part of the *D. ovalifolium* world collection held at CIAT, Cali, Colombia. The objective was to describe the genetic variation and to discover possible duplicates in order to optimize germplasm evaluation and management. The method applied was the vertical polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE).

In the first phase of the study, the most appropriate isozymes, extraction buffer and plant tissue were identified. Based on these results, the subsequent characterization was carried out with a modified Robinson buffer in combination with seedling tissue. Thus it was possible to reduce the effect of polyphenols (tannins), which occur in relatively large quantities in *D. ovalifolium*.

Of the 13 isozymes tested in the first phase, only two showed clear polymorphism: the Glutamate-Oxaloacetate-Transaminase (GOT) and the  $\alpha,\beta$ -Esterase ( $\alpha,\beta$ -EST). The banding patterns of the GOT could be divided into five groups but most of the tested accessions (nearly 80 %) showed the same banding pattern. In the case of the  $\alpha,\beta$ -EST, which showed more complex banding patterns than the GOT, only three accessions could be identified whose banding patterns differed clearly from the basic type. Three further accessions differed only slightly but their banding pattern differences were still notable. Differences, if any, among the remaining 77 accessions were so slight that they could not be used for further analysis. Statistical analysis (analysis of correspondence using SAS followed by a cluster analysis) was only performed with the results (band presence or absence) of the GOT; the results of the  $\alpha,\beta$ -EST could only be used to confirm some of the GOT results.

There was no relationship between geographical or agronomical parameters and differentiating banding patterns. Neither could any qualitative markers be identified that would have a clear relationship with tannin contents.

Nevertheless it was possible to show particularities in banding patterns of accessions that had distinct morphological and agronomical attributes in previous field experiments. These accessions were: CIAT 13113, 13119, 13645, 23197, 33058 and 33060.

It can be concluded, that isozyme characterization by PAGE is not appropriate to describe the low genetic variability that exists among most of the accessions. In case of further studies, it is recommended to use DNA markers such as RAPDs or RFLPs. DNA markers are essentially environment independent and are able to detect minimal genetic variability.