

MUTACIONES EN Rhynchosporium secalis (Oud.) Davis, INDUCIDAS CON LUZ ULTRAVIOLETA, Y SU UTILIZACION EN EL ESTUDIO DE LA RELACION HUESPED PARASITO. I. OBTENCION DE MUTANTES MORFOLOGICAS * _____

E. Coral-Quintero, J.A. Sarasola, E. Antonelli, E. Favret **

RESUMEN

En el estudio de la relación huésped : parásito, un aspecto importante es la evolución de los dos organismos. En el presente trabajo, mediante el empleo de la luz UV, se ha tratado de encontrar biotipos de Rhynchosporium secalis (Oud.) Davis que fuesen diferentes a los cultivos originales.

Para la inducción de mutantes se utilizó una lámpara de tubo de cuarzo Hanovia (Alpine Home model), cuyo mayor poder de emisión se encuentra en la longitud de onda de 2537 Å. Se hicieron tratamientos hasta 6 minutos con intervalos de 30 segundos.

Para el estudio se emplearon tres cultivos de diferente origen. Los cambios observados fueron : coloración de la colonia y tamaño de las esporas.

De los tres cultivos empleados se obtuvieron 29 variantes negras, 13 rosadas, 6 amarillas, 3 blancas, 4 rojizas, 11 cafés, 10 castañas, 2 grises. Todas las variantes, excepto una, mostraron una disminución en el tamaño de las esporas.

ABSTRACT

The aim of the present work was to obtain mutations from 3 isolates of Rhynchosporium secalis (Oud.) Davis, with U V light. Observed characteristics were culture coloration and spores length. Treatments from 30 seconds to 6 minutes were applied and 85 variants were obtained : 29 black, 13 rose, 6 yellow, 3 white, 4 redish, 11 brown, 10 dark brown and 2 gray; all variants except one, showed greater length than original.

INTRODUCCION

En las áreas de cultivo de la cebada, una de las enfermedades importantes por los daños que causa, es el escaldado o escaldadura, producida por el hongo Rhynchosporium secalis (Oud.) Davis. Son varios los autores que, dada la importancia de la enfermedad, han realizado estudios acerca de la herencia de la resistencia en cebada, como base para la obtención de variedades resistentes.

Uno de los objetivos del trabajo fue la inducción de mutantes de R. secalis mediante el empleo de la luz ultravioleta.

REVISION DE LITERATURA

El origen de cambios en hongos causantes de enfermedades se puede atribuir a causas sexuales o asexuales. Entre los mecanismos propuestos están : la recombinación parasexual (4) y la recombinación sexual, junto con la adap-

* Parcial de la tesis presentada por el autor principal para optar al título de M. Sc.

** Profesor Asistente, Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad de Nariño; Técnicos del CICA, INTA CASTELAR, Rep. Argentina, y Asesor del Ministerio de Agricultura, R. Argentina, respectivamente.

tación y mutaciones (3).

Como en todos los organismos, las mutaciones se pueden presentar en forma natural e inevitable, aunque su frecuencia es muy baja, por lo cual se recurre a diversos agentes (químicos, físicos) que permiten acelerar la evolución de los organismos vivos y aislar factores que se reconocen como útiles y deseables.

En los microorganismos, la aplicación práctica de los mutágenos ocurre en su mayor parte en el campo de la microbiología industrial y farmacéutica, para un mejor entendimiento de los procesos celulares fundamentales. Estos procedimientos se han aplicado para el estudio de la relación huésped:parásito (15).

Los agentes mutagénicos más empleados son las radiaciones con rayos X, con luz UV, y algunos productos químicos (5).

Dado el bajo poder de penetración de la luz UV, ésta es muy útil cuando se tratan objetos pequeños como esporas o granos de polen (7).

En Fusarium, se obtuvieron variantes, las cuales diferían de sus padres en cuanto a caracteres morfológicos y en algunos casos en patogenicidad (16). Dillon y Halnan (4) encontraron que el crecimiento del micelio es inhibido por la luz UV en Fusarium, al contrario de otros autores que observan estímulo, manifestado con mayor producción de esporas, formación de pigmentos e inducción de esporulación en razas que antes no lo hacían.

Keltt y Boone (8) utilizaron mostaza nitrogenada, methil bis amina, y luz UV para inducir mutaciones en Venturia inaequalis, y obtuvieron gran cantidad de mutantes morfológicas, de colora-

ción y bioquímicas.

Markert (11) hace referencia al efecto de la luz UV en conidias de Glomerella; con un aumento en la dosis se llega a un estado en que todas las esporas sobrevivientes no muestran mutación, o sea que, la tasa mutacional aumenta en forma lineal hasta que llega el óptimo de la dosis, luego disminuye y se estabiliza en las dosis más altas. Este resultado concuerda con los obtenidos por otros, que afirman que el rendimiento de mutaciones es linealmente proporcional en dosis bajas, pero a dosis altas la proporción de esporas que mutan es nula (2, 7).

Griffiths y Carr (5) obtuvieron una mutante de P. coronata avenae, mediante el uso de luz UV, que se manifestó como más virulenta que la original. En Melampsora lini, se han observado mutaciones para mayor virulencia con el empleo de luz UV y rayos X (6). Kline (9), expuso esporas de 16 biotipos de Rhynchosporium secalis a la acción de la luz UV y obtuvo 80 mutantes de diferente coloración.

MATERIALES Y METODOS

Para realizar el trabajo se escogieron 3 cultivos de R. secalis, de la colección existente en el CICA, INTA, Castelar, República Argentina, designados como 55-1, 760-8 y 768-3, los cuales se multiplicaron a partir de aislamientos monospóricos.

Los tres cultivos se sembraron en recipientes de 250 ml para obtener la solución. A los 15 días de crecimiento se añadieron 100 ml de agua destilada y se agitó para lograr el desprendimiento de las esporas. De la solución obtenida se tomó 1 ml por cada tiempo de exposición a la luz UV; después del tratamiento, la solución se dispersó en cajas Petri en número de 3 por cada tiempo.

po. Se emplearon tiempos de exposición hasta 6 minutos con intervalos de 30 segundos.

Al producir las radiaciones se empleó una lámpara de tubo de cuarzo Hanovia (Alpine home model), cuyo mayor poder de emisión se encuentra en la longitud de onda de 2537 Å.

Una estimación aproximada de la efectividad de los tratamientos se realizó determinando la superficie cubierta por el hongo, 5 días después del tratamiento. Durante los dos primeros días las cajas se mantuvieron en la oscuridad para evitar la foto-reactivación.

La selección de las variantes se hizo a partir de los 5 días y el criterio básico, fue el color de la colonia y en algunos casos la forma de las colonias.

RESULTADOS Y DISCUSION

En el Cuadro 1, se presenta un resumen de todas las variantes seleccionadas, de acuerdo al criterio expuesto. Con el transcurso de los días y después de realizadas varias transferencias, en muchos casos desaparecieron las diferencias observadas con respecto a la raza original.

De una comparación de las variantes, se puede observar la gran cantidad de cultivos que se descartaron. Es muy posible que se dejaran de lado variantes que, si bien no cambiaron en su aspecto morfológico, lo pudieron hacer en otro aspecto por ejemplo, bioquímico o patogénico.

De un análisis del Cuadro 1, se puede deducir que los tratamientos de luz UV que mayores cambios inducen en Rhynchosporium, están entre los 150 y 270 segundos, por lo cual es muy posible que en este intervalo se encuentre

la dosis que produce mayores cambios, en la patogenicidad o en otras características fisiológicas.

En el Cuadro 2, se presenta una estimación del efecto letal de la luz UV en los diferentes tratamientos. Se puede observar que en las primeras dosis ese efecto es bastante pequeño, hasta los 150 segundos, luego aumenta en forma rápida hasta los 270 y de allí en adelante va disminuyendo. Hay que destacar que en tiempos superiores a 300 segundos, las variantes obtenidas no fueron estables.

Dos caracteres morfológicos, importantes en el hongo estudiado, fueron la longitud de las esporas y la coloración de las colonias. En el Cuadro 3, se puede ver, que hay una disminución en cuanto al tamaño, respecto a la original, excepto de la variante 14 del cultivo 768 3. Respecto a la coloración el cultivo que mayor variación mostró fue el 55 1. En él se encontraron variantes blancas, rosadas, amarillas, castañas y negras. En los otros cultivos, la variación no fue tan grande, aun que aparecen variantes rosadas y blancas en baja proporción. En los tres cultivos y sus variantes, las diferencias son claras hasta el mes de crecimiento en el medio, ya que después las colonias empiezan a oscurecer.

Los resultados obtenidos permiten deducir que la luz UV es un agente útil en la inducción de mutaciones en R. secalis, ya que se logran modificar algunos aspectos morfológicos, resultado similar al obtenido por Kline (9), quien observó diferencias de color y en algunos casos cambios en la patogenicidad; lo mismo sucede en otros organismos como en Fusarium (16), Aspergillus (14) y Neurospora (10).

Se observa también que cuando hay aumento en la dosis, también aumenta la tasa de letalidad y la tasa mutacional. Esta última disminuye en dosis superiores al óptimo, lo cual también es descrito por Lindegren y Lindegren (10). En este aspecto se diferencia de lo que sucede con las radiaciones ionizantes, en las cuales a un aumento en la dosis, corresponde un aumento progresivo en la tasa mutacional. La disminución en la tasa mutacional, es un efecto observado por Markert (11), en un trabajo realizado con Glomerella y también por otros autores en otros organismos (7). Markert (11) atribuye este efecto a la presencia de esporas resistentes en dosis altas. En el presente trabajo, se ha observado algo de este efecto, en las dosis superiores a 300 segundos, en las cuales no se observaron variantes.

La variación en la coloración, en el tamaño de las esporas, en la tasa de crecimiento, son efectos observados en el presente trabajo (Cuadros 2 y 3) y

también se han encontrado en otros organismos (16).

La luz UV se puede decir que, en general, es útil en la inducción de mutaciones cuando se tratan organismos pequeños, tales como esporas o granos de polen (15), y son frecuentes los casos en los cuales se logra, mediante su empleo inducir cambios en diversos aspectos, lo cual también se ha observado en el presente trabajo.

CONCLUSIONES

La luz UV es un agente mutagénico útil en la inducción de mutaciones en R. secalis. Los mejores tratamientos están entre los 150 y 270 segundos.

Como criterio de selección, pueden considerarse los aspectos morfológicos (coloración, tamaño de esporas, tasa de crecimiento) y los aspectos bioquímicos.

LITERATURA CITADA

1. BRIDGMON, G.H. Production of new races of P. graminis var. tritici by vegetative fusion. Phytopathology 49: 386-388. 1959.
2. CATCHESIDE, D.G. Genetic effects of radiation. Advances in Genetics 2: 271-358. 1948.
3. DAY, P.R. Mutation to virulence in Cladosporium fulvum. Nature 179: 1141-1142. 1957.
4. DILLON, W.A. y HALNAN, E.T. The fungicidal action of U.V. radiation. Phytopathology 20: 959-965. 1930.
5. FINCHAM, J.R. y DAY, P.R. Fungal genetics. Botanical Monographs. V. 4/299. F.A. Davis Co. Philadelphia.
6. FLOR, H.H. Mutations in flax rust induced by ultraviolet radiation. Science 124:888-889. 1956.
7. HOLLAENDER, A., et al. Quantitative irradiations experiments with Neurospora crassa. II. U.V. irradiation. American Journal of Botany 32: 226-235. 1945.

Cuadro 1. Número de variantes seleccionadas por sus diferencias morfológicas en cada tiempo de tratamiento

Tratamiento (segundos)	Clultivos					
	55-1		768-3		760-8	
	Inicial	Def.	Inicial	Def.	Inicial	Def.
30	4	2	5	2	4	2
60	6	2	5	4	5	3
90	7	2	5	2	4	3
120	4	2	4	3	5	2
150	7	3	5	2	5	2
180	11	4	9	3	10	3
210	13	4	11	2	14	4
240	14	5	12	2	11	4
270	10	3	6	3	8	4
300	5	2	8	2	5	3
330	1	0	2	0	2	0
360	1	0	1	0	1	0
Total	83	30	73	25	74	30

Cuadro 2. Area (%) de la caja petri cubierta por el hongo para cada tiempo de exposición, pasados 5 días del tratamiento. (promedio de 3 cajas/tratamiento y cultivo)*

Tratamiento (segundos)	Cultivos			Promedio
	55-1	760-8	768-3	
30	99,0	99,0	99,0	99,0
60	98,0	97,0	97,0	97,3
90	92,0	93,0	93,0	92,7
120	87,0	90,0	89,0	88,7
150	80,0	80,0	80,0	80,0
180	68,0	70,0	69,0	69,0
210	54,0	53,0	55,0	54,0
240	39,0	41,0	37,0	39,0
270	27,0	30,0	28,0	28,3
300	15,0	14,0	12,0	13,0
330	8,0	6,0	6,0	6,7
360	4,0	5,0	5,0	4,3

* Las comparaciones se hicieron considerando el área cubierta por el cultivo sin tratamiento como 100%.

Cuadro 3. Longitud promedio de las esporas en micrones y coloración de las colonias de tres cultivos de *R. secalis* y sus variantes

Variantes	Cultivos						
	55-1		760-8		768-3		
	Longitud	Colorac.	Longitud	Colorac.	Longitud	Colorac.	
Original	17,35	Negra	16,95	Negra	17,35	Negra	
2	16,18	Rosada	16,21	Castaña	14,63	Café	
3	13,85	Amaril.	15,62	Castaña	15,45	Negra	
4	14,50	Rosada	14,20	Negra	14,39	Negra	
5	14,53	Negra	15,60	Café	13,35	Gris osc.	
6	13,23	Rosada	16,07	Gris osc.	14,68	Castaña	
7	12,35	Rosada	15,26	Café	15,58	Rosada	
8	14,22	Amaril.	15,93	Castaña	14,72	Negra	
9	12,05	Amaril.	15,07	Negra	13,93	Rojiza	
10	12,15	Blanca	15,30	Gris	15,15	Blanca	
11	13,73	Rojiza	14,83	Gris osc.	15,96	Negra	
12	13,49	Amaril.	13,98	Castaña	15,33	Rosada	
13	12,88	Rosada	15,35	Negra	14,46	Negra	
14	12,79	Café	14,68	Negra	18,27	Castaña	
15	13,66	Negra	13,62	Negra	15,60	Rojiza	
16	13,06	Negra	13,82	Negra	14,81	Negra	
17	14,03	Negra	14,63	Negra	15,75	Negra	
18	11,96	Amaril.	16,65	Gris osc.	14,64	Negra	
19	12,79	Café	15,13	Castaña	16,30	Castaña	
20	12,14	Café	16,82	Castaña	oscura	16,30	Blanca
21	13,06	Rosada	15,68	Café	15,88	Negra	
22	12,92	Rosada	16,39	Negra	15,38	Rosada	
23	14,14	Amaril.	16,34	Café	12,97	Café	
24	15,18	Rojiza	16,17	Café	16,48	Castaña	
25	14,85	Blanca	16,65	Gris osc.	14,04	Negra	
26			15,73	Rosada			
27	13,45	Rosada	14,11	Café osc.			
28	13,82	Blanca	14,72	Negra	13,98	Negra	
29	14,09	Rosada	15,08	Negra			
30	14,63	Negra	14,33	Negra			
31	12,84	Rosada	14,33	Negra			
32	14,46	Negra					