Rev. Fitotec. Mex. 15: 61-69. 1992

ESTUDIO CROMOSOMICO DE 13 COLECCIONES DE LENTEJA (*Lens esculenta* Moench)

Armando García Velázquez[1], Alejandro Cortés Velázquez[2] y Tarsicio Corona Torres[3]

RESUMEN

Este estudio tuvo como objetivo conocer posibles cambios cromosómicos en la lenteja en 13 variedades provenientes de Asia y formas cultivadas en México. Para ello se utilizaron células de ápices radicales coloreados con el método estándar de Feulgen. Los cromosomas meióticos se estudiaron en anteras fijadas en Farmer y coloreadas con aceto-carmín. La fertilidad masculina fue estimada con base en el porcentaje de polen teñido con glicerol-aceto-carmín. En las 13 variedades se observó un número cromosómico diploide, $2\underline{n} = 2X = 14$. La longitud total del genomio varió entre colecciones, de 52.14 a 90.78 μm, en la de Irán 32 y de la India 90, respectivamente. También se observó variación entre cromosomas del mismo cariotipo, pues el cromosoma uno mostró una longitud promedio de 5.08 μm y el cromosoma siete de 4.17 μm. El cariotipo de lenteja es bimodal: los cuatro cromosomas de mayor longitud son metacéntricos y los tres cromosomas restantes, submetacéntricos. El cromosoma cuatro presenta una constricción secundaria. Excepcionalmente, el brazo largo del cromosoma tres de la variedad Criolla de Comanja presentó la constricción secundaria y fue la única diferencia entre los trece cariotipos. La meiosis I, en las 13 variedades estudiadas fue normal, presentando 7 bivalentes, y una segregación de siete cromosomas a cada polo en anafase I. La fertilidad masculina fue de 90% en 12 variedades y de 48% en la Criolla de Comanja.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES

Cariotipo, fertilidad del polen, genomio.

SUMMARY

A comparative study was performed on karyotypes of 13 cultivated varieties of lentils (*Lens esculenta* Moench) from Asia and cultivated in México. Root tips were fixed and stained by the Feulgen standard method. Meiotic studies on chromosomes were done in anthers in fixed Farmer and stained in aceto-carmine. Pollen fertility was estimated by pollen stainability in glycerol-acetic-carmine. In all varieties diploid chromosome number was $2\underline{n} = 2X = 14$. The total length per genome ranged, among collections, from 52.14 to 90.70 μm, in Iran 32 and India 90, respectively. The lentil karyotype is a bimodal one: the four largest chromosomes are metacentrics; the remaining three chromosomes, submetacentrics. Chromosome four presents a secondary constriction on the long arm. Exceptionally, the long arm of chromosome three in the variety Criollo de Comanja shows a secundary constriction, which was the only difference among the 13 karyotypes. Meiosis I, in all 13 varieties, was found normal, with 7_{II} and a segregation 7:7 at AI. The male fertility estimated by pollen stainability was about 90% in 12 varieties, and 48% in var. Criolla de Comanja.

ADDITIONAL INDEX WORDS

Karyotype, pollen fertility, genome.

INTRODUCCION

La lenteja *(Lens esculenta* Moench) es un cultivo importante en la zona del Mediterráneo, incluyendo España y el Oriente Medio.

[1] Profesor Investigador Titular del Centro de Genética, Colegio de Postgraduados, C.P. 56230 Chapingo, México.

[2] Citólogo. Laboratorio de Citogenética, CIMMYT. Batán, Méx.

[3] Investigador del Centro de Genética, Colegio de Postgraduados, C.P. 56230 Chapingo, México.

Los españoles la introdujeron a México, esto es, tiene aproximadamente 400 años de cultivarse en diversas regiones del país.

El estudio de las diferencias cromosómicas es importante porque puede dar mayor información acerca de las relaciones filogenéticas y los mecanismos de evolución cromosómica. Esta información contribuye al entendimiento de los mecanismos citológicos que operan en la naturaleza y también pueden utilizarse en la clasificación taxonómica de las especies de importancia económica. En el caso de la lenteja, por ejemplo, que está considerada entre los granos antiguos más apreciados por su alto contenido de proteína (25%), el conocimiento citogenético puede ser de gran utilidad para su manipulación genética, al efectuar cruzamientos entre materiales de diferentes orígenes con posibilidades de formar progenies fértiles, en los que se transfieren caracteres favorables de unas formas a otras.

Zohary (1976) considera que el género *Lens* está constituido por cinco especies, cuatro de las cuales son silvestres: *Lens orientalis*, *L. ervoides*, *L. demencis*, y *L. nigricans*. La especie cultivada es *L. culinaris* Medek o *L. esculenta* Moench. Las mayores afinidades de la lenteja cultivada se presenta con *L. orientalis*; ambas, en forma diploide tienen $2\underline{n} = 2X = 14$. Este número cromosómico ha sido confirmado por diversos autores (Battacharjee, 1951, 1952; Sharma y Mukhopadhayay, 1963; Naithani y Sarbhoy, 1973). Sindhu *et al.* (1983) observaron este mismo número diploide en *Lens ervoides*.

Sinha y Acharia (1972) efectuaron un estudio cariotípico en 15 variedades de *Lens culinaris* y encontraron que seis variedades exhibían cromosomas metacéntricos y submetacéntricos y en las nueve variedades restantes había un tercer tipo: un par de cromosomas homólogos con satélite.

En lo que se refiere a la constricción secundaria, aparentemente fluctúa más el número de cromosomas que la presentan. En *Lens esculenta*, Battacharjee (1951) y Naithani y Sarbhoy (1973) observaron esta constricción próxima al centrómero en dos pares (cromosomas 2 y 3); sin embargo, Ladizinsky (1979) solamente la observó en un par. En esta especie, los estudios cromosómicos proveen una base firme para el desarrollo de los métodos de mejoramiento, particularmente donde ha sido introducida (América) y donde hay menor variación en el germoplasma, que en su lugar de origen (Cercano Oriente). Las diferencias en morfología cromosómica, entre diferentes materiales, ocasionarían progenies con cariotipos heterocigóticos. Ello probablemente daría lugar a una semiesterilidad por irregularidades en el comportamiento cromosómico durante la meiosis de tales formas. Cruzamientos entre materiales con cariotipos semejantes, posiblemente mostrarán menos irregularidades durante la meiosis, y por ello una mayor fertilidad. Igualmente un comportamiento cromosómico regular: apareamiento entre homólogos en profase I, permitiría una mejor recombinación génica, que se expresará en los híbridos.

Como resultado de los diferentes procesos a que han sido sometidos todos los organismos en general, las características cromosómicas pueden variar de especie a especie y aún dentro de un rango taxonómico menor y más aún cuando los organismos se desarrollan en distintos ambientes. Por lo anterior, el presente estudio tiene por objeto conocer el cariotipo de algunas variedades cultivadas en México y compararlo con cariotipos de

formas o variedades actuales del Cercano Oriente, que es uno de los centros de origen de la especie.

MATERIALES Y METODOS

Para este estudio se utilizó 13 colecciones de lenteja de la especie *Lens esculenta*, procedentes del Cercano Oriente y otras cultivadas en México. En el Cuadro 1 se enlista el material utilizado y su origen e identificación.

Cuadro 1. Información general de las 13 colecciones de lenteja (*Lens esculenta* L.) estudiadas.

Núm. de referencia	Colección o variedad de semilla[1]
1	México, variedad Jerécuaro
2	México, variedad Guanajuato
3	México, Criolla de Comanja
4	México 167
5	México 161
6	México 149
7	India 792
8	India 90
9	Grecia 20
10	Siria 72
11	Irán 32
12	Sudán 6
13	Sudán 13

[1] El material fue proporcionado por el M.C. Luis Manuel Serrano Covarrubias, del Centro de Genética del Colegio de Postgraduados.

Para obtener células en metafase mitótica para los estudios cariotípicos se remojaron 20 semillas de cada una de las colecciones por 24 horas en agua de la llave. Posteriormente fueron sembradas en cajas petri, tratadas con Captán (1 g/L de agua), y colocadas en una cámara germinadora a 29°C. Cuando las raíces alcanzaron una longitud de 6 a 10 mm los ápices fueron removidos y pretratados en solución acuosa saturada de paradiclorobenceno, a temperatura de 5 a 6°C por 2 a 3 horas a partir de las 9 am. Luego de este pretratamiento, los ápices radicales fueron fijados en Farmer 3:1 (v/v de alcohol etílico absoluto: ácido acético glacial) por 48 horas y después transferidos a alcohol 70% y almacenados bajo refrigeración. La tinción se hizo con el reactivo de Feulgen por 30 min después de hidrolizar 11 min en HCl 1N a 60°C. A fin de ablandar más los tejidos los ápices fueron tratados con citasa durante 30 min (García, 1990). Se maceró en ácido acético al 45% y se dibujaron los cromosomas de 10 células por planta en cámara clara a 2000 X; se tomó fotografías con película Kodalith en un microscopio FOMI III (Carl Zeiss).

La clasificación de los cromosomas por la posición del centrómero se hizo según Levan *et al.* (1964).

Las mismas plántulas de las que se tomaron los ápices radicales fueron crecidas en invernadero, hasta la floración, para el estudio de la meiosis. Para observar el comportamiento cromosómico en meiosis I, se fijó en Farmer los botones florales antes de antesis; la tinción se hizo con carmín propiónico al 1%. La estimación de la fertilidad del polen se hizo coloreándolo según la técnica descrita por Mark (1954); los granos llenos y coloreados se estimaron como fértiles; los granos deformes y sin colorear, como estériles.

RESULTADOS

El número cromosómico somático diploide observado en las trece colecciones y variedades de lenteja fue $2\underline{n} = 2X = 14$ (Figura la y lb). Con base en la posición del centrómero, según la clasificación de Levan *et al.* (1964), el cariotipo de lenteja es bimodal: los cuatro cromosomas de mayor

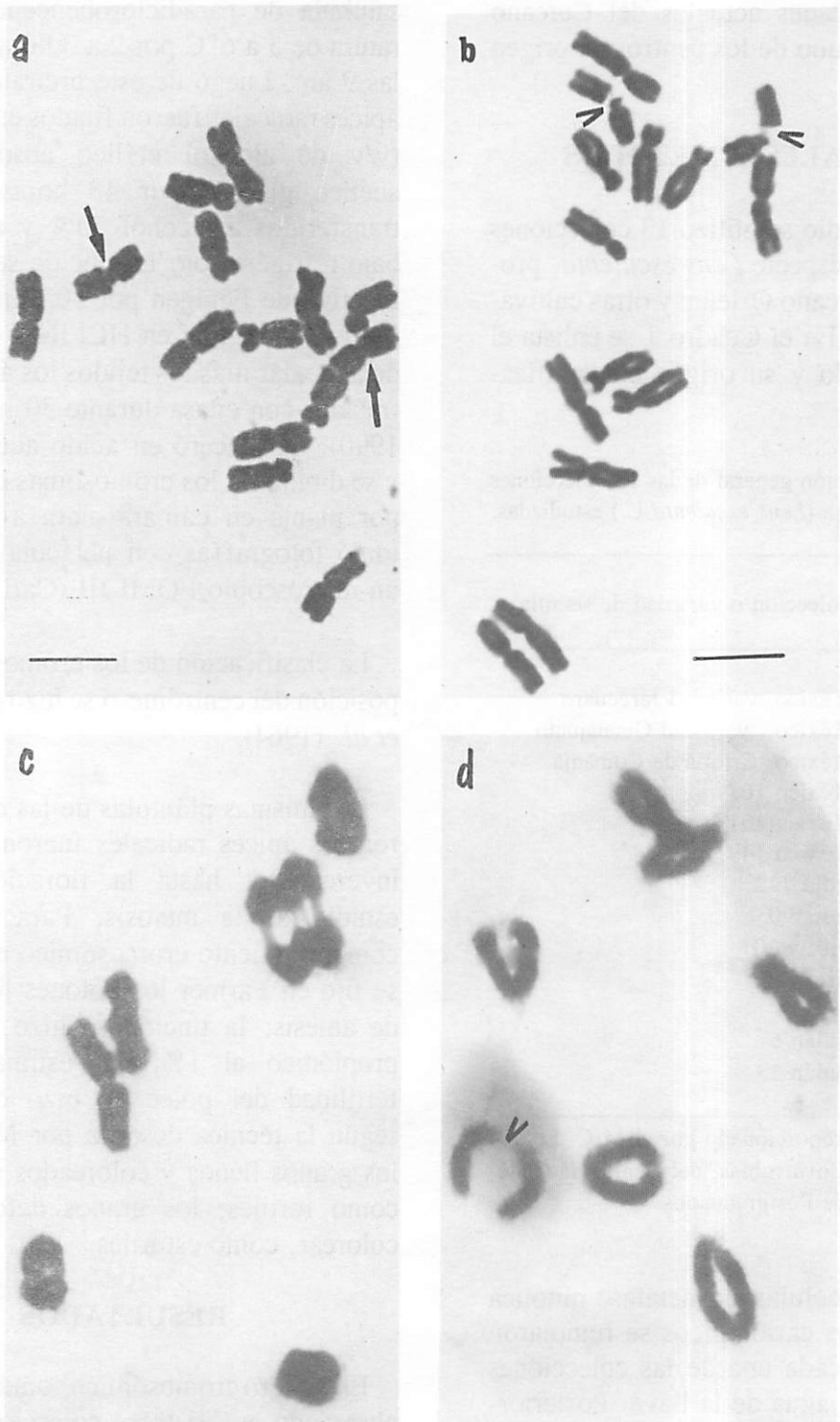

Figura 1. Cromosomas de lenteja, *Lens esculenta* 2n = 14. a) Cromosomas metafásicos en célula somática mostrando constricción secundaria (flechas). b) Célula somática mostrando cromosomas con constricción secundaria (flechas). c) Metafase I, 7_{II}. d) 7_{II} en diacinesis, par organizar nucleolar (flecha). Barra = 5 μm.

tamaño (Nos. 1, 2, 3 y 4) son metacéntricos, con tamaños de 5.89, 5.58, 5.32 y 5.14 μm, respectivamente; esto es, presentan dimensiones semejantes y es difícil distinguir uno de otro cromosoma (Figura 2). El cromosoma cuatro presenta una constricción secundaria en el brazo largo, lo cual permite su clara identificación. Excepcionalmente, esta constricción se presentó en el brazo largo del cromosoma tres de la variedad Criolla de Comanja (Cuadro 2). El segundo grupo de cromosomas son submetacéntricos y consiste de tres pares de cromosomas de menor tamaño (Nos. 5, 6 y 7; Figura 2; Cuadro 2), con longitudes de 4.78, 4.40 y 4.12 μm, respectivamente. Entre estos tres pares de cromosomas existen diferencias claras en la longitud del brazo largo, que permite distinguir uno de otro cromosoma. Correspondiendo a estas dimensiones, se tiene el tamaño relativo que es el reflejo de las diferencias entre el cromosoma 1 (16.71%) y el cromosoma 7 (11.77%). Al analizar las dimensiones del brazo largo y corto, la relación de brazos y el tamaño relativo, no existieron diferencias significativas entre los cariotipos promedio de las trece colecciones y variedades.

Cuadro 2. Características del cariotipo mitótico promedio ($\underline{n} = X = 7$) de 12 colecciones de lenteja (*Lens esculenta*), renglones superiores, y Criolla de Comanja, renglones inferiores. En ambos casos se observaron 10 células/colección.

Cromosoma número	Longitud cromosómica (μm)	Longitud del brazo Largo (μm)	Longitud del brazo Corto (μm)	Relación de brazos	Tamaño relativo (%)	Posición del centrómetro[1]
1	5.89	3.41	2.48	1.37	16.71	m
	6.58	3.81	2.77	1.37	16.91	m
2	5.58	3.19	2.39	1.33	15.83	m
	6.24	3.49	2.75	1.26	16.03	m
3	5.32	3.14	2.18	1.44	15.10	m
	5.97	3.35[2]	2.62	1.27	15.34	m
4	5.14	2.85[2]	2.29	1.24	14.58	m
	5.73	3.21	2.52	1.27	14.72	m
5	4.78	3.15	1.53	2.20	13.56	sm
	5.07	3.52	1.55	2.27	13.03	sm
6	4.40	3.09	1.31	2.35	12.48	sm
	4.74	3.33	1.41	2.36	12.18	sm
7	4.12	2.86	1.26	2.26	11.69	sm
	4.58	3.26	1.32	2.46	11.77	sm

[1] De acuerdo a Levan *et al.* (1964): m = metacéntrico, sm = submetacéntrico.

[2] Presenta constricción secundaria.

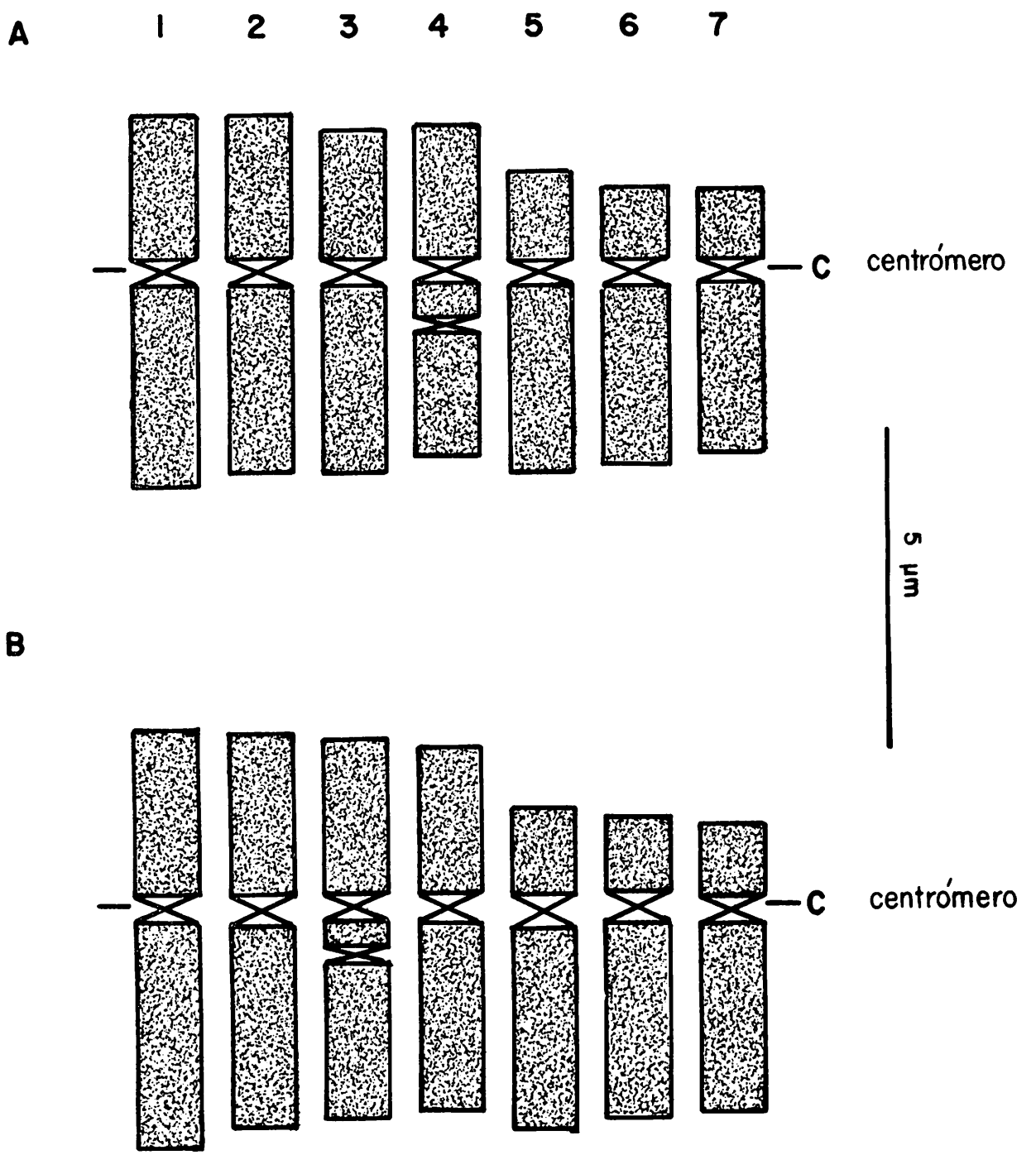

Figura 2. Idiograma de 13 colecciones de lenteja (*Lens esculenta*).
A. Idiograma promedio de 12 colecciones.
B. Idiograma de la colección Criollo de Comanja.

Las 13 colecciones presentaron mayores diferencias en la longitud total del genomio (Cuadro 3). Así, se pueden establecer tres grupos: el primero, con valores de 26-29 μm de longitud que incluye a cuatro colecciones: 5, 6, 11 y 13. El segundo grupo, con 33.78, 33.96 y 35.60 μm incluye a las colecciones, 1, 2 y 10, El tercer grupo, de mayor longitud de genomio, con valores de 38.05 a 45.39 μm que incluye a seis colecciones: 3, 4, 7, 8, 9 y 12. Se tiene entonces que en este carácter se presenta una mayor variación. Esto es, la espirilización del cromosoma presenta variación amplia en respuesta a un mismo pretratamiento de manera que los cromosomas se observan de mayor tamaño en las colecciones con mayor longitud de genomio.

Cuadro 3. Longitud total del genomio de cada una de las 13 colecciones de lenteja. Promedio de 10 células.

Colección	Longitud total del genomio (μm)
1. Variedad Jerécuaro	33.96
2. Variedad Guanajuato	33.78
3. Criolla de Comanja	38.91
4. México 167	38.76
5. México 161	26.45
6. México 149	27.31
7. India 792	38.05
8. India 90	45.39
9. Grecia 20	41.46
10. Siria 72	35.60
11. Irán 32	26.07
12. Sudán 6	40.79
13. Sudán 13	28.91

Observación de meiosis

Se observó durante diacinesis y metafase I, la presencia de 7 bivalentes (Figura lc y 1 d) lo cual confirma la naturaleza diploide de la lenteja. Estos siete bivalentes presentaron dos quiasmas/bivalente; ocasionalmente, se observaron tres quiasmas y persistencia hasta AI, de manera que algunas veces se formaron puentes, pero no se presentaron segmentos acéntricos. Ello sugiere que estos puentes sólo fueron originados por los quiasmas persistentes y no por la presencia de alguna aberración cromosómica (inversión).

La fertilidad del grano de polen, estimada mediante la tinción con carmín-glicerina, varió entre 99% (var. Guanajuato) y 90% (Sudán 6) con un promedio de 92% en 12 de las 13 colecciones estudiadas. En el caso de la variedad Criolla de Comanja, la fertilidad fue 48%. Aun cuando no se cuantificó la producción de semilla por planta, se pudo apreciar que en general las vainas produjeron de 1 a 2 semillas, incluyendo a la Criolla de Comanja, aunque sus semillas fueron de mayor tamaño que las de las otras variedades.

DISCUSION

En el presente estudio se confirmó que el número cromosómico haploide y diploide para lenteja es de 7 y 14, respectivamente. Esto indica que la lenteja, en el proceso de la evolución de silvestre a cultivado, no ha variado su número cromosómico ni han ocurrido factores que provoquen un aumento o disminución en ese número (poliploidía, aneuploidía, etc.), y que la cantidad de material genético contenido en los cromosomas es el necesario para mantenerse en la naturaleza y seguir su evolución.

Respecto a las diferencias observadas en la morfología de los cromosomas, se encontró que el número de cromosomas metacéntricos en las 13 colecciones es de cuatro pares para cada una y el resto de los cromosomas en dichas colecciones son submetacéntricos, lo cual difiere de lo encontrado por Sinha y Acharia (1972) quienes encontraron dos pares de cromosomas metacéntricos.

En 12 colecciones ocurrió una constricción secundaria cerca al centrómero en el cromosoma 4. En la colección Criolla de Comanja, de las cultivadas en México, la constricción secundaria se observó en el cromosoma 3; ésta es una diferencia marcada con respecto a los demás y podría especularse que se debe a la ganancia de pequeños segmentos de cromosomas en el intercambio cromosómico que puede ser ocasionado por alteraciones en el medio ambiente; esta colección es la única que difiere notablemente en este aspecto de las cultivadas en el Cercano Oriente.

El comportamiento de los cromosomas durante la meiosis fue normal; sólo se observaron puentes de cromatina entre cromosomas homólogos en anafase I, debido a quiasmas persistentes. En cuanto a los cromosomas rezagados (que se encontraron con poca frecuencia) éstos se deben quizás a la no formación del huso acromático, lo cual ocasiona que no haya un equilibrio al momento de segregar los cromosomas hacia los polos.

El comportamiento normal de los cromosomas repercute en la formación del grano de polen, y por lo tanto, en su fertilidad, ya que en 12 colecciones fue superior al 90%. Sin embargo, en la colección Criolla de Comanja (donde se observó la constricción secundaria en el cromosoma 3) se encontró una fertilidad de 48%, por lo que se infiere que la posición de la constricción secundaria en el cromosoma 3 no es una ventaja, aunque la baja fertilidad también pudo deberse a otros factores, como los ambientales. Esto permite suponer que durante el tiempo que se lleva cultivando la lenteja en México han ocurrido cambios en la morfología de sus cromosomas, aunque no en su número.

CONCLUSIONES

1. El número cromosómico observado en las trece variedades de lenteja resultó ser diploide, $2n = 2X = 14$. El cariotipo es bimodal con los cuatro cromosomas de mayor tamaño, metacéntricos; los tres cromosomas de menor tamaño, submetacéntricos.

2. Un marcador citológico para distinguir entre cariotipos de lenteja es la constricción secundaria observada en el brazo largo del cromosoma tres o en el cromosoma cuatro.

BIBLIOGRAFIA

Battacharjee, S. K. 1951. Karyotype analysis of *Lens esculenta* var. *microsperma*. Sci. and Cult. 16:426-427.

_____. **1952.** Cytogenetics of *Lens esculenta*. Caryologia 5:156-266.

García V., A. 1990. Técnicas y Procedimientos de Citogenética Vegetal. 3a. Ed. Colegio de Postgraduados. 144 p.

Ladizinsky, G. 1979. The origin of lentil and its wild gene pool. Euphytica 28:179-187.

Levan, A., K. Fredga, and A. A. Sandberg. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. Hereditas 52:201-220.

Mark, G. E. 1954. An aceto-carmine glycerol jelly for use in pollen fertility counts. Stain Tech. 29:277.

Nainthani, S. P. and R. K. Sarbhoy. 1973. Cytological studies in *Lens esculenta* Moench. Cytologia 28:195-203.

Sharma, S. S. N. and S. S. Mukhopadhayay. 1963. Karyotipic constancy in different strains of *Lens esculenta* Moench as worked out through recent techniques. Indian Agric. 7:103-111.

Sindhu, S. S., A. F. Slinkard, and G. J. Scoles. 1983. Karyotypic analysis of *Lens ervoides* Crop Sci. 23: 534-536.

Sinha, S. S. N. and S. S. Acharia. 1972. Karyotype analysis in some varieties of *Lens culinaris* Cytologia 37: 673-683.

Zohary, D. 1976. Lentil *Lens culinaris* (leguminosae-papilonatae). **In:** Evolution of Crop Plants. Simmonds, N. W. (ed.). pp. 163-164.