

APPLICATION OF DIFFERENT METHODOLOGIES IN LENTIL (*Lens culinaris* MEDIK) BREEDING



APLICACIÓN DE DIFERENTES METODOLOGÍAS EN EL MEJORAMIENTO DE LENTEJA (*Lens culinaris* MEDIK)

Bermejo C.J.¹, Maglia F.¹, Palacios T.¹, Espósito M.A.^{1,2}, Cazzola F.¹, Guindón M.F.¹, Gatti I.³, Cointry E.L.¹

ABSTRACT

Lentil (*Lens culinaris* Medik.) is a self-pollinating diploid ($2n=2x=14$) species belonging to the Fabaceae family. It is one of the oldest crops known, with 8,000 to 9,000 years of history and it is among the earliest domesticates from the Near East Fertile Crescent. The seeds have high nutritional value. This crop is an interesting substitute to wheat in cereal rotations but its importance is low due to a lack of suitable varieties with local adaptation. Some of the major problems that Argentinian lentil breeders face are the narrow genetic base of the current cultivated germplasm and its low yield potential. A lentil breeding program was initiated in 2004 to develop new varieties with adaptation to prevalent conditions in growing areas of Argentina. Germplasm was obtained from ICARDA (International Center for Agricultural Research in the Dry Areas) and local producers. Conventional breeding methods using hybridization and selection are being carried out to develop improved varieties, broaden the genetic base, and isolate superior recombinant inbred lines. Two new varieties have been obtained, one of the macrosperm type (Boyerito FCA) and the other of the microsperm type (Tacuarita FCA) through the application of mass selection in F_2 populations from the cross of selected materials. This program complements traditional breeding methods with biotechnological techniques such as transgenesis, use of molecular markers, *in vitro* embryo culture combined with the SSD method to shorten the breeding time, and digital phenotyping.

Key words: Lentil, conventional methodologies, *in vitro* embryo culture, biotechnology techniques, digital phenotyping.

RESUMEN

La lenteja (*Lens culinaris* Medik.) es una especie diploide autógena ($2n=2x=14$) perteneciente a la familia Fabaceae. Es uno de los cultivos más antiguos que se conocen, con 8.000 a 9.000 años de historia, y se encuentra entre los primeros domesticados en Medio Oriente. Las semillas tienen un alto valor nutricional. Este cultivo es un interesante sustituto del trigo en las rotaciones de cereales, pero su importancia es baja debido a la falta de buenas variedades con adaptación local. Uno de los principales problemas que enfrentan los mejoradores en nuestro país es la estrecha base genética del germoplasma cultivado y su bajo potencial de rendimiento. En 2004 se inició un programa de mejoramiento de lentejas para desarrollar nuevas variedades con adaptación a las condiciones predominantes en las áreas de cultivo de Argentina. El germoplasma se obtuvo del ICARDA (Centro Internacional de Investigación Agrícola en las Zonas Áridas) y de productores locales. Se utilizan métodos convencionales de mejoramiento basados en la hibridación y selección. Se han obtenido dos nuevas variedades, una del tipo macrosperma (Boyerito FCA) y la otra del tipo microsperma (Tacuarita FCA) mediante la aplicación de selección masal en poblaciones F_2 provenientes de la hibridación de materiales seleccionados. Este programa complementa los métodos de mejora tradicional con técnicas biotecnológicas como la transgénesis, el uso de marcadores moleculares, el cultivo de embriones *in vitro* combinado con el método SSD para acortar el ciclo generacional, y el fenotipado digital.

Palabras clave: Lenteja, metodologías convencionales, cultivo de embriones *in vitro*, técnicas biotecnológicas, fenotipado digital.

¹ Instituto de Investigaciones en Ciencias Agrarias de Rosario, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (IICAR-CONICET), Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario (UNR), Zavalla, Argentina;

² Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, EEA INTA Oliveros, Ruta Nacional 11 km 353, Oliveros, Santa Fe.

³ CIUNR, Consejo de Investigadores de la Universidad Nacional de Rosario, Rosario, Argentina;

Corresponding author:
Cointry, E. L.
ecointry@unr.edu.ar

 ORCID 0000-0001-5906-7291

Cite this article as:

Bermejo C.J., Maglia F., Palacios T., Espósito M.A., Cazzola F., Guindón M.F., Gatti I., Cointry E.L. 2021. APLICACIÓN DE DIFERENTES METODOLOGÍAS EN EL MEJORAMIENTO DE LENTEJA (*Lens culinaris* Medik). BAG. Journal of Basic and Applied Genetics Vol XXXII Issue 2: 33-40.

Received: 10/21/2020

Accepted: 11/04/2020

General Editor: Elsa Camadro

DOI: 10.35407/bag.2021.32.02.04

ISSN online version: 1852-6322

Available online at
www.sag.org.ar/jbag

ORIGEN Y CLASIFICACIÓN

La lenteja es un cultivo muy importante desde el comienzo de la revolución de la agricultura en el Viejo Mundo y uno de los primeros en ser domesticados junto al trigo, la cebada, la arveja y el lino (Zohary, 1976). Se lo considera como uno de los cultivos más antiguos con unos 8000 a 9000 años de antigüedad (McVicar *et al.*, 2005). Los restos más antiguos se han encontrado en las cuevas de Franchthi, Grecia, datados en 11000 AC (Helbaek, 1963). En Tell Mureybit (Siria) fueron hallados restos de semilla pequeña (2-3mm), datados entre 8500-7500 AC (Van Zeist y Bottema, 1971; Zohary, 1972; Hansen y Renfrew, 1978) y en el norte de Israel se descubrió un gran almacenaje de lentejas, estableciéndose como fecha probable el 6800 AC.

El género *Lens* es un miembro de la tribu *Vicieae* la cual incluye, además de la lenteja, a la mayoría de las legumbres de la civilización Mediterránea tales como haba y arveja. El límite genético preciso entre *Lens* y los demás géneros incluidos en *Viciaea* (*Vicia*; *Lathyrus*; *Pisum* y *Vavilovia*) han sido muy debatidos, pero *Lens* se relaciona de manera más estrecha con el género *Vicia* (Kupicha, 1981). En base a caracteres morfológicos, incluyendo el polen y pistilo, caracteres bioquímicos y cruzamientos intra e interespecíficos, se determinó que el género *Lens* está constituido por siete taxones con seis especies (Ferguson *et al.*, 1998; Ferguson, 2000; Fratini *et al.*, 2011).

El taxón cultivado, *Lens culinaris* Medik. subsp. *culinaris* y la subespecie *orientalis* pertenecen al *pool* génico primario, mientras que *L. odemensis* y *L. tomentosus* fueron asignados al *pool* génico secundario, aunque, el éxito en los cruzamientos con la especie cultivada pueden requerir rescate de embriones. *L. lamottei*, *L. nigricans* y *L. ervoides* pertenecen al *pool* génico terciario, pero podrían formar parte del *pool* génico secundario mediante el rescate de embriones (Fratini *et al.*, 2011).

Lens culinaris subsp. *culinaris* es originaria del cercano oriente y centro de Asia. La domesticación probablemente comenzó con la selección de plantas de especies silvestres que retenían sus semillas en las vainas antes de cosecharlas y luego se continuó seleccionando para tamaño de semilla grande. La lenteja, al ser una especie autógama, podría haber ayudado mayormente a mantener identificadas las líneas en el proceso de domesticación (Sandhu y Singh, 2007).

Barulina (1930) agrupó a la lenteja cultivada en 2 subespecies en base a un conjunto de caracteres cualitativos y cuantitativos relacionados:

-subsp. *macroserma* (Baumg.) Barul., la cual se caracteriza por vainas grandes, generalmente planas, con semillas planas de gran tamaño (>4,5 mm de diámetro) (Fratini y Pérez de la Vega, 2011). Los cotiledones normalmente son de color amarillo y se presenta una escasa o ausencia de pigmentación en

flores o estructuras vegetativas (Muehlbauer *et al.*, 2002). Los sépalos son largos, los folíolos son grandes y ovales. La altura de planta oscila entre los 25 y 75 cm y son generalmente encontradas en la zona Mediterránea, África y Asia menor.



Figura 1. Lenteja tipo *Macroserma*.

-subsp. *microserma* (Baumg.) Barul. caracterizada por vainas pequeñas a mediana las cuales son convexas.



Figura 1. Lenteja tipo *Microserma*.

Las semillas son subglobosas pequeñas (<4,5 mm de diámetro) (Fratini y Pérez de la Vega, 2011). Las flores son pequeñas, de colores que pueden variar del blanco al violeta o azul con patrones diversos. Los cotiledones pueden ser naranjas, rojos o amarillos (Muehlbauer *et al.*, 2002). La altura de planta varía entre 15 a 35 cm y se caracterizan por ser más pigmentadas y con folíolos más pequeños. Son encontradas generalmente en el subcontinente Indio y en el Cercano oriente (Muehlbauer *et al.*, 2002). Además, se ha demostrado que estos dos grupos difieren en la pubescencia de hojas, tallos y vainas, en los días a floración y madurez (Sharma, 2011)

y en la resistencia a ciertos patógenos (Fratini y Pérez de la Vega, 2011).

CALIDAD DE SEMILLA

Desde el punto de vista nutricional posee un alto valor proteico (20-30%), alto contenido de carbohidratos (43-70%) y es una fuente rica en fibra dietética, antioxidantes, vitaminas y minerales esenciales en la dieta (Kumar *et al.*, 2018) aunque afectada su composición por factores genéticos y ambientales (Erskine y Sarker, 2004). Wang *et al.* (2008) mostraron variabilidad entre genotipos para el contenido de proteínas (24,3% a 30,2%), mientras que Palacios *et al.* (2020) mostraron valores fluctuantes entre 22 y 34,5%. Presentan un contenido de almidón variable de 35 a 63%, ceniza y fibra dietética soluble (Urbano *et al.*, 2007). Otro factor de la calidad del grano es la presencia de taninos que al oxidarse causa el oscurecimiento de la semilla (Matus *et al.*, 1993) y es un efecto comercial detrimental. Para el procesamiento de semilla (remojo, cocción y descascarado), Ninou *et al.* (2019), mostraron la presencia de variabilidad genética. La calidad de cocción, asociada con la facilidad, tiempo de cocción y costo de preparación de alimentos, es un determinante para el uso de la lenteja como alimento (Joshi *et al.*, 2017).

PRODUCCIÓN MUNDIAL Y NACIONAL

La producción mundial se ubicó en el 2017 en las 7.6 millones de toneladas, con 6.5 millones de hectáreas dedicadas al cultivo. El principal productor mundial es Canadá, seguido por India y en menor escala por EE.UU. y Turquía. En el mercado internacional se colocan anualmente 3 Mt, siendo el principal exportador Canadá seguido por los Estados Unidos y Australia. En la importación destacan India, con un cuarto de la demanda mundial, Turquía y Bangladésh (Ruralnet, 2020).

En Argentina, la principal región productora se ubica al sur de Santa Fe (Departamentos de Caseros, Constitución, Rosario y San Lorenzo) y al norte de Buenos Aires (Partidos de Pergamino, Rojas y Salto). Aquí el cultivo se hace en forma extensiva, de secano y durante el invierno, y luego de la cosecha, se realiza la siembra de soja de segunda. Una segunda zona de producción, aunque de menor envergadura, es la constituida por las provincias del noroeste, principalmente Jujuy y Salta. En estas provincias el cultivo se hace bajo riego y es de superior calidad, debido a una mayor sanidad. Según estimaciones de la Secretaría de Agroindustria, el consumo de lentejas explica el 50% del consumo de legumbres en nuestro país. Se estima que en la campaña 2018/19 se produjeron 18.000 toneladas. Entre los destinos principales de las exportaciones destacan España, Uruguay y Brasil, quienes representan tres

cuartas partes de las exportaciones del país (Ruralnet, 2020).

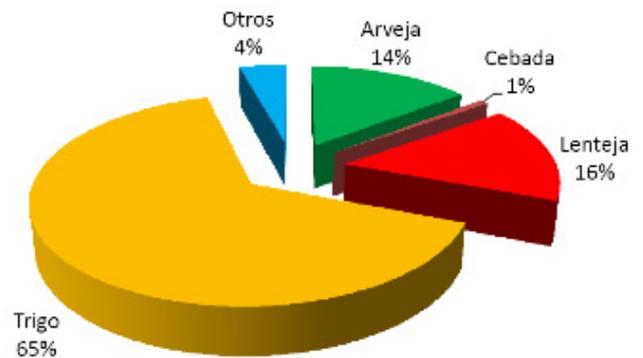


Figura 3. Porcentajes de área de los diferentes cultivos invernales en el sudeste de Santa Fe y nordeste de Buenos Aires, año 2017.

La lenteja presenta un panorama alentador en cuanto a su producción, debido principalmente a sus bajos costos de cultivo y la posibilidad de reemplazar al trigo en la rotación con soja, incorporando nitrógeno al suelo a través la fijación simbiótica y favoreciendo una agricultura más sustentable.

MEJORAMIENTO GENÉTICO

El principal problema para los productores es la falta de cultivares, ya que solo se utiliza una única variedad comercial denominada Silvina originada en la EEA INTA San Pedro. Para solucionar este inconveniente, un programa de mejoramiento se lleva a cabo en la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Rosario, con el objetivo de obtener nuevos cultivares con mayor rendimiento e idoneidad para los diferentes mercados de exportación.

El primer paso de pre-breeding consistió en introducir desde el ICARDA (*International Center for Agricultural Research in the Dry Areas*) y desde el USDA (*United States Department of Agriculture*) una colección de *germoplasma*, evaluando la variabilidad disponible utilizando características de importancia agronómica. La caracterización se realizó mediante caracteres con alta heredabilidad y la evaluación por medio de caracteres de baja heredabilidad y así determinar la utilización de este germoplasma.

Bermejo *et al.* (2012 b) realizaron evaluaciones preliminares que demostraron la presencia de una elevada variabilidad fenotípica entre las variedades de lenteja para diferentes características de importancia agronómica, mostrando a la vez la presencia de materiales experimentales con un gran potencial para ser utilizados como nuevas variedades comerciales

o como progenitores en cruza para la generación de nueva variabilidad. Se comenzaron programas paralelos de mejora para la obtención de nuevas variedades tanto de tipo macrosperma como microsperma.

Para el tipo macrosperma, se efectuó la cruza entre materiales selectos (LC960090 X ILL8072), de la cual derivó una población F_2 que fue implantada en el año 2004. Esta población fue sometida a un proceso de selección masal durante seis ciclos. Posteriormente, al alcanzarse el nivel de homocigosis deseado se procedió a seleccionar plantas individuales en función de la fecha de floración y características del grano y porte de la planta para la multiplicación de semillas y su posterior evaluación en parcelas con repeticiones a campo por caracteres morfo-vegetativos y productivos por tres ciclos consecutivos. De esta última selección surgió la variedad Boyerito FCA que presenta un excelente rendimiento, ciclo precoz y buen tamaño de grano con cotiledones amarillos.



Figura 4. Semillas del cultivar Boyerito FCA. Cultivar de grano marrón claro, de tegumento liso, cotiledones amarillos, diámetro medio de semilla de 6,5 mm. Su ciclo es de 83 días a floración, con flor blanca y un buen potencial de rendimiento.

Para el tipo microsperma, se obtuvo una población F_2 proveniente de la cruza de las líneas experimentales ILL005 x ILL8008 que fue sometida al mismo proceso detallado con anterioridad para la variedad Boyerito FCA. La variedad Tacuarita FCA presenta un excelente rendimiento, ciclo precoz y es la primera en su tipo al poseer granos con cotiledones naranjas.

HERRAMIENTAS AUXILIARES DE LOS PLANES DE MEJORA

Uso de marcadores moleculares

La diferenciación entre líneas experimentales



Figura 5. Semillas del cultivar Tacuarita FCA. Cultivar de grano marrón oscuro, de tegumento moteado, cotiledones rojos. Diámetro promedio de semilla de 4,5 mm. 102 días a floración. Altura de planta de 25-30 cm. Flor blanca y excelente rendimiento, superior al tipo macrosperma.

seleccionadas generalmente se basa en rasgos morfológicos y/o productivos, pero estos rasgos pueden verse afectados por las condiciones ambientales en las que se cultiva (condiciones del suelo, deficiencia de nutrientes, estrés hídrico, temperatura extrema, infestación de plagas, operaciones de manipulación) (Tullu *et al.*, 2008; Roy *et al.*, 2013). Estos hechos hacen que los usos de caracteres ligados a la producción sean inadecuados para identificar diferentes genotipos.

Bermejo *et al.* (2014) evaluaron la variabilidad presente en un conjunto de líneas experimentales obtenidas por selección masal en nuestro programa de mejoramiento utilizando rasgos morfológicos y marcadores SRAP (*Sequence Related Amplified Polymorphism*) (Li y Quirós, 2001) y SSR (*Simple Sequence Repeat*) demostrando que el uso de marcadores moleculares en conjunto con rasgos productivos es una mejor manera de lograr una diferenciación completa entre líneas. Por otra parte, encontraron dos fragmentos exclusivos de SRAP en el grupo microsperma, lo que permite la selección temprana de este rasgo y todos los caracteres asociados con él.

Cultivo *in vitro*

Un enfoque alternativo para la mejora de este cultivo es la complementación de los métodos tradicionales de mejora con técnicas biotecnológicas. La transgénesis ha sido difícil y desafiante debido a su naturaleza recalcitrante a la regeneración *in vitro* (Gulati y Mc Hughen, 2003) por lo cual el establecimiento de un sistema de multiplicación *in vitro* eficiente y repetible es uno de los requisitos previos básicos para la transformación (Omran *et al.*, 2008).

Bermejo *et al.* (2012a) desarrollaron un eficiente

protocolo de regeneración *in vitro* de bajo costo, basado en explantes de nudos cotiledonales en posición invertida y sobre medio de cultivo con reguladores vegetales que puede ser utilizado para la transgénesis de esta especie.

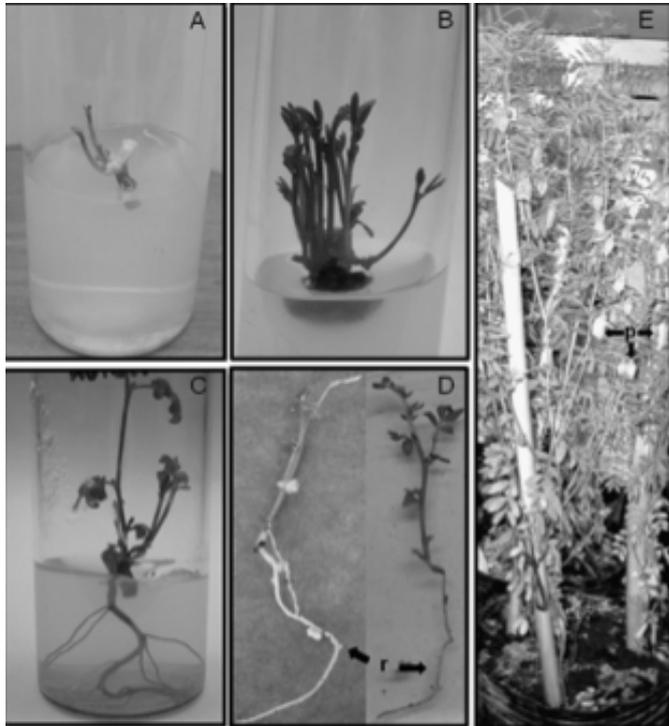


Figura 6. Regeneración de plantas de lentejas a partir de nódulos cotiledonales cultivados en orientación invertida (extremo apical en el medio). A y B) Desarrollo del brote del nudo cotiledonal después de 8 días y 20 días de cultivo, respectivamente; C) Enraizamiento *in vitro* de explantes de nudos cotiledonales después de dos meses de cultivo, (D) Enraizamiento *in vitro*-*in vivo* de los brotes cortados, con raíces (r) que sobresalen después de seis días de cultivo en medio IVS. (E) Aclimatación de plantas enraizadas que muestran fenotipo normal con vainas normales (p) después de dos meses en medio IVS.

Transgénesis

Un enfoque alternativo para la mejora de este cultivo es complementar los métodos tradicionales de mejora con técnicas biotecnológicas como la transgénesis.

Bermejo *et al.* (2019) establecieron un protocolo de transformación mediado por *Agrobacterium* sencillo, barato y con una frecuencia de transformación del 7% que es la más elevada obtenida hasta el momento. Este protocolo es compatible con un protocolo de regeneración *in vitro* optimizado a partir de nudos cotiledonales.

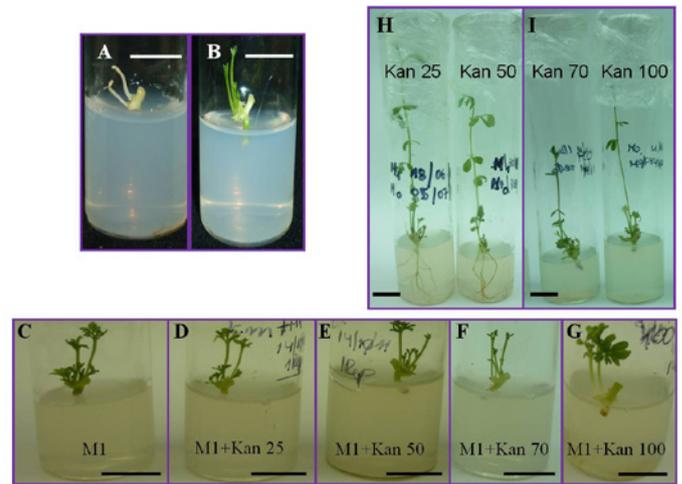


Figura 7. Efecto de la kanamicina (Kan) sobre la regeneración de tallos y raíces en los explantes de nudos cotiledonales. A) Tallos cloróticos regenerados a partir de explantes con 100 mg L⁻¹ de kanamicina a los 7 d de cultivo; B) Tallos verdes regenerados a partir de explantes cultivados en medio sin kanamicina a los 7 d de cultivo; C-G) Número de tallos regenerados por nudo cotiledonal después de 17 d de cultivo; H) Enraizamiento *in vitro* a partir de explantes cultivados en medio con 25 y 50 mg L⁻¹ de kanamicina y luego subcultivados en medio con 25 y 50 mg L⁻¹ de kanamicina respectivamente; I) Pérdida de la capacidad de enraizamiento *in vitro* de explantes cultivados en medio M1 con 70 y 100 mg L⁻¹ de kanamicina y luego subcultivados en medio sin kanamicina. (bar 1 cm).

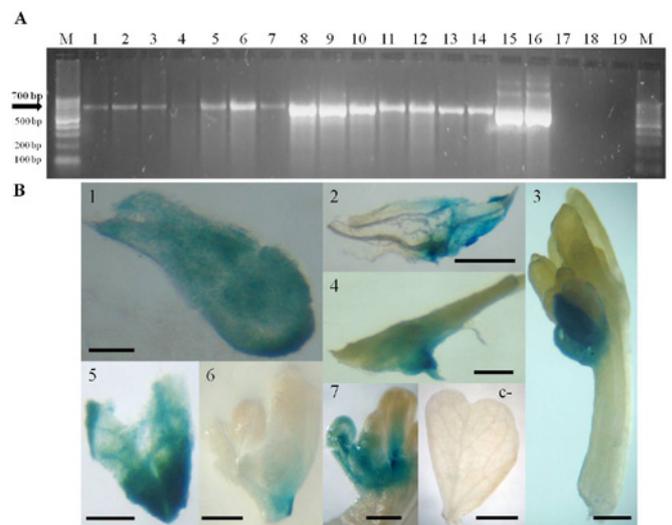


Figura 8. Análisis de plantas transgénicas putativas. A) Análisis por PCR para confirmar la presencia del gen npt-II en los tallos regenerados a partir de 14 explantes transformados a partir de nudos cotiledonales. El fragmento amplificado de 700 pb (marcado con una flecha) se detectó en los 14 transformantes (líneas 1-14). Líneas 15, 16, testigos positivos provenientes de 2 colonias distintas de la cepa GV2260 de *Agrobacterium tumefaciens* transformadas con el plásmido pBI121; líneas 17, 18, plantas no transformadas (testigos negativos); línea 19, testigo negativo de la PCR (agua); M, marcador de peso molecular 100-pb. B) Prueba histoquímica de GUS en lenteja. 1-7, Expresión de GUS en tejidos distintos de hojas de siete explantes de nudos cotiledonales potencialmente transformados demostrados por la aparición de color azul índigo. C) hoja de lenteja proveniente de una planta testigo no transformada.

Fenotipado digital

Al igual que en el cultivo de arveja el fenotipado digital demostró ser una herramienta poderosa para la caracterización de germoplasma junto con la evaluación de campo de rasgos agronómicos. Espósito *et al.* (2020) evaluaron la variabilidad genética de una colección activa mediante características agronómicas y características de semillas (tamaño y color) usando fenotipado digital, que es una metodología no destructiva, automatizada y basada en imágenes que ofrece una estimación de la morfología de la semilla y estima parámetros como color y tamaño para la selección de accesiones para uso comercial o como padres en el programa de mejora.

Aceleración de generaciones

La mejora en lentejas implica un proceso de hibridación seguido de diferentes métodos de selección, requiriéndose 10 años para obtener un nuevo cultivar ya que sólo es posible una generación de campo por año. Hace unos años, la duración del ciclo de generación se ha reducido utilizando una estrategia solo *in vitro* (Mobini *et al.*, 2014) y una estrategia solo *in vivo* (Croser *et al.*, 2014). Sin embargo, no había información para acelerar procesos de mejora en lentejas utilizando un método *in vitro* más *in vivo* combinado con un método SSD. Bermejo *et al.* (2016) desarrollaron un sistema eficiente *in vitro-in vivo* estableciendo el mejor momento para extraer embriones inmaduros y el mejor medio de cultivo para obtener un completo desarrollo de plantas tanto en lentejas de tipo macrosperma como microsperma. Todas las plantas obtenidas fueron morfológicamente normales y fértiles. Usando esta metodología se pueden obtener cuatro generaciones por año.

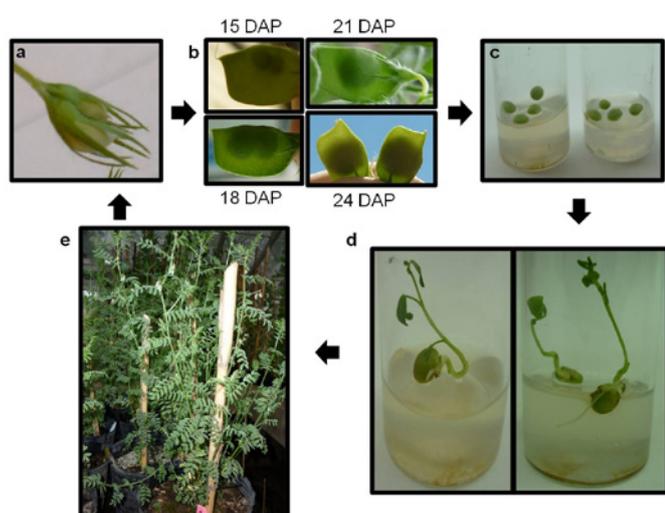


Figura 9. Sistema *in vitro-in vivo*. a) Momento de antesis y fertilización; b) Vainas cosechadas a los 15, 18, 21 y 24 días después polinización (DAP) que contiene semillas inmaduras; c) Cultivo *in vitro* de semillas inmaduras de 18 DAP (cuatro semillas inmaduras por tubo de vidrio); d) Germinación *in vitro* de semillas inmaduras produciendo brotes y raíces; e) Plantas cultivadas en invernadero hasta floración.

Speed Breeding para la multiplicación de colecciones activas en lenteja

Las semillas en las colecciones activas deben mantenerse en cantidad y calidad suficiente con el fin de estar disponibles cada vez que sean necesarias. La multiplicación en campo suele estar condicionada por las condiciones ambientales en cuanto al clima y a la presencia de plagas, por lo que es indispensable contar con un sistema de regeneración que no se vea afectado por condiciones impredecibles. Maglia *et al.* (2020) demostraron la utilidad de esta metodología de aceleración de generaciones para su implementación en los bancos de germoplasma ya que se logran 5-6 generaciones/año.



Figura 10. Plantas de lenteja en cámara de crecimiento y medio hidropónico.

ANÁLISIS QUÍMICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS DE SEMILLAS

Palacios *et al.* (2020) evaluaron la concentración y composición proteica de 7 genotipos (3 macro, 4 micro) élite del programa de mejora y su relación con el peso de semillas. Los análisis de correlación indicaron la ausencia de correlación entre contenido proteico y peso de semilla. Realizaron un SDS-PAGE cuyo patrón contuvo bandas correspondientes a vicilinas (53, 48, 43 kDa), convicilina (70 kDa), leguminas (23, 22, 20 kDa), lectina (32 kDa) y dos globulinas, ácida y básica (37 y 25 kDa, respectivamente). A partir de este estudio se identificaron líneas *microspermas* superiores en contenido proteico al testigo comercial Silvina pudiendo ser explotadas en la industria o en programas de mejora de calidad de lenteja.

BIBLIOGRAFÍA

- Barulina E. (1930) The lentils of the USSR and other countries. *Bull. Appl. Bot. Plant Breed.* 40: 1-319.
- Bermejo C., Espósito A., Cravero V., COUNTRY E.L. (2012 a) *In vitro* plant regeneration from cotyledonary nodes of recombinant inbred lines of lentil. *Sci. Hortic.* 134: 13-19.
- Bermejo C., López Anido F.S., COUNTRY E.L. (2012 b) Descripción de líneas recombinantes de lenteja (RIL) mediante caracteres morfológicos. *Horticultura Argentina* 31: 74.
- Bermejo C., Gatti I., Caballero N., Cravero V., Martin E., COUNTRY E. (2014) Study of diversity in a set of lentil RILs using morphological and molecular markers. *Aust. J. Crop Sci.* 8: 689-696.
- Bermejo C., Gatti I., COUNTRY E.L. (2016) *In vitro* embryo culture to shorten the breeding cycle in lentil (*Lens culinaris* Medik). *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 127: 585-590.
- Bermejo C., Rodríguez G., Gatti I., COUNTRY E.L. (2019) An efficient *Agrobacterium*-mediated genetic transformation system in lentil (*Lens culinaris* Medik). *Agrociencia* 53(5):741-755
- Croser J., Ribalta F., Navarro M.P., Munday C., Karen N., Edwards K., Castello M. (2014) Accelerated single seed descent (aSSD)—a novel breeding technique to speed attainment of homozygosity. In: ISAT 2015 2nd International Symposium on Agricultural Technology, Thailand, pp. 1-4.
- Erskine W., Sarker A. (2004) Lentil/Breeding. In: Wrigley C., Corke H., Walker C. (Eds.) *Encyclopedia of Grain Science*, Elsevier, pp. 142-150.
- Espósito M.A., Gatti I., Bermejo C.J., COUNTRY E.L. (2020) Evaluation of a lentil collection (*Lens culinaris* Medik) using morphological traits and digital phenotyping. *Rev. FCA UNCuyo* 52(1):1-13.
- Ferguson M.E., Robertson L.D., Ford Lloyd B.V., Newbury H.J., Maxted N. (1998) Contrasting genetic variation amongst lentil landraces from different geographic origins. *Euphytica* 102: 265-273.
- Ferguson M. (2000) Lens spp: Conserved resources, priorities and future prospects. In: Knight R. (Ed.) *Linking research and marketing opportunities for pulses in the 21st century*. Kluwer Acad. Publ, The Netherlands, pp. 613-620.
- Fratini R., Ruiz M.L. (2011) Wide crossing in lentil through embryo rescue. *Methods Mol. Biol.* 710: 131-139.
- Fratini R., Pérez de la Vega M. (2011) Genetics of economic traits in lentil: seed traits and adaptation to climatic variations. *Grain Legum.* 57: 18-20.
- Gulati A., Mc Hughen A. (2003) *In vitro* regeneration and genetic transformation of lentil. In: Jaiwal P.K., Singh R.P. (Eds.) *Applied Genetics of Leguminosae Biotechnology*. Kluwer Academic Publishing, The Netherlands, pp. 133-147.
- Hansen J., Renfrew J.M. (1978) Paleolithic-Neolithic seed remains at Franchthi cave, Greece. *Nature* 71: 349-352.
- Helbeck H. (1963) Late Cypriote vegetable diet in Apliki. *Act. nstit. Athen. Reg. Sueciae. Ser. 4: VIII: 171-186.*
- Joshi M., Timilsena Y., Adhikari B. (2017) Global production, processing and utilization of lentil: A review. *JIA* 16(12):2898-2913.
- Kumar S., Choudhary A.K., Rana K.S., Sarker A., Singh M. (2018) Bio-fortification potential of global wild annual lentil core collection. *PLoS ONE* 13 (1): e0191122. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191122>.
- Kupicha F.K. (1981) *Viciaeae*. In: Polhill R.M., Raven P.H. (Eds.) *Advances in Legume Systematics*, part 1, pp. 377-381. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Li G., Quirós C. (2001) Sequence-Related Amplified Polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: Its application to mapping and gene tagging in Brassica. *Theor. Appl. Genet.* 103: 455-461.
- Maglia F., Bermejo C., Palacios T., COUNTRY E. (2020) Speed Breeding para la multiplicación de colecciones activas en lenteja (*Lens culinaris* Medik). *BAG Vol XXXI Suppl. (1): 123-145.*
- Matus A., Slinkard A.E., Vandenberg A. (1993) The potential of zero tannin lentil. p. 279-282. In: Janick J., Simon J.E. (Eds.) *New crops*. Wiley, New York.
- McVicar R., Pearse P., Brenzil C., Hartley S., Panchuk K., Mooleki P. (2005) Lentil in Saskatchewan. *Saskatchewan Agriculture and Food*. A. Vandenberg, S. Banniza, University of Saskatchewan, Saskatchewan.
- Mobini S.H., Lulsdorf M., Warkentin T.D., Vandenberg A. (2014) Plant growth regulators improve *in vitro* flowering and rapid generation advancement in lentil and faba bean. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 51 (1): 71-79. doi:10.1007/s11627-014-9647-8.
- Muehlbauer F.J., Summerfield R.J., Kaiser W.J., Clement S.L., Boerboom C.M., Welsh Maddux M.M., Short R.W. (2002) *Principles and Practice of Lentil Production*. USDA-Agricultural Research Service, Pullman, WA. <http://www.ars.usda.gov/is/np/lentils/lentils.htm> (Accessed 17 August 2015).
- Ninou E., Papathanasiou F., Vlachostergios D.N., Mylonas I., Kargiotidou A., Pankou C., Papadopoulos I., Sinapidou E., Tokatlidis I. (2019) Intense Breeding within Lentil Landraces for High-Yielding Pure Lines Sustained the Seed Quality Characteristics. *Agriculture* 9: 175-188.
- Omran V.G., Bagheri A., Moshtaghi N. (2008) Direct *in vitro* regeneration of lentil (*Lens culinaris* Medik.). *Pak. J. Biol. Sci.* 11 (18): 2237-2242.
- Palacios L.T., Guindón F., Maglia F., COUNTRY E.L., Bermejo C. (2020) Perfil proteico en diferentes genotipos *macrospermas* y *microspermas* de lenteja (*Lens culinaris* Medik). *BAG Vol XXXI Suppl. (1): 123-145.*
- Roy S., Islam M.A., Sarker A., Malek

- M.A., Rafii M.Y., Ismail M.R. (2013) Determination of genetic diversity in lentil germplasm based on quantitative traits. *Australian J. Crop Sci.* 7 (1): 14-21.
- Ruralnet (2020) <https://ruralnet.com.ar/panorama-del-mercado-nacional-e-internacional-de-legumbres/>.
- Sandhu J.S., Singh S. (2007) History and origin. In: Yadav S.S., McNeil D., Stevenson P.C. (Eds.) *Lentil: An Ancient Crop for Modern Times*. Springer, Berlin.
- Sharma B. (2011) Genes for traits of economic importance in lentil. *Grain legumes* 57: 15-17.
- Tullu A., Tar'an B., Warkentin T., Vandenberg A. (2008) Construction of an intraspecific linkage map and QTL analysis for earliness and plant height in lentil. *Crop science* 48: 2254-2264.
- Urbano G., Porres J.M., Frías J., Vidal Valverde C. (2007) Chapter 5 Nutritional value. In: *Lentil: An Ancient Crop for Modern Times*. Yadav S.S., McNeil D., Stevenson P.C. (Eds.) Springer, Berlin, pp. 47-93, Vol. 3.
- Van Zeist W., Bottema S. (1971) Plant husbandry in early neolithic Nea Nikomedeia, Greece. *Acta Bot. Neerl.* 20: 521-538.
- Wang N., Hatcher D.W., Gawalko E.J. (2008) Effect of variety and processing on nutrients and certain anti-nutrients in field peas (*Pisum sativum*) *Food Chemistry* 111 (1): 132-138.
- Zohary D. (1972) The wild progenitor and place of origin of the cultivated lentil. *Econ. Bot.* 26: 326-332.
- Zohary D. (1976) Lentil. In: Simmonds N.W. (Ed.) *Evolution of crop Plants*. Longman, London, UK, pp. 163-164.
-