



Universidad de Concepción
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas
Departamento de Botánica

Caracterización citotaxonómica de cultivares y procedencias de *Lens culinaris* Medik. (Fabaceae) de Chile y Canadá

Seminario de Título presentado para optar al Título Profesional de
Biólogo

Ricardo Andrés Pino Palma
CONCEPCIÓN-CHILE
2020

Profesor Guía: Dr. Carlos Baeza Perry
Dpto. de Botánica, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas
Universidad de Concepción

Concepción, abril de 2020

Este Seminario de Título ha sido desarrollado en el Departamento de Botánica,
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción

Prof. Guía

Dr. Carlos Baeza Perry

Prof. Evaluadores

Dr. Roberto Rodríguez Ríos



Dr. Eduardo Ruíz Ponce

Prof. Coordinador Seminario de Título

Dr. Víctor Hernández Santander

Concepción, abril de 2020

AGRADECIMIENTOS

Antes que nada, quisiera agradecer a Dios, por brindarme la oportunidad de aprender sobre el fenómeno de la vida.

Deseo agradecer al Dr. Carlos M. Baeza Perry, por otorgarme la posibilidad de conocer y reflexionar sobre la citotaxonomía.

Agradezco también a mi familia, particularmente a mi madre, por su cálido apoyo incondicional, su interés y opinión sobre la biología.

A los compañeros y compañeras que contribuyeron en este camino, y más allá de lo académico.



TABLA DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS.....	6
RESUMEN.....	8
ABSTRACT.....	9
INTRODUCCIÓN.....	10
MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
RESULTADOS.....	16
FÓRMULA CROMOSÓMICA.....	15
CARIOTIPOS.....	15
CONSTRICCIONES SECUNDARIAS.....	15
ASIMETRÍA CARIOTÍPICA.....	17
LONGITUD DE LOS CROMOSOMAS.....	18
DISCUSIÓN.....	20
DIFERENCIACIÓN ENTRE CULTIVARES Y PROCEDENCIAS CHILENAS Y CANADIENSES DE <i>LENS CULINARIS</i> MEDIK.....	20
ESTABILIDAD DE LA FÓRMULA CROMOSÓMICA ENTRE LOS CULTIVARES Y PROCEDENCIAS.....	21
DIFERENCIAS ENTRE CARIOTIPOS.....	22
VARIABILIDAD DEL NÚMERO Y TIPO DE CONSTRICCIONES SECUNDARIAS.....	23
HALLAZGOS Y COMPARACIONES DE CONSTRICCIONES SECUNDARIAS REPORTADAS.....	24
ASIMETRÍA CARIOTÍPICA INTERCROMOSOMAL DE LA PROCEDENCIA HUALQUI.....	25
DIFERENCIAS DE ASIMETRÍA INTRACROMOSOMAL ENTRE CALPÚN-INIA Y SUPER ARAUCANA-INIA.....	27
PROCEDENCIAS Y CULTIVARES CHILENOS PRESENTAN MAYOR VARIACIÓN EN EL TAMAÑO CROMOSÓMICO.....	27

CONCLUSIÓN.....29
LITERATURA CITADA.....30



INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1. Idiogramas de los cultivares y procedencias de *Lens culinaris* Medik. evaluados en este estudio. Los cromosomas están ordenados de acuerdo a su longitud y cada uno posee su desviación estándar. Los bloques negros representan las constricciones secundarias observadas en las placas metafásicas.

Figura 2. Placas metafásicas de cada cultivar y procedencia. A. Calpún-INIA, B. Super Araucana-INIA, C. Yumbel, D. Ninhue, E. Coyanco, F. Hualqui, G. Los Ángeles, H. Campo Lindo, I. Líder, J. Martini. La flecha negra indica la constricción secundaria más representativa. La flecha azul indica la única constricción secundaria subtelomérica encontrada.

Figura 3. Asimetría cariotípica de los cultivares y procedencias chilenas vs canadienses de *Lens culinaris*

Figura 4. Asimetría cariotípica de cada uno de los cultivares y procedencias de *Lens culinaris* por separado, evaluados en este estudio.

Figura 5. Asimetría cariotípica de los cultivares desarrollados por el INIA, Calpún-INIA y Super Araucana-INIA.

Figura 6. Longitud total de los cromosomas (LTC) para cada cultivar y procedencia de *Lens culinaris* evaluado en este estudio.

Tabla 1. Promedio de la longitud total de los cromosomas (LTC), asimetría cariotípica intercromosomal (CV_{CL}) y asimetría intracromosomal (M_{CA}), para cada cultivar y procedencia, se incluye además su respectiva desviación estándar.

Tabla 2. Valores p del test de Tukey para las diferencias significativas en la asimetría intracromosomal (M_{CA}) de Calpún-INIA, Super Araucana-INIA y Martini.

Tabla 3. Valores p del test de Tukey para las diferencias significativas en la asimetría intercromosomal (CV_{CL}) de Hualqui, con respecto a los demás cultivares y procedencias.

Tabla 4. Valores p del test de Dunn-Bonferroni con valor p corregido, para las diferencias significativas en la longitud total de los cromosomas (LTC) para Coyanco y Hualqui.

Tabla 5. Promedio de la longitud del brazo corto (p) y brazo largo (q) de los cromosomas homólogos de los cultivares Calpún-INIA, Super Araucana-INIA, y las procedencias Ninhue, Coyanco, y Hualqui. Se incluye su desviación estándar y el tamaño promedio de cada cromosoma (p+q).

TABLA 6. Promedio de la longitud del brazo corto (p) y brazo largo (q) de los cromosomas homólogos de las procedencias chilenas Yumbel, Los Ángeles y las canadienses Campo Lindo, Líder y Martini. Se incluye su desviación estándar y el tamaño promedio de cada cromosoma (p+q).



RESUMEN

La lenteja (*Lens culinaris* Medik.) pertenece a la familia de las leguminosas (Fabaceae), posee beneficios a nivel nutricional, sustentable y de sistema de cultivo en rotaciones. En Chile se abastece su consumo gracias a la importación de lentejas canadienses, se desconoce las implicancias que esto podría tener sobre los cultivares chilenos. Mediante estudios isoenzimáticos la lenteja chilena ha mostrado una baja distancia genética entre gran parte de su germoplasma, por otra parte, mediante técnicas moleculares se ha demostrado que el germoplasma canadiense se separa del resto de las zonas agro-ecológicas de *Lens culinaris* del mundo. El objetivo de este estudio fue caracterizar algunos cultivares y procedencias chilenas y compararlos con algunos canadienses mediante técnicas citotaxonómicas como fórmula cromosómica, índices de asimetría cromosomal, longitud total de los cromosomas (LTC) y un examen detallado y minucioso de la arquitectura de cada uno de los cromosomas de los cultivares examinados. Proponemos que las lentejas de procedencia chilena tendrán una mayor similitud entre ellas. Se encontró estabilidad en la fórmula cromosómica entre todos los cultivares y procedencias como $4m+3sm$, mayor diversidad entre las lentejas chilenas a nivel de número de constricciones secundarias como también en la longitud de los cromosomas. El nivel de asimetría intercromosomal fue mayor en la procedencia de Hualqui ($CV_{CL}= 31,25$), se observó la presencia de una constricción secundaria única en la procedencia de Yumbel y una tendencia a una mayor LTC en la procedencia de Coyanco, así como menor LTC en la de Hualqui. Aunque no se presentó una clara separación entre el material chileno y canadiense, la heterogeneidad de los cultivares chilenos insta a seguir trabajando en el estudio de su diversidad para enriquecer nuestro conocimiento y capacidad resolutoria, ante posibles desafíos que se presenten a nivel agroalimentario.

Palabras clave: Constricciones secundarias, Asimetría cariotípica, Lenteja

ABSTRACT

The lentil (*Lens culinaris* Medik.) belongs to the leguminosae family (Fabaceae), it poses benefits at a nutritional, sustainable and crop rotation system level. In Chile its consume is supplied by the import of Canadian lentils. Remains unknown the implicity of the imported lentils to the Chilean provenances. Isoenzimatic systems have been show a narrow genetic distance between Chilean germoplasm, molecular tools have group apart Canadian lentils from the mediterranean agro-ecological zones, where Chileans lentils are associated. The objective of this work is to characterize Chilean provenances and cultivars and compare them with Canadian provenances through cytotaxonomic tools as chromosome formula, chromosomal asymmetry indexes, total chromosome length (LTC) and a thorough and detailed architecture exam on every chromosome of the cultivars. We propose that Chilean lentils will have a higher similitude between them. We found that a chromosome stability between all lentils as $4m+3sm$, more diversity between Chilean lentils in terms of secondary constriction number as length of chromosomes. The interchromosomal asymmetry level was higher in Hualqui provenance ($CV_{CL}= 31,25$), there was a unique secondary constriction in Yumbel and a tendency of higher LTC in Coyanco as a lower LTC in Hualqui. Even though there was a no evident separation between Chilean and Canadian lentils, the great heterogeneity of Chilean provenances and cultivars leads to keep working in the study of its diversity to enrich the knowledge and resolutive capacity, in the face of possibly challenges that may arise at the agri-food level.

Key words: Secondary constrictions, Karyotypic asymetry, Lentils

INTRODUCCIÓN

LAS LEGUMINOSAS

La lenteja (*Lens culinaris* Medik) es una especie herbácea, anual y que se cultiva en temporadas frías. Es originaria del cercano oriente y es uno de los cultivos fundadores con los cuales se inició la agricultura en el viejo mundo (Zohary 1999). Pertenece a la familia de las leguminosas (Fabaceae), familia que comprende alrededor de 800 géneros y 20.000 especies (Lewis et al. 2005), de las cuales, algunas son consideradas malezas, mientras que otras se cultivan para la obtención de sus semillas secas, éstas últimas llevan el nombre común de leguminosas de grano (Stagnari et al. 2017) o legumbres. Las leguminosas han destacado por una serie de beneficios, tanto por incorporar la sustentabilidad en los sistemas agrícolas como para la alimentación del ser humano y los animales. Según Stagnari et al. (2017), se pueden describir tres roles fundamentales que cumplen las leguminosas: (1) A nivel de sistema alimenticio, por sus propiedades nutricionales como el gran contenido de proteínas, vitaminas, minerales y fibras, como los efectos benéficos para la salud humana (Tharanathan & Mahadevamma 2003; Al-Islam et al. 2012). (2) A nivel de sistema productivo, debido a la asociación que poseen gran parte de las leguminosas con bacterias fijadores de nitrógeno y la inclusión de este elemento a los sistemas de cultivos (Liting et al. 2019) y, (3) A nivel de sistema de cultivo, interviniendo en el ciclo de plagas (Pacajes et al. 2002; Zander et al. 2016).

PRODUCCIÓN DE LEGUMBRES

La productividad de legumbres en el mundo refleja el interés existente en estos cultivos, desde 1961 a 2018 ha habido un incremento de 51 millones de toneladas, lo que corresponde a un aumento de un 125% (FAOSTAT 2019). Al año 2018, las legumbres con mayor productividad fueron los porotos (*Phaseolus vulgaris* L.), los garbanzos (*Cicer arietinum* L.), las arvejas (*Pisum sativum* L.), los frijoles caupí o porotos verdes (*Vigna unguiculata* Aubl.) y las lentejas (*Lens culinaris*) (FAOSTAT

2019). A nivel mundial, entre 1961 y 2005, la producción de lentejas mantuvo un crecimiento sostenido, que va desde las 0,9 a 4 millones de toneladas, respectivamente. En el año 2010 se logra superar esa barrera alcanzando los 4,7 millones de toneladas, para seguir creciendo, esta vez de forma más pronunciada hasta lograr una producción de 6,3 millones de toneladas al año 2018 (FAOSTAT 2019). En cuanto al área cultivada, se observa un comportamiento similar a la producción, descrita anteriormente (FAOSTAT 2019). Al año 2018, los mayores productores de lentejas en el mundo son: Canadá (2,0 millones ton.), India (1,6 millones ton.), Estados Unidos (380 mil ton.) y Turquía (350 mil ton.) (FAOSTAT 2019).

DIVERSIDAD DE *LENS CULINARIS* MEDIK. EN EL MUNDO

El conocimiento y conservación de la diversidad nos permite obtener beneficios directos para el ser humano, ya sea por sus compuestos químicos con aplicación en la medicina (Tharanathan & Mahadevamma 2003; Al-Islam et al. 2012) como para la generación de cultivos mejorados que nos otorguen las herramientas necesarias para sobrellevar las demandas y desafíos alimentarios del futuro (Govindaraj et al. 2015). Es por ello, que ha sido estudiada la diversidad de la lenteja utilizando diversos marcadores genéticos. Los primeros estudios de diversidad realizados en la lenteja han sido utilizando marcadores morfológicos. De acuerdo al peso de 100 semillas se podían distinguir dos tipos, las microsperma (< 4,5g) y las macrosperma (>4,5g) (Barulina 1930), además, se han integrado al estudio de la diversidad de esta especie los hábitos de crecimiento y algunos aspectos morfológicos como el tamaño de la planta, semillas por planta, entre otros, como una forma de sustentar la diferencia entre las macrosperma y microsperma en genotipos de distintos países (Sharma et al. 1995). Los autores del estudio lograron encontrar que efectivamente algunos aspectos del desarrollo de la planta estaban asociados al tipo de semilla, por ejemplo, las macrosperma necesitan más días para florecer, madurar, además de poseer mayor altura y peso por cada 100 semillas en comparación con las microsperma (Sharma et al. 1995).

Estudios más actuales incluyen los marcadores moleculares en la evaluación de la diversidad de la lenteja, estos se basan en las mutaciones existentes en el material genético. Khazaei et al. (2016) realizaron una evaluación de la diversidad de la lenteja con germoplasma obtenido de distintos bancos de semillas alrededor del mundo, aprovechando el polimorfismo de un solo nucleótido como técnica molecular, o SNPs (Single nucleotide polymorphism) en sus siglas en inglés. Esta técnica se basa en detectar diferencias en un sólo nucleótido de una secuencia genética o un genoma entre los organismos que se desea estudiar. Khazaei et al. (2016) logró separar geográficamente las lentejas en tres grandes grupos, uno, reuniendo el germoplasma del Sur de Asia con el Medio Oriente, otro, compuesto por el Mediterráneo, Noreste de África y Sudamérica, y el último, que agrupa a Canadá con Rusia, que corresponden a las zonas templadas del norte del mundo.

CITOTAXONOMÍA DE *LENS CULINARIS*

Adicionalmente a las técnicas moleculares, se ha hecho uso de la citotaxonomía como herramienta para caracterizar a los organismos. Esta área de la ciencia consiste en estudiar las diferencias presentes en los cariotipos de los organismos, evaluando aspectos como: el número y morfología de los cromosomas, la simetría del cariotipo, patrones de bandeado, y posición de satélites de ADN (Guerra 2008).

Estudios citotaxonómicos en *Lens culinaris* indican la presencia de $2n=14$ cromosomas (Bhattacharjee 1953; Sinha & Acharia 1971; Balyan et al. 2002; Jha et al. 2015). Con respecto a la morfología de los cromosomas en *Lens culinaris*, se han reportado como metacéntricos, submetacéntricos, subtelocéntricos o acrocéntricos, dependiendo del estudio (Sinha & Acharia 1972; Felk & Manara 1979; Ladinsky 1993; Rehman 1994; Balyan et al. 2002; Gaffarzadeh-Namazi et al. 2007; Jha et al. 2015). Con respecto a la arquitectura de los cromosomas, se han encontrado constricciones primarias y secundarias. La primera se da producto de la condensación del centrómero, por lo que todos los cromosomas poseen una constricción de este tipo. Por otra parte, están las constricciones secundarias cuyo

origen se cree se da, la mayoría de las veces, en los brazos cortos, la presencia en determinado cromosoma, o el número de ellos, puede ayudar a caracterizar y diferenciar un taxa con respecto a otro. En *Lens culinaris* se han encontrado desde 0 a 3 constricciones de este tipo (Battacharjee 1951; Sinha & Acharia 1972; Naithani & Sorbhoy 1973; Kumar et al. 2001; Galasso et al. 2001; Balyan et al. 2002; Gaffarzadeh et al. 2007; Jha et al. 2015), la variación entre los estudios realizados podría deberse a la dificultad que conlleva identificarlos o a una característica propia de la variedad o cultivar. El tamaño de los cromosomas varía desde los 3,0 a 12,5 um, dependiendo de qué cromosoma se trate o de la variedad, mientras que la longitud total de la cromatina va desde los 28 a los 121 um (Sinha & Acharia 1972; Naithani & Sorbhoy 1973; Felkl & Manara 1979; Rehman 1994; Gaffardazeh et al. 2007; Jha et al. 2015).

***LENS CULINARIS* MEDIK. EN CHILE**

La lenteja fue introducida en Chile por los españoles en el siglo XVII (Tay et al. 1994). Actualmente, es cultivada en la región del Maule, Ñuble, Biobío y la Araucanía, siendo la Región del Biobío la de mayor producción con 532 toneladas, lo que equivale al 38% de las lentejas producidas a nivel país (ODEPA 2019). Chile pasó de ser un país exportador a importador de lentejas, la razón pudo ser debido a la incapacidad de competir frente a grandes productores, como lo es Canadá, cuyas exportaciones cubren el 97% de la demanda de lentejas importadas en Chile, con 14.726 toneladas al año 2019 (ODEPA 2019). Esta situación se ve reflejada en la producción de lentejas a lo largo de los años, por ejemplo, en el año 1979 la producción en Chile fue de 31.690 toneladas, para luego disminuir drásticamente a 1.400 toneladas para el año 2018/2019. Su rendimiento se ha mantenido relativamente estable a lo largo del tiempo, obteniendo 5.432 hg/ha (hectogramos por hectárea) y 8.100 hg/ha, para el año 1961 y 2018/2019, respectivamente (ODEPA 2019), mientras que en Canadá se observa un rendimiento de 7.143 a 13.953 hg/ha, para los años 1973 y 2018, respectivamente. Es posible que la baja producción de lentejas, se haya visto

traducida en el escaso aporte tecnológico reflejado en el rendimiento relativamente constante de este cultivo, a lo largo de los años. Si bien se han creado dos cultivares con el fin de generar lentejas de gran tamaño y resistentes a enfermedades producto de la roya (*Uromyces fabae* Pers.), como son los cultivares Calpún-INIA y Super Araucana-INIA (Tay et al. 2001; Pelañoza et al. 2007), esto no ha sido suficiente para incentivar a los agricultores a utilizar este cultivo. A pesar de los diversos beneficios que entrega esta leguminosa de grano, y de que el manejo de este por pequeños agricultores, lleva más de 400 años desde su introducción. Actualmente se desconoce si las lentejas chilenas cultivadas actualmente por los pequeños agricultores, logran diferenciarse de las lentejas canadienses, dada su influencia sobre el mercado chileno de la lenteja, y si su importación pudiera estar afectando la diversidad de este cultivo en el país. Se ha comprobado, a través de isoenzimas, que el germoplasma de lentejas chilenas tiene una reducida distancia genética entre ellas (Rodríguez et al. 1999). De un total de 45 lentejas de distintas localidades de Chile, el 87,2% se asocia estrechamente dentro de un mismo grupo fenético, al utilizar distintos sistemas enzimáticos (Rodríguez et al. 1999).

En base a lo expuesto, el objetivo de este estudio fue caracterizar algunos cultivares y procedencias chilenas de lentejas y compararlos con procedencias importadas desde Canadá, disponibles en supermercados chilenos. Para ello, se utilizaron métodos citotaxonómicos, que incluyeron fórmula cromosómica, índices de asimetría cromosomal, longitud total de los cromosomas y un examen detallado y minucioso de la arquitectura de cada uno de los cromosomas de las procedencias y cultivares examinados, con el fin de evaluar posibles diferencias. Se entenderá por cultivar a un conjunto de plantas que: a) han sido seleccionadas por un carácter particular o combinación de caracteres, b) es distintivo, uniforme y estable en estos caracteres, c) cuando se propaga de la forma apropiada, retiene esos caracteres. Esto según lo definido por el Código Internacional de Nomenclatura para las Plantas Cultivadas (Brickell et al. 2009). Creemos que las lentejas de procedencia chilena tendrán una mayor similitud entre ellas.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIAL VEGETAL

Se utilizaron 8 procedencias y dos cultivares de *Lens culinaris*, dentro de los cuales tenemos aquellos de procedencia canadiense, como Líder, Martini y Campo lindo, obtenidos de centros de venta comerciales. Por otra parte, las procedencias chilenas se obtuvieron de pequeños agricultores de distintas localidades de la Región del Biobío y Ñuble, como Hualqui, Coyanco, Yumbel, Los Ángeles y Ninhue. Por último, se analizaron los cultivares chilenos, Calpún-INIA y Super Araucana-INIA, facilitados por el Instituto Nacional de Investigación Agraria (INIA).

PREPARACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

La germinación consistió en hidratar abundantemente las semillas en placas Petri a temperatura ambiente (18-22°C) las cuales germinaron luego de 4 días. Posteriormente, se les aplicó un tratamiento antimitótico con 8-hidroxiquinoleína por 24 horas en oscuridad a 4°C. Luego se fijaron en etanol/ácido acético en proporción 3:1 y se almacenaron en la oscuridad a 4°C. Posteriormente, las radículas fueron cortadas de la semilla y lavadas con agua destilada para luego ser maceradas con HCl 0,5N a 45°C por 17 minutos. Enseguida se lavó la radícula con agua destilada y se llevó a un portaobjeto, al cual se le incorporó una gota de agua destilada para luego triturar el tejido. Posteriormente, se realizó un aplastado (squash) con orceína acética al 1% para ser observado al microscopio. Se analizaron 7 placas metafásicas para cada cultivar y procedencia, de los cuales se obtuvieron las relaciones brazo largo/brazo corto de los cromosomas según el método de Levan et al. (1964, modificado). Además, se obtuvieron los índices de asimetría del cariotipo, intercromosomal CV_{CL} e intracromosomal M_{CA} (Peruzzi & Eroglu 2013). Para realizar las mediciones a los cromosomas se utilizó el software Micromeasure (Reeves 2001).

Los análisis estadísticos se realizaron con el software Past 3.26b.

RESULTADOS

FÓRMULA CROMOSÓMICA

Los idiogramas de la Figura 1 indicaron cierta estabilidad en la fórmula cromosómica entre las lentejas. Se encontró que la mayoría ellos poseían $4m+3sm$, es decir, cuatro cromosomas metacéntricos y tres submetacéntricos, a excepción de Coyanco y Campo Lindo, que presentaron $3m+4sm$, siendo considerado el cromosoma 1 para ambas procedencias como submetacéntrico en lugar de metacéntrico (Figura 1).

CARIOTIPOS

Los idiogramas nos permitieron representar de forma clara los cariotipos de los cultivares y procedencias. Se observaron diferencias en el cariotipo entre las distintas lentejas (Figura 1). Varios de ellos presentaron un cariotipo propio, esto se da para gran parte del material chileno, como es el caso de Calpún-INIA, Super Araucana-INIA, Coyanco, Hualqui y Yumbel, siendo Martini la única procedencia canadiense que no comparte su cariotipo con los demás. Las lentejas que sí compartieron cariotipo fueron: Ninhue y Líder, por un lado, y por otro, Los Ángeles y Campo Lindo.

CONSTRICCIONES SECUNDARIAS

Las constricciones secundarias en el material chileno variaron más que entre los canadienses (Figura 2). Entre las lentejas chilenas, se logró encontrar entre 3 a 5 constricciones secundarias. Coyanco fue la procedencia donde menor número de ellas se encontró (3), a diferencia de Calpún-INIA, Super Araucana-INIA, Los Ángeles y Yumbel, donde se observaron 5. Entre las procedencias canadienses la variación fue menor, de 4 a 5 constricciones secundarias.

Considerando las constricciones secundarias en la fórmula cromosómica, y el número de ellas, logramos agrupar el material de la siguiente manera:

LENS CULINARIS CON 5 CONSTRICCIONES SECUNDARIAS

$3m(\text{sat})+m+2sm(\text{sat})+sm$, corresponde a cuatro cromosomas metacéntricos, tres de los cuales presentaron constricciones secundarias centroméricas, tres cromosomas submetacéntricos, dos de ellos con constricciones secundarias centroméricas. A este grupo corresponden: Calpún-INIA, Super Araucana-INIA, Los Ángeles y Martini.

$2m(\text{sat})+m+3sm(\text{sat})+sm$, corresponde a tres cromosomas metacéntricos, dos de los cuales presentaron constricciones secundarias centroméricas, cuatro cromosomas submetacéntricos, dos de ellos con constricciones subcentroméricas. El único que presentó esta fórmula fue Campo Lindo.

$3m(\text{sat})+m+sm(\text{sat})+2sm$, corresponde a cuatro cromosomas metacéntricos de los cuales dos presentaron constricciones secundarias centroméricas, y uno, la presencia de un satélite en el brazo largo, tres cromosomas submetacéntricos, uno de ellos con constricciones secundarias submetacéntricas. El único que presentó esta fórmula fue Yumbel.

LENS CULINARIS CON 4 CONSTRICCIONES SECUNDARIAS:

$3m(\text{sat})+m+sm(\text{sat})+2sm$, corresponde a cuatro cromosomas metacéntricos, de los cuales tres presentaron constricciones secundarias centroméricas, tres cromosomas submetacéntricos de los cuales uno presentó una constricción secundaria subcentromérica. Los que presentaron esta fórmula fueron: Hualqui, Ninhue y Líder.

CULTIVARES CON 3 CONSTRICCIONES SECUNDARIAS:

$m(\text{sat})+2m+2sm(\text{sat})+2sm$, corresponde a tres cromosomas metacéntricos, de los cuales uno presentó una constricción secundaria centromérica, cuatro cromosomas submetacéntricos, dos de ellos con constricciones secundarias subcentroméricas. El único que presentó esta fórmula fue: Coyanco.

ASIMETRÍA CARIOTÍPICA

Los cultivares y procedencias fueron evaluados en principio agrupándolos todos como *Lens culinaris* chilenos o canadienses (Figura 3). Para la asimetría intracromosomal (M_{CA}) se distribuyeron entre los valores de 24,55 a 28,76 (Tabla 1). Si bien en el gráfico no se observó claramente (Figura 3 y 4), al realizar un ANOVA y posterior test de Tukey, se identificaron diferencias significativas entre Calpún-INIA y material chileno, como Coyanco, Hualqui, Yumbel, Ninhue y Super Araucana-INIA (Tabla 2) Super Araucana-INIA, por su parte, demostró diferencias significativas con Martini y Calpún-INIA (Tabla 2), por otro lado, Martini tuvo un patrón idéntico a Calpún-INIA, diferenciándose estadísticamente con Coyanco, Hualqui, Yumbel, Ninhue y Super Araucana-INIA (Tabla 2).

Los valores de CV_{CL} , representando la asimetría intercromosomal, abarcaron un rango más amplio, que van desde 13,11 a 31,25 (Tabla 1; Figura 3), además, se observó en este parámetro algunos valores que escapan del rango en el que se encuentran la mayoría de las lentejas (13, 11 – 16,72). Para esclarecer la identidad del material, se realizó un nuevo gráfico de dispersión evaluando los ejemplares por separado (Figura 4). Se logró identificar a la procedencia Hualqui como aquél que poseía valores de CV_{CL} mayores, siendo su promedio 31,25. Esta diferencia además es sustentada por un análisis de ANOVA y posterior test de Tukey (Tabla 3), donde se logró determinar que Hualqui es el único que posee

diferencias significativas para el parámetro de CV_{CL} , con respecto al resto del material.

LONGITUD TOTAL DE LOS CROMOSOMAS

El tamaño de los cromosomas va desde los 18,34 μm , para el cromosoma 1, es el de mayor tamaño y corresponde a la procedencia de Coyanco. Por otra parte, el cromosoma más pequeño mide 8,63 μm , corresponde al cromosoma 7 de la procedencia Hualqui (Tabla 5).

En la Figura 6 se observó que Coyanco tiene mayor longitud total de los cromosomas (LTC) que el resto de los ejemplares, con un valor de 234,28 μm (Tabla 1), mientras que Hualqui tendría el menor genoma, con un LTC de 150,86 μm (Tabla 1), sin embargo, el análisis de Kruskal-Wallis y posterior test de Dunn-Bonferroni con valor p corregido, nos indicó que Coyanco sólo se diferencia significativamente de Hualqui, Ninhue y Los Ángeles (Tabla 4). Por otra parte, Hualqui se diferenciaría significativamente de Yumbel y Coyanco (Tabla 4).

DISCUSIÓN

DIFERENCIACIÓN ENTRE CULTIVARES Y PROCEDENCIAS CHILENAS Y CANADIENSES DE *LENS CULINARIS*

Khazaei et al. (2016) realizaron un estudio evaluando la diversidad en *Lens culinaris* de distintas procedencias alrededor del mundo mediante herramientas moleculares, su estudio concluyó que las lentejas se dividían en tres grandes grupos agro-ecológicos a nivel mundial, estos son: las zonas templadas del norte, las del Mediterráneo, y las del Sur de Asia. Las lentejas sudamericanas se ubican dentro del grupo de las del mediterráneo, por tanto, también Chile. En Chile, el único estudio que se ha realizado con el fin de evaluar la diversidad de lentejas, ha sido el ejecutado por Rodríguez et al. (1999). Él y sus colaboradores utilizaron isoenzimas como marcadores genéticos para evaluar la variación genética de las lentejas naturalizadas chilenas con respecto a las extranjeras, con aquellos datos confeccionó un dendrograma donde observó que el 87,2% del germoplasma chileno se reunía en un solo grupo, indicando una acotada distancia genética entre los cultivares chilenos. Considerando que el cultivo de lentejas en Chile ha disminuido drásticamente a lo largo del tiempo, mientras que las importaciones desde Canadá abarcan más del 90% de la demanda de importaciones en nuestro país, es posible que las lentejas chilenas estén perdiendo su identidad genética, la cual pudieron haber formado en los más de 400 años que llevan en Chile desde su introducción por los españoles en el Siglo XVII (Tay et al. 1994).

Considerando todos los resultados, ¿Habrán procedencias y/o cultivares que se parezcan más entre si formando grupos que sean diferentes a otros grupos. ¿De modo de tener una aproximación parecida a la de Rodríguez et al. (1999)?

ESTABILIDAD DE LA FÓRMULA CROMOSÓMICA ENTRE LOS CULTIVARES Y PROCEDENCIAS

Basado en los resultados obtenidos en la fórmula cromosómica, no encontramos diferenciación entre procedencias y cultivares chilenos y canadienses, observando que la mayoría de los cariotipos fueron $4m+3sm$ (Figura 1). Dada las diferencias que se podrían esperar con respecto a las presiones selectivas que se estén ejerciendo sobre procedencias y cultivares chilenos y canadienses, como son: las condiciones ambientales (Paruelo et al. 1995), el aislamiento geográfico, el cual pudo haberse reducido con la introducción de lentejas canadienses a Chile, la selección artificial, que probablemente se haya realizado en mayor medida en Canadá, lo que queda en evidencia al comparar los rendimientos en el cultivo de lentejas al año 2018, siendo 7.642 hg/ha para Chile y 13.953 hg/ha para Canadá (FAOSTAT 2019), es esperable encontrar diferencias genéticas entre los cultivares. Por otra parte, Gaffarzadeh-Namazi et al. (2007) encontraron estabilidad en la fórmula cromosómica $4m+3sm$ en 10 cultivares de *Lens culinaris* procedentes de Irán, idéntico a lo que se observó en este estudio, aunque también algunos cultivares de Irán se han desarrollado a partir de cultivares chilenos, como el FLIP 96-4L (Sabaghnia et al. 2008), o incluso canadienses, como el cultivar ILL 6037 (Sabaghnia et al. 2008), lo que podría reflejar la similitud en la fórmula cromosómica. En cultivares de India se ha observado también uniformidad en la fórmula cromosómica como $4m+2sm+1st$, entre cultivares de dicho país (Jha et al. 2015), sin embargo, se diferencia de lo observado en este estudio, lo cual indica que, a pesar de los resultados obtenidos en este estudio, podría ser posible encontrar diferencias a nivel del tipo de cromosoma entre cultivares de países distintos.

A pesar que a nivel de tipo de cromosoma no se observaron diferencias entre las procedencias y cultivares canadienses y chilenos, si se encuentran mayores diferencias a nivel molecular, con la evaluación del polimorfismo de una sola base nitrogenada en la secuencia de un genoma, cuya técnica se realizó en el

germoplasma de *Lens culinaris* de distintas partes del mundo (Khazaei et al 2016), concluyendo que existen tres grandes zonas agro-ecológicas de *Lens culinaris*, las zonas templadas del norte, donde se encuentra Canadá, el sur de Asia, y el mediterráneo, este último donde se encuentra el germoplasma chileno de la lenteja, que además es asociado, con una acotada distancia genética con germoplasma de Marruecos (Khazaei et al 2016).

Cabe mencionar que en dos procedencias se obtuvo una fórmula $3m+4sm$, Coyanco y Campo Lindo, la razón de esta diferencia en la fórmula se debe a que el cromosoma uno, que tiende a ser metacéntrico en la mayoría de los cultivares, pasa a ser submetacéntrico en Coyanco y Campo Lindo, por lo que podría existir alguna relación entre ambos, chileno y canadiense, respectivamente. Aunque, si bien el promedio de la relación brazo largo y brazo corto nos entrega un valor que nos permite definir este cromosoma como submetacéntrico, también es relevante mencionar que la desviación estándar del cromosoma uno en ambos cultivares nos da la posibilidad de considerarlo también como metacéntrico, por lo que no hay claridad de si ambos ejemplares efectivamente estarían diferenciándose a nivel cromosómico.

DIFERENCIAS ENTRE CARIOTIPOS

Los idiogramas nos permiten observar el cariotipo de los cultivares y procedencias, esto en base al orden en el que se ubican los cromosomas y la posición de las constricciones secundarias. Respecto al orden de los cromosomas, como se indicó en los resultados, no se lograron diferenciar los cultivares o procedencias chilenas con respecto a las canadienses, sin embargo, se encontraron similitudes en el cariotipo de procedencias como Los Ángeles con Campo Lindo, y Ninhue con Líder. Las desviaciones estándar de los cromosomas no nos permitieron asegurar que estas diferencias se deban a características propias de los cultivares. A pesar de ello, los órdenes de los cromosomas de las procedencias y cultivares mantienen patrones similares a otros estudios realizados (Jha et al 2015; Gaffarzadeh-Namazi et al 2007), es decir, los cuatro primeros

pares de cromosomas en los idiogramas, tienden a ser los de mayor tamaño, y metacéntricos, los tres restantes, son de menor tamaño, submetacéntricos.

VARIABILIDAD DEL NÚMERO Y TIPO DE CONSTRICCIONES SECUNDARIAS

En términos del número y tipos de constricciones secundarias, hubo gran variación. Del total de lentejas chilenas, sólo se diferenciaron dos con respecto a los de procedencia canadiense. Calpún-INIA, Super Araucana-INIA, Los Ángeles, Campo Lindo y Martini, todos presentaron 5 constricciones secundarias del mismo tipo, también compartieron relación Hualqui, Ninhue y Líder, con cuatro constricciones secundarias idénticas. Coyanco y Yumbel fueron los únicos cultivares que no compartieron similitudes en este aspecto con los cultivares canadienses, observándose en ellos 3 y 5 constricciones secundarias, respectivamente. Si bien Yumbel se podría considerar dentro del grupo con 5 constricciones secundarias, no presentó los mismos tipos de constricciones, observándose en él una ausencia de la constricción secundaria en el cromosoma 6 y la presencia de una constricción secundaria subtelomérica en el brazo largo del cromosoma 2, la cual no se observó en ningún otro cultivar o procedencia (Figura 1 y 2). La variación del número de constricciones secundarias es mayor entre las lentejas chilenas que entre las canadienses, logrando encontrar entre 3 a 5 en el material chileno, y 4 a 5 en los canadienses, lo que podría indicar una mayor variación genética entre las lentejas chilenos. Si bien Rodríguez et al. (1999), mediante isoenzimas, describen al germoplasma de *Lens culinaris* chilenos como un grupo de estrecha distancia genética, correspondiente a un 87,2% del germoplasma de lentejas chilenas de un total de 45, existe también dentro del mismo grupo un 12,8% de germoplasma de variadas procedencias, como Rusia, Turquía, Grecia e Inglaterra, lo que sustenta el argumento que la lenteja chilena está compuesta por una mezcla de variedades o ecotipos antiguos de grano pequeño (Tay et al. 2001). Si bien esta heterogeneidad ha sido asociada con una baja calidad del producto chileno, también podría significar un aspecto

positivo para la agronomía nacional e internacional, considerando que una mayor variación genética implica una mayor gama de soluciones en el campo del mejoramiento genético y, en consecuencia, para los desafíos agroalimentarios del futuro. Por ejemplo, Canadá y Australia, grandes productores de lentejas actualmente, utilizaron recursos genéticos de lentejas de distintas zonas del mundo para poder llevar a cabo su programa de mejoramiento genético (Khazaei et al. 2016). Por otra parte, la baja variabilidad encontrada en el número de constricciones secundarias entre las procedencias canadienses, indicaría una estrecha variabilidad genética entre los cultivares de dicho país, hecho que también ha sido reportado por Khazaei et al. (2016), sin embargo, hay que considerar que en este estudio, el material de procedencia canadiense sólo se compone de tres ejemplares, a diferencia de los diez de procedencia chilena, por lo que también es posible que la diversidad del material canadiense, observado en los resultados, esté limitado por el número de ejemplares utilizados.

HALLAZGOS Y COMPARACIONES DE CONSTRICCIONES SECUNDARIAS REPORTADAS

Previamente ya se han realizado varios estudios sobre las constricciones secundarias en *Lens culinaris*, utilizando dos metodologías distintas, estas son: el uso de agentes antimitóticos con posteriores tinciones a los cromosomas, y la hibridación fluorescente *in situ* (FISH). La primera metodología permite una observación directa de las constricciones secundarias en los cromosomas, en estudios de este tipo se han reportado desde 0 a 2 constricciones secundarias (Battacharjee 1953; Sinha & Acharia 1972; Naithani & Sarbhoy 1973; Felkl & Manara 1979; Gaffazadeh-Namazi et al. 2007; Jha et al. 2015). FISH nos permite detectar de forma indirecta la presencia de constricciones secundarias. FISH detecta la presencia y localización de ADN ribosomal en los cromosomas, el ADN ribosomal se ubica en los cromosomas en una zona a la cual se le llama región organizadora nucleolar (NOR en inglés), los NOR coinciden con la ubicación de las constricciones secundarias en los cromosomas (Kumar et al 2001). Mediante esta técnica se ha reportado hasta 3 NOR (Kumar et al. 2001; Galasso et al. 2001;

Balyan et al. 2002), lo que indicaría la existencia de hasta 3 constricciones secundarias en *Lens culinaris*.

En este estudio se lograron observar constricciones secundarias no reportadas anteriormente por medio de su observación directa, además, los hallazgos en este estudio corroboran los trabajos realizados con FISH. Tanto Balyan et al. (2002), como Galasso et al. (2001), reportan la presencia del gen ribosomal 5S en la zona subteloamérica del brazo largo de un cromosoma, considerado cromosoma 1 por Galasso et al. (2001), o cromosoma 2 por Balyan et al. (2002). Este gen ribosomal 5S forma un NOR, que coincide con la ubicación de una constricción secundaria subteloamérica en el brazo largo del cromosoma 2 de la procedencia de Yumbel. Además, ambos autores detectan la presencia de otro gen ribosomal 5S en una zona subcentromérica del cromosoma 6, lo cual coincide con las constricciones secundarias subcentroméricas encontradas en este estudio en el cromosoma 6 (Figura 1). Otras constricciones secundarias que se encontraron en este trabajo, y que no han sido reportadas anteriormente para la especie, son las presentes en el cromosoma 1, constricción de tipo centromérica, y la presente en el cromosoma submetacéntrico más grande, que corresponde al cromosoma 4 ó 5, dependiendo del material (Figura 1), con una constricción secundaria subcentromérica.

ASIMETRÍA CARIOTÍPICA INTERCROMOSOMAL DE LA PROCEDENCIA HUALQUI

La asimetría cariotípica, definida por Lewitsky (1931) como el cambio hacia un cariotipo con predominancia de cromosomas subteloalocéntricos y/o telocéntricos, a partir de un cariotipo simétrico, los cuales son aquellos que presentan cromosomas metacéntricos y/o submetacéntricos. Esta transición de simétrico a asimétrico se puede generar a partir de cambios en la longitud de los cromosomas (asimetría intercromosomal) o de la posición del centrómero (asimetría intracromosomal). Los índices de asimetría cariotípica que se utilizaron en este estudio, que describen la asimetría intercromosomal e intracromosomal, y que nos permitieron evidenciar esas diferencias, son el CV_{CL} y el M_{CA} (Peruzzi & Eroglu 2013), respectivamente. En la figura 3 realizamos un gráfico usando ambos

parámetros de asimetría cariotípica en base a la hipótesis de trabajo, la cual asume que los cultivares y procedencias chilenos se ubicarían agrupados entre sí, separados de los canadienses, sin embargo, de acuerdo a la Figura 3, no hubo una diferenciación entre ellos, no obstante, se logró apreciar algunos valores de CV_{CL} que escapaban del grupo general, por lo que se realizó la Figura 4 para observar de forma individual la distribución de los cultivares y procedencias usando los parámetros de asimetría. Logramos evidenciar que Hualqui fue la procedencia con mayor CV_{CL} , con 31,25, lo cual además fue corroborado por un análisis de ANOVA y posterior test de Tukey, indicando que existen diferencias significativas entre Hualqui y los demás cultivares y procedencias (Tabla 3), por lo que esta procedencia posee mayor nivel de asimetría cariotípica intercromosomal, y, por tanto, existiría mayor variación de tamaño entre sus cromosomas en comparación a los demás.

Durante la domesticación y la expansión geográfica, ocurren cambios evolutivos que llevan a la formación de aloploiploides, diversificación de especies, rearrreglos cromosómicos, introgresión de segmentos cromosómicos de otras especies, y/o invasión intergenómica de transposones (Huang et al. 2018). Una de las posibles explicaciones para la asimetría cariotípica intercromosomal presente en esta procedencia, puede estar basada en rearrreglos cromosómicos, posiblemente deleciones, dado que se observa además el menor LTC en esta procedencia en comparación con el resto del material. Vu et al. (2015) indican que la reparación de la ruptura del ADN doble hélice genera inserciones o deleciones, las cuales podrían determinar el tamaño del genoma, por ejemplo, como consecuencia del valor neto entre las inserciones y deleciones. En algunos cultivares de *Lens culinaris* de Irán se ha encontrado polimorfía en algunas bandas cromosómicas (Gaffarzadeh et al. 2007), lo cual también podría ser reflejo de procesos como rearrreglos cromosómicos, evidencia que también se ha encontrado en cultivares de trigo (Huang et al. 2018; Schneider et al. 2003). En estudios de otras especies, como *Alstroemeria ligtu* L., se han explicado las diferencias de asimetría cariotípica por la variación en las condiciones ambientales, como el tipo de suelo, hábitat y distribución (Baeza et al. 2015), además, la asimetría cariotípica podría

ser una base que determine diferencias fenotípicas entre los cultivares y procedencias, como se ha visto en dos subespecies de *Alstroemeria presliana* Herbert., demostrando diferencias en su asimetría cariotípica como en la intensidad del color de sus flores, color de los tépalos y de las anteras (Baeza et al. 2015). Dado los resultados obtenidos en este estudio, y en la literatura, es de gran importancia poder resguardar la procedencia de Hualqui, como también la realización de estudios fisiológicos que nos permitan develar características propias que puedan estar determinadas por su particular asimetría intercromosomal.

DIFERENCIAS DE ASIMETRÍA INTRACROMOSOMAL ENTRE CALPÚN-INIA Y SUPER ARAUCANA-INIA

Calpún-INIA y Super Araucana-INIA se diferenciaron significativamente en la asimetría intracromosomal (Tabla 2), la cual evalúa la heterogeneidad de la posición del centrómero entre los cromosomas de un cariotipo, obteniendo 28,77 y 23,62 para el parámetro M_{CA} , respectivamente, siendo Calpún-INIA más asimétrico (Pino & Baeza 2019). Ambos cultivos fueron desarrollados por el INIA a través de cruzamientos con distintos cultivares. Para el caso de Calpún-INIA, se originó a partir del cruzamiento entre los cultivares Araucana-INIA y Laird, siendo Laird el primer cultivar canadiense, liberado en 1978 (Khazaei et al. 2016), que fue utilizado en este cruzamiento para heredar sus genes de resistencia a la roya, sumado al gran rendimiento de Araucana-INIA (Peñaloza et al. 2007). Por otra parte, Super Araucana-INIA se originó por el cruzamiento de (Araucana-INIA x Tekoa) x De la Mata (Tay et al. 2001), siendo Tekoa un cultivar de origen estadounidense con resistencia a la roya (Bascur 1978). El hecho de que ambos cultivares posean cinco constricciones secundarias podría deberse a que fueron desarrollados a partir del mismo cultivar, Araucana-INIA, y que además ambos presentan genoma de cultivares de procedencia norteamericana, aunque de diferentes países, Canadá, por un lado, y Estados Unidos por otro, lo cual, podría

ser una de las razones por las que se generan diferencias entre sus asimetrías cariotípicas, particularmente para este estudio, la asimetría intracromosomal (M_{CA}).

PROCEDENCIAS Y CULTIVARES CHILENOS PRESENTAN MAYOR VARIACIÓN EN EL TAMAÑO CROMOSÓMICO

Respecto a la longitud individual y la longitud total de los cromosomas (LTC), los cultivares y procedencias chilenas muestran una tendencia a presentar mayor variabilidad entre ellos que los canadienses, variabilidad que también se observa en el número de constricciones secundarias. El rango de tamaño cromosómico de los cultivares y procedencias chilenas van desde los 8,63 a 18,34 μm (Tabla 5 y 6), correspondiendo al cromosoma 7 de Hualqui y cromosoma 1 de Coyanco, respectivamente, mientras que en material de Canadá el rango es de 10,54 a 17,73 μm (Tabla 5 y 6), para el cromosoma 7 de Martini y cromosoma 1 de Campo Lindo, respectivamente. Lo mismo se aprecia en la longitud total de los cromosomas (LTC), con un rango de 150,86 a 234,28 μm (Tabla 5 y 6) para los cultivares y procedencias chilenas, mientras que 176,11 a 190,92 μm (Tabla 5 y 6) para los canadienses. Al realizar un análisis de Kruskal Wallis y posterior test de Dunn-Bonferroni, se logró evidenciar que Coyanco es una de las procedencias con mayor LTC, por tanto, con mayor cantidad de genoma también, esto debido a que se encontraron diferencias significativas con respecto a Hualqui, Líder y Los Ángeles, que son los tres con menor LTC, por otro lado, Hualqui es uno de los con menor LTC, siendo el único que se diferencia estadísticamente de aquellos con mayor LTC, que son Yumbel y Coyanco.

En otros estudios, los cromosomas de *Lens culinaris* van desde los 3,2 a 12,5 μm , y el LTC de 28 μm a 121 μm (Sinha & Acharia 1972; Naithani & Sarbhoy 1973; Felkl & Manara 1979; Rehman & Muhammad 1994; Gaffarzadeh et al. 2007; Jha et al. 2015). Esto demuestra que los cultivares reportados en este estudio tienen mayor cantidad de genoma que los que se han reportado hasta el momento, debido a que el menor LTC obtenido fue de 150,86 en el cultivar de Hualqui.

CONCLUSIÓN

En general, no fue posible separar citotaxonómicamente los cultivares y procedencias chilenas de los canadienses en grupos separados, sin embargo, se observaron diferencias individuales entre los chilenos en distintos parámetros citotaxonómicos. Las procedencias chilenas Coyanco, Hualqui y Yumbel, pueden ser la representación de recursos genéticos propios desarrollados en sus respectivas localidades a lo largo del tiempo, y que podría ser de gran relevancia conservarlos, como también realizar estudios fisiológicos para conocer las diferencias en sus desarrollos y rendimientos. Por otra parte, los cultivares y procedencias chilenas, en términos citotaxonómicos, poseen mayor diversidad que los canadienses, por lo que podría ser de gran interés seguir desarrollando investigación sobre la diversidad de *Lens culinaris* en el país, para enriquecer nuestro conocimiento y capacidad resolutiva ante posibles desafíos que se presenten a nivel agroalimentario.

LITERATURA CITADA

Al-Islam, M., Rabah, H. & Yousef, A. 2013. Role of lentils (*Lens culinaris* L.) in human health and nutrition: a review. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism* 6: 3-16.

Barulina H.I. 1930. Lentils in the USSR and other countries. *Bulletin of Applied Botany, Genetics and Plant Breeding (Leningrad) Supplement* 40: 1-319.

Bhattacharjee, S.K. 1953. Cytogenetics of *Lens esculenta* Moench. *Caryologia* 5 (2): 159-166.

Bascur, B.G. 1978. Tekoa: nueva variedad de lenteja resistente a la roya. Informativo Agropecuario N°16. 2 p. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Estación Experimental La Platina, Santiago, Chile.

Baginsky, C. & Ramos, L. 2008. Situación de las legumbres en Chile: Una mirada agronómica. *Revista Chilena de Nutrición* 45 (1): 21-31.

Balyan, H.S., A. Houben & R. Ahne. 2002. Karyotype analysis and physical mapping of 18S-5.8S-25S and 5S ribosomal RNA loci in species of genus *Lens* Miller (Fabaceae). *Caryologia* 55 (2): 121-128.

Brickell, C.D., Alexander, C., David, J.C., Hettterscheid W.L.A., Leslie, A.C., Malecot, V., Xiaobai, J. & Cubey, J.J. 2009. *International Code of Nomenclature for Cultivated Plants* Eight Edition. International Society for Horticultural Science. Vienna. 184 pp.

FAOSTAT. 2019. Citing Electronic Resources. Datos sobre alimentación y agricultura en Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. URL: <http://www.fao.org/faostat/es/#home>. Accesado: 2019.

- Felkl, N.T. & Manara, W. 1979. Cariotipo de quatro linhages de lentilha (*Lens culinaris* Medic.). *Revista do Centro de Ciencias Rurais* 9 (4): 409-417.
- Gaffarzadeh-Namazi, L., Asghari-Zakaria, R., Babaeian, N. & Kazemi-Tabar, K. 2007. Comparative Study of Chromosome Morphology and C-banding Patterns in Several Genotypes of *Lens culinaris*. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 10 (11): 1811-1816.
- Galasso, I., Schmidt, T. & Pignone, D. 2001. Identification of *Lens culinaris* ssp. *culinaris* chromosomes by physical mapping of repetitive DNA sequences. *Chromosome Research* 9: 199-209.
- Govindaraj, M., Vetriventhan, M. & Srinivasan, M. 2015. Importance of Genetic Diversity Assessment in Crop Plants and Its Recent Advances: An Overview of Its Analytical Perspectives. *Genetics Research International* 2015: 431- 487.
- Guerra, M. 2008. Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: concepts and implications. *Cytogenetics and Genome Research* 120: 339-350.
- Huang, X., Zhu, M., Zhuang, L., Zhang, S., Wang, J., Chen, X., Wang, D., Chen, J., Bao, Y., Guo, J., Zhang, J., Feng, Y., Chu, C., Du, P., Qi, Z., Wang, H. & Chen, P. 2018. Structural chromosome rearrangements and polymorphisms identified in Chinese wheat cultivars by high-resolution multiplex oligonucleotide FISH. *Theoretical and Applied Genetics* 131: 1967-1986.
- Jha, T.B, Mahanti, A. & Ghorai, A. 2015. Karyotype analysis of Indian lentils through EMA based Giemsa staining, *Caryologia* 68 (4): 280-288
- Khazaei, H., Caro, C.T, Fedoruk, M., Diapari, M., Vandenberg, A., Coyne, C.J., McGee, R. & Bett, K.E. 2016. Genetic Diversity of Cultivated Lentil (*Lens culinaris* Medik.) and Its Relation to the World's Agro-ecological Zones. *Frontiers in Plant Science* 7: 1093.
- Kumar, S., Balyan, H.S., Ramesh, B., Singh, S. P. & Gupta, P.K. 2001. A Study of Nucleolar Organizers in Lentil Using FISH and Spore Quartet Analysis. *Cytologia* 66: 247-252.

- Naithani, S.P. & Sarbhoy, R.K. 1973. Cytological studies in *Lens esculenta* Moench. *Cytologia* 38: 195-203.
- Ladizinsky, G. & Muehlbauer, F.J. 1993. Wild Lentils, *Critical Reviews in Plant Sciences* 12 (3): 169-184.
- Levan, A., Fredga, K. & Sandberg, A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201–220.
- Lewistky, G.A. 1931. An essay on cytological analysis of the fixing action of the chromacetic formalin and the chromic formalin. *Bulletin of Applied Botany Genetics and Plant Breeding* 27: 187-240.
- Lewis, G., Schrire, B., Mackinder, B. & Lock, M. 2005. *Legumes of the World*. Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond. 592 pp.
- Liting, L., Knight, J.D., Lemke, R.L. & Farrel, R.E. 2019. A side-by-side comparison of biological nitrogen fixation and yield of four legume crops. *Plant Soil* 442: 169–182.
- ODEPA. 2019. Citing Electronic Resources. Oficina de Estudios y Políticas Agrarias. URL: <https://www.odepa.gob.cl/estadisticas-del-sector/estadisticas-productivas>. Accesado: 2019.
- Pacajes, G., Franco, J., Esprella, R. & Main, G. 2002. Efecto de Diferentes Cultivos y Prácticas Culturales Sobre la Multiplicación del Nemátodo Quiste de la Papa (*Globodera* spp.) en Bolivia. *Revista Latinoamericana de la Papa* 13: 52-65.
- Paruelo, J.M., Lauenroth, W.K., Epstein, H.E., Burke, I.C., Aguiar, M.R. & Sala, O.E. 1995. Regional climatic similarities in the temperate zones of North and South America. *Journal of Biogeography* 22: 915-925.
- Peñaloza, E., Tay, J. & France, A. 2007. Calpún-INIA, Cultivar de Lenteja (*Lens culinaris* Medik.) de Grano Grande y Resistente a Roya. *Agricultura técnica* 67 (1): 68-71.

Peruzzi, L. & Eroglu, H.E. 2013. Karyotype asymmetry: again, how to measure and what to measure?. *Comparative Cytogenetics* 7 (1): 1-9.

Pino, R. & Baeza, C. 2019. Citotaxonomía de los cultivares de *Lens culinaris* Medik. Calpún-Inia y Super Araucana-Inia. *Chloris Chilensis*, Año 22 N° 2. URL: <http://www.chlorischile.cl>.

Rehman, S.U. & Altaf, C.M. 1994. Karyotypic studies in *Lens culinaris* Medik, S.SP. Macrosperma cv. Laird x Precoz. *Pakistan Journal of Botany* 26 (2): 347-352.

Rodríguez, M., Paredes, M. & Becerra, V. 1999. Diversidad isoenzimática del germoplasma de lentejas (*Lens culinaris* Medik) naturalizado en Chile. *Agricultura Técnica (Chile)* 59 (3): 186-195.

Reeves, A. 2001. MicroMeasure: A new computer program for the collection and analysis of cytogenetic data. *Genome* 44: 239-443.

Sharma, S.K., Chahota, R.K. & Chuni, L. 1995. Genetic diversity and agronomic evaluation of microsperma and macrosperma lentils. *Genetic Resources and Crop Evolution* 42: 217-222.

Schneider, A., Linc, G. & Molár-Láng, M. 2003. Fluorescence in situ hybridization polymorphism using two repetitive DNA clones in different cultivars of wheat. *Plant Breeding* 122: 396—400.

Stagnari, F., Maggio, A., Galieni, A. & Pisante, M. 2017. Multiple benefits of legumes for agriculture sustainability: an overview. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture* 4: 2.

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

Tay, J.U., Bascur, G. & Peñaloza, E. 1994. Lentil production in Chile. *In: Muhelbauer, F.J. & W.J.E. (Eds.). Expanding the production and use of cool season food legumes. Kluwer Academic Publisher. Netherland. p. 399-411.*

Tay, J.U., France, A. & Paredes, M. 2001. Super Araucana-INIA: Una nueva variedad de lenteja (*Lens culinaris* Med.) chilena de grano grande. *Agricultura técnica* 61 (3): 385-389.

Tharanathan, R.N. & Mahadevamma, S. 2003. Grain Legumes—A Boon to Human Nutrition. *Trends in Food Science and Technology* 14: 507-518.

Vu, G.T.H., Schmutzer, T., Bull, F., Cao, H.X., Fuchs, J., Tran, T.D., Jovtchev, G., Pistrick, K., Stein, N., Blattner, F.R., Scholz, U. & Schubert, I. 2015. Comparative Analysis Reveals Divergent Genome Size Evolution in a Carnivorous Plant Genus. *The Plant Genome* 8 (3): 1-14.

Zander, P., Amjath-Babu, T.S., Preissel, S., Reckling, M., Bues, A., Schläfke, N., Kuhlman, N., Bachinger, J., Uthes, S., Stoddard, F., Murphy-Bokern, D. & Watson, C. 2016. Grain legume decline and potential recovery in European agriculture: a review. *Agronomy for Sustainable Development* 36: 26.

Zohary, D. 1998. Monophyletic vs Polyphyletic origin of the crops on which agriculture was founded in the Near East. *Genetic Resources and Crop Evolution* 46: 133–142.

Relación de los brazos

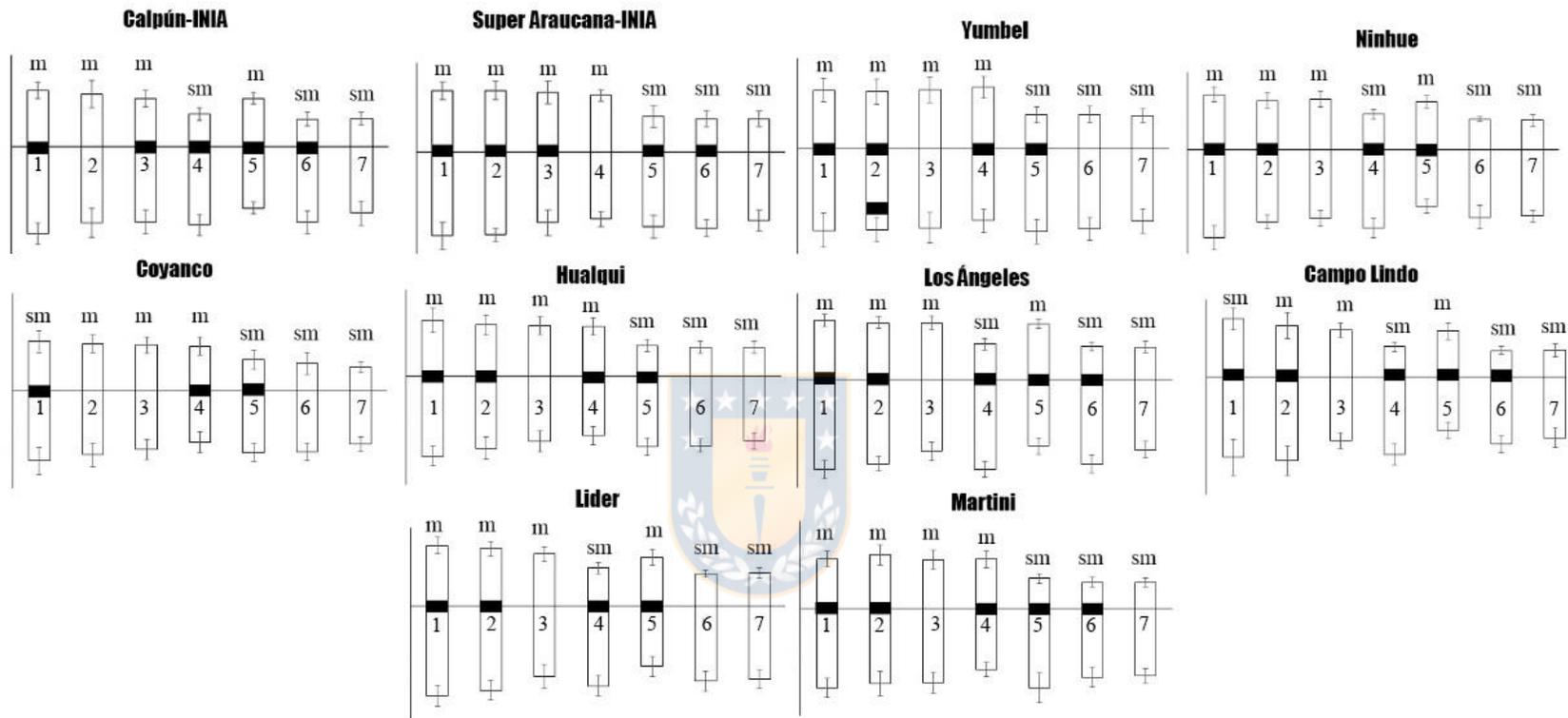


Figura 1. Idiogramas de los cultivares y procedencias de *Lens culinaris* evaluados en este estudio. Los cromosomas están ordenados de acuerdo a su longitud y cada uno posee su desviación estándar. Los bloques negros representan las constricciones secundarias observadas en las placas metafásicas.

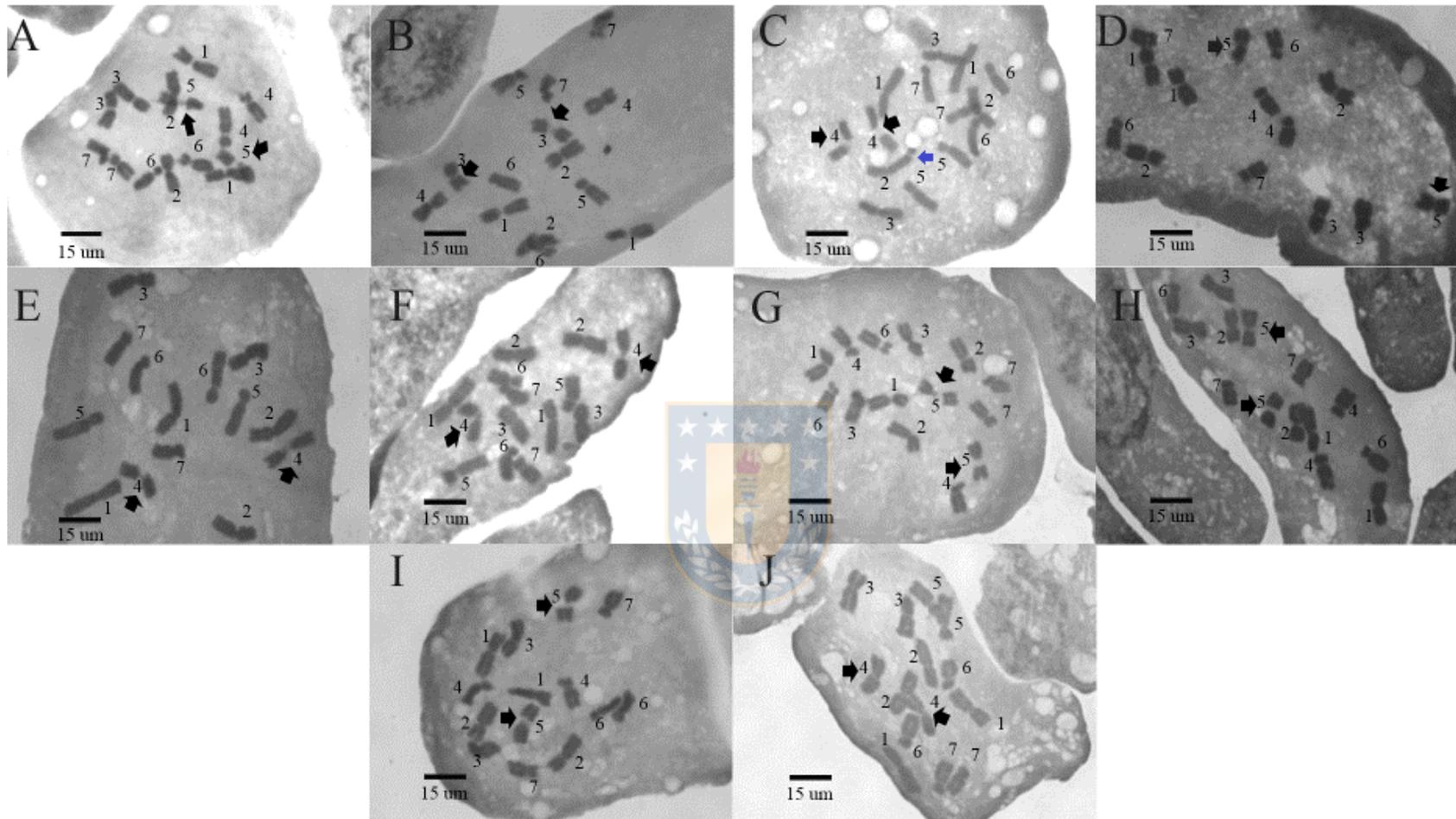


Figura 2. Placas metafásicas de cada cultivar y procedencia. A. Calpún-INIA, B. Super Araucana-INIA, C. Yumbel, D. Ninhue, E. Coyanco, F. Hualqui, G. Los Ángeles, H. Campo Lindo, I. Líder, J. Martini. La flecha negra indica la constricción secundaria más representativa. La flecha azul indica la única constricción secundaria subtelomérica..

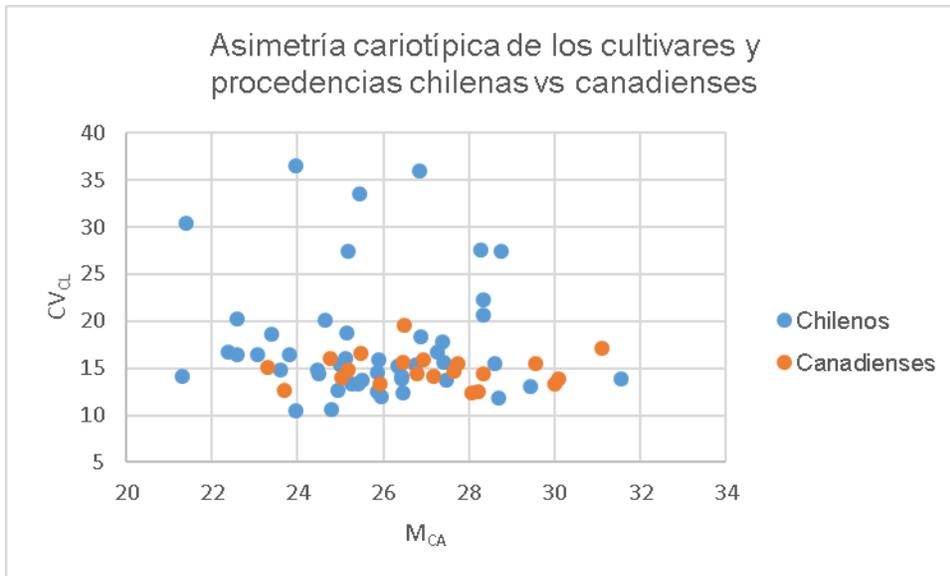


Figura 3. Asimetría cariotípica de los cultivares y procedencias chilenas vs canadienses de *Lens culinaris*.

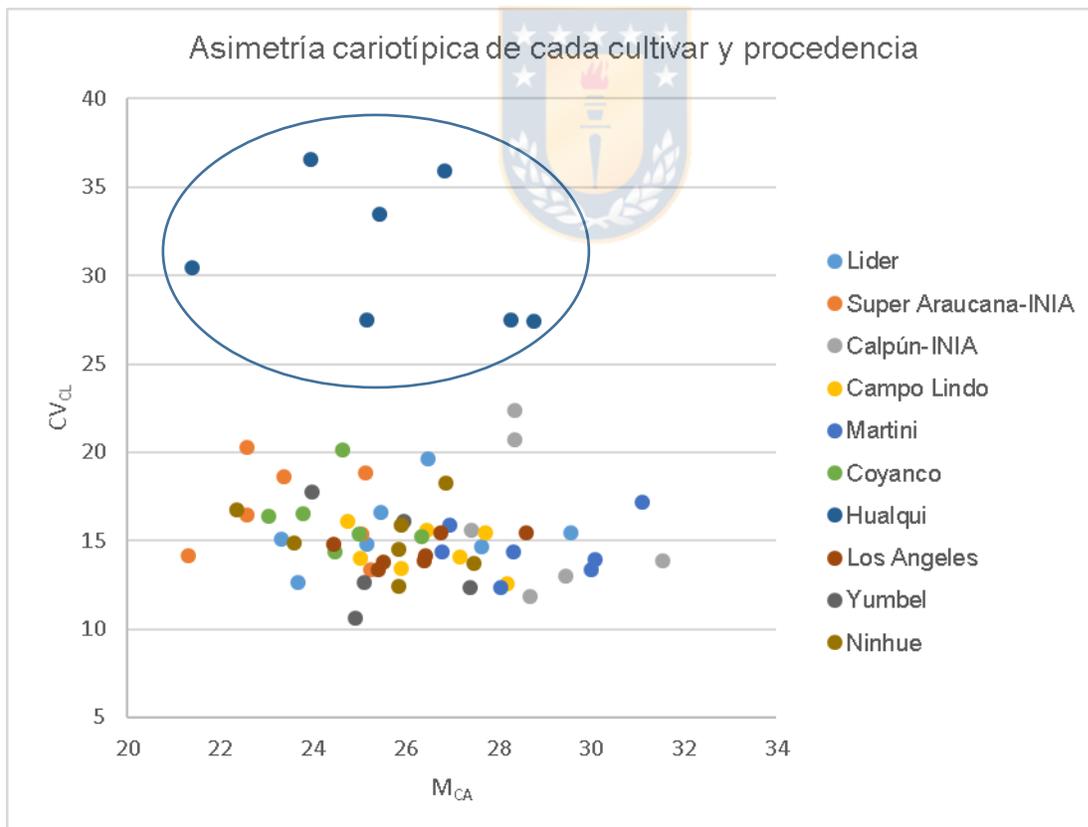


Figura 4. Asimetría cariotípica de cada uno de los cultivares y procedencias de *Lens culinaris* por separado, evaluados en este estudio.

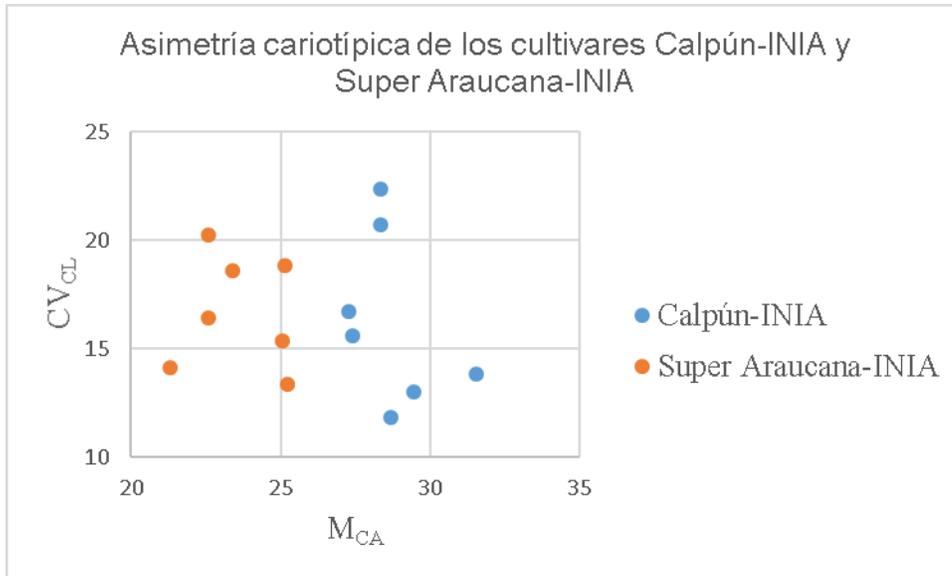


Figura 5. Asimetría cariotípica de los cultivares desarrollados por el INIA, Calpún-INIA y Super Araucana-INIA.



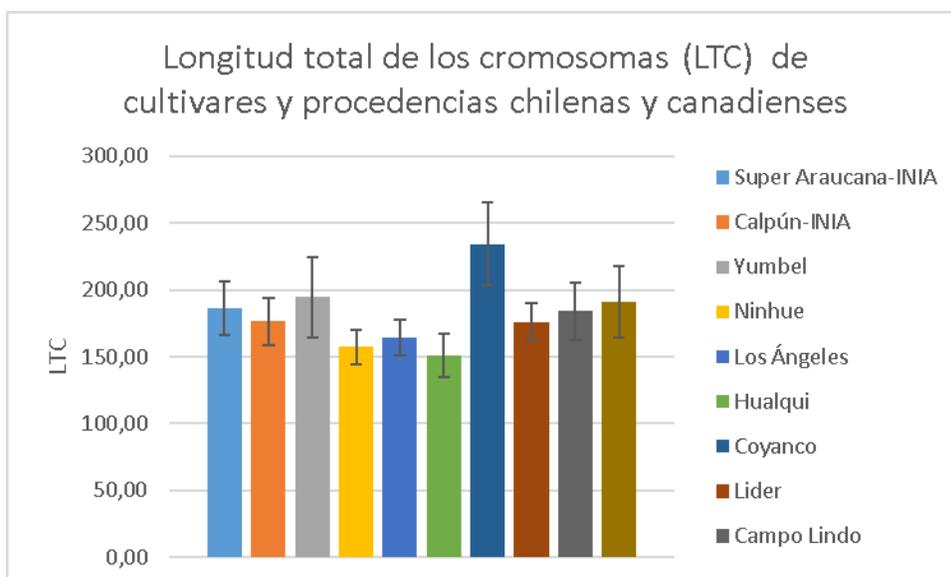


Figura 6. Longitud total de los cromosomas (LTC) para cada cultivar y procedencia de *Lens culinaris* evaluado en este estudio. Arregla el título del gráfico

Tabla 1. Promedio de la longitud total de los cromosomas (LTC), asimetría cariotípica intercromosomal (CVCL) y asimetría intracromosomal (MCA), para cada cultivar y procedencia, se incluye además su respectiva desviación estándar.

Material	LTC (um)	CV _{CL}	M _{CA}
Calpún-INIA	176,37 ± 17,57	16,30 ± 3,94	28,73 ± 1,45
Super Araucana-INIA	186,21 ± 19,90	16,72 ± 2,58	23,62 ± 1,56
Yumbel	194,44 ± 30,04	13,11 ± 2,77	25,52 ± 1,16
Ninhue	157,17 ± 13,05	15,21 ± 1,94	25,42 ± 1,80
Coyanco	234,28 ± 31,22	16,34 ± 2,00	24,55 ± 1,11
Hualqui	150,86 ± 16,42	31,25 ± 4,05	25,69 ± 2,56
Los Ángeles	164,00 ± 13,22	14,40 ± 0,84	26,23 ± 1,31
Campo Lindo	184,06 ± 21,38	14,45 ± 1,29	26,47 ± 1,32
Líder	176,11 ± 13,85	15,56 ± 2,15	25,91 ± 2,20
Martini	190,92 ± 26,44	14,48 ± 1,59	28,76 ± 1,67

Tabla 2. Valores p del test de Tukey para las diferencias significativas en la asimetría intracromosomal (M_{CA}) de Calpún-INIA, Super Araucana-INIA y Martini.

Comparaciones	M_{CA} (valor p)
Calpún-INIA - Coyanco	0,001433
Calpún-INIA - Hualqui	0,0399
Calpún-INIA - Ninhue	0,01696
Calpún-INIA - S. Araucana-INIA	$1,84 \times 10^{-05}$
Calpún-INIA - Yumbel	0,02302
S. Araucana-INIA - Martini	$1,59 \times 10^{-05}$
Martini - Coyanco	0,001264
Martini - Hualqui	0,03592
Martini - Ninhue	0,01513
Martini - Yumbel	0,0206

Tabla 3. Valores p del test de Tukey para las diferencias significativas en la asimetría intercromosomal (CV_{CL}) de Hualqui, con respecto a los demás cultivares y procedencias.

Comparaciones	CV_{CL} (valor p)
Hualqui - Coyanco	$1,81 \times 10^{-11}$
Hualqui - Ninhue	$1,80 \times 10^{-11}$
Hualqui - Yumbel	$1,79 \times 10^{-11}$
Hualqui - Los Ángeles	$1,79 \times 10^{-11}$
Hualqui - Calpún-INIA	$1,80 \times 10^{-11}$
Hualqui - Super Araucana-INIA	$1,81 \times 10^{-11}$
Hualqui - Líder	$1,80 \times 10^{-11}$
Hualqui - Martini	$1,79 \times 10^{-11}$
Hualqui - Campo Lindo	$1,79 \times 10^{-11}$

Tabla 4. Valores p del test de Dunn-Bonferroni con valor p corregido, para las diferencias significativas en la longitud total de los cromosomas (LTC) para Coyanco y Hualqui.

Comparaciones	LTC (Valor p)
Coyanco - Hualqui	$5,50 \times 10^{-05}$
Coyanco - Ninhue	0,0003101
Coyanco - Los Ángeles	0,006024
Hualqui - Yumbel	0,04307



Cultivar	Par de cromosomas													
	1		2		3		4		5		6		7	
Calpún-INIA	P	q	p	q	p	q	p	q	p	q	p	q	p	q
	6,14 ±0,84	9,36 ±1,20	5,79 ±1,47	8,22 ±1,59	5,24 ±0,86	8,12 ±1,25	3,57 ±0,67	8,44 ±1,11	5,28 ±0,62	6,59 ±0,65	3,04 ±0,73	8,14 ±1,25	3,12 ±0,68	7,17 ±1,30
(p+q)	15,50 ± 1,74		14,01 ± 3,00		13,37 ± 1,37		12,01 ± 1,51		11,87 ± 1,17		11,18 ± 1,59		10,29 ± 1,60	
Super Araucana-INIA	p	q	p	q	p	q	p	q	p	q	p	q	p	q
	6,88 ±0,99	9,40 ±1,55	6,90 ±1,02	9,31 ±0,75	6,68 ±1,27	7,95 ±1,42	6,34 ±0,64	7,53 ±0,85	3,98 ±1,22	8,42 ±1,27	3,70 ±0,87	7,73 ±1,17	3,71 ±0,91	8,56 ±0,91
(p+q)	16,28 ± 2,05		16,21 ± 1,42		14,63 ± 2,53		13,87 ± 1,20		12,40 ± 2,22		12,27 ± 1,46		11,43 ± 1,49	
Ninhue	p	q	p	q	p	q	p	q	p	q	p	q	p	q
	5,68 ±0,76	9,00 ±1,28	5,04 ±0,74	7,43 ±0,73	5,20 ±0,83	7,03 ±0,79	3,64 ±0,48	8,02 ±0,99	4,95 ±0,61	5,82 ±0,71	3,16 ±0,21	6,94 ±1,21	3,01 ±0,55	6,80 ±0,58
(p+q)	14,68 ± 1,86		12,46 ± 1,39		12,23 ± 1,26		11,66 ± 1,11		10,77 ± 1,10		10,10 ± 1,24		9,81 ± 0,94	
Coyanco	p	q	p	q	p	q	p	q	p	q	p	q	p	q
	7,59 ±1,68	10,75 ±2,04	7,29 ±1,34	9,82 ±1,82	7,05 ±1,22	9,00 ±1,53	6,89 ±1,41	7,95 ±1,60	4,87 ±1,47	9,45 ±1,43	4,27 ±1,68	9,39 ±1,32	3,64 ±0,75	8,12 ±1,09
(p+q)	18,34 ± 3,55		17,12 ± 3,03		16,05 ± 2,50		14,84 ± 2,85		14,32 ± 2,42		13,66 ± 2,34		11,76 ± 1,64	
Hualqui	p	q	p	q	p	q	p	q	p	q	p	q	p	q
	5,20 ±1,13	7,33 ±0,92	4,74 ±0,94	6,60 ±1,03	4,68 ±0,81	6,03 ±0,97	4,61 ±0,83	5,47 ±0,81	2,83 ±0,57	6,51 ±0,81	2,69 ±0,59	6,36 ±0,63	2,68 ±0,54	5,95 ±0,73
(p+q)	12,53 ± 1,75		11,34 ± 1,83		10,71 ± 1,66		10,07 ± 1,47		9,34 ± 1,24		9,05 ± 1,02		8,63 ± 1,12	

Tabla 5. Promedio de la longitud del brazo corto (p) y brazo largo (q) de los cromosomas homólogos de los cultivares Calpún-INIA, Super Araucana-INIA, y las procedencias Ninhue, Coyanco, y Hualqui. Se incluye su desviación estándar y el tamaño promedio de cada cromosoma (p+q).

	Par de cromosomas													
Cultivar	1		2		3		4		5		6		7	
Yumbel	p	q	p	q	p	q	p	q	p	q	p	q	p	Q
	6,51 ±1,32	9,08 ±1,87	6,33 ±1,41	8,99 ±1,36	6,54 ±1,41	8,77 ±1,69	6,81 ±1,20	7,97 ±1,31	3,73 ±0,87	9,16 ±1,35	3,80 ±0,95	8,89 ±1,26	3,65 ±0,78	8,02 ±1,32
(p+q)	15,59 ± 2,78		15,32 ± 2,63		15,31 ± 2,90		14,78 ± 2,36		12,90 ± 1,67		12,69 ± 1,97		11,68 ± 1,95	
Los Ángeles	p	q	p	q	p	q	p	q	p	q	p	q	p	Q
	5,46 ±0,57	8,31 ±0,83	5,25 ±0,51	7,79 ±0,69	5,26 ±0,65	6,62 ±0,86	3,26 ±0,52	8,27 ±0,73	5,16 ±0,39	6,15 ±0,79	3,02 ±0,40	7,80 ±0,77	2,99 ±0,52	6,47 ±0,75
(p+q)	13,77 ± 2,05		13,04 ± 1,09		11,88 ± 1,02		11,53 ± 0,97		11,30 ± 0,97		10,83 ± 0,95		9,46 ± 0,89	
Campo Lindo	p	q	p	q	p	q	p	q	p	q	p	q	p	q
	7,47 ±1,40	10,26 ±2,28	6,66 ±1,67	10,68 ±1,92	6,00 ±0,96	8,12 ±0,99	3,88 ±0,64	9,90 ±1,33	5,89 ±1,01	6,84 ±1,02	3,43 ±0,45	8,55 ±1,11	3,44 ±0,83	7,74 ±1,28
(p+q)	17,73 ± 3,53		17,35 ± 3,10		14,12 ± 1,82		13,78 ± 1,84		12,73 ± 1,94		11,98 ± 1,34		11,18 ± 2,03	
Líder	p	q	p	q	p	q	p	q	p	q	p	q	p	q
	6,16 ±0,86	9,24 ±1,05	5,81 ±0,78	8,67 ±1,02	5,28 ±0,73	7,28 ±1,21	3,88 ±0,58	8,26 ±1,03	4,97 ±0,80	6,24 ±1,02	3,26 ±0,35	7,76 ±1,01	3,39 ±0,54	7,56 ±0,92
(p+q)	15,40 ± 1,72		14,48 ± 1,66		12,55 ± 1,60		12,14 ± 1,12		11,21 ± 1,62		11,02 ± 1,20		10,94 ± 1,09	
Martini	p	q	p	q	p	q	p	q	p	q	p	q	p	q
	6,09 ±1,16	8,39 ±1,37	5,64 ±0,93	8,93 ±1,08	5,54 ±1,06	8,29 ±1,19	5,64 ±0,94	6,83 ±0,77	3,45 ±0,56	8,91 ±1,69	3,02 ±0,54	7,68 ±1,18	2,97 ±0,49	7,56 ±0,85
(p+q)	14,49 ± 2,48		14,57 ± 1,75		13,84 ± 2,08		12,47 ± 1,56		12,36 ± 2,09		10,69 ± 1,44		10,54 ± 1,07	

Tabla 6. Promedio de la longitud del brazo corto (p) y brazo largo (q) de los cromosomas homólogos de las procedencias chilenas Yumbel, Los Ángeles y las canadienses Campo Lindo, Líder y Martini. Se incluye su desviación estándar y el tamaño promedio de cada cromosoma (p+q).



