

EFFECTOS DE LAS HELADAS EN EL CULTIVO DE PAPA, Y DESAFÍOS DEL MEJORAMIENTO GENÉTICO

María Teresa Pino
Tony H.H. Chen

EL CULTIVO DE PAPA ES SIGNIFICATIVAMENTE AFECTADO POR PROBLEMAS DE HELADAS

La incidencia de las heladas tiene impactos significativos en la producción agrícola a nivel mundial. No sólo causa pérdidas en los rendimientos de la mayoría de los cultivos agrícolas, también limita su distribución geográfica. El cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.) es significativamente afectado por heladas. La mayoría de las variedades cultivadas son sensibles a temperaturas inferiores a -2.5°C , a esta temperatura se observan daños visibles a nivel foliar y mermas tanto en los rendimientos como en la calidad de los tubérculos (Chen y Li, 1980). Mientras, en zonas de clima templado las heladas pueden afectar el cultivo de papa en primavera e inicios del otoño, en regiones andinas de América del Sur las heladas pueden ocurrir en cualquier etapa del desarrollo del cultivo, disminuyendo así los rendimientos en diferentes intensidades. Fairlie y Ortega (1995), mostraron que en el sur de Puno (Perú), las heladas entre emergencia y formación de estolones bajaron los rendimientos entre 30 y 50%, y las heladas en floración afectaron el rendimiento en 50%. Hijmans (1999), estimó que cerca del 25% del área total plantada con papa en el altiplano tiene alto riesgo de heladas ($>33\%$). Un estudio reciente en Korea mostró que plantas de papas afectadas con daño severo por helada ($>75\%$ daño visual) alcanzaron un rendimiento de 31 ton/ha, mientras que aquellas plantas que experimentaron un bajo daño por heladas ($<25\%$ daño visual) alcanzaron un rendimiento de 53 ton/ha (Chang *et al.*, 2014). En la zona mediterránea, donde la producción

de papa precoz significa altos retornos para el productor, las heladas pueden ser devastadoras en cualquier etapa del cultivo (Chen y Li, 1980; Barrientos *et al.*, 1994; Iovene *et al.*, 2004).

Además de las pérdidas en rendimientos y del daño foliar, las heladas inducen la formación de cristales de hielo a temperaturas de congelación. Se pueden formar cristales de hielo dentro del protoplasma causando el rompimiento y muerte celular, o también en los espacios extracelulares produciendo severa deshidratación celular (Palta y Li, 1980; Toivio-Kinnican *et al.*, 1981; Steponkus, 1984). Muchos de los efectos del estrés por bajas temperaturas están relacionados con la variación en la fluidez de las membranas, temperaturas bajo 0°C disminuyen la semi-permeabilidad de la membrana debido a la desnaturalización de proteínas y alteración de la composición de lipídica de la membrana (Palta y Li, 1980). Un análisis comparativo entre *S. tuberosum* (sensible a heladas) y *Solanum commersonii* Dun (tolerante a heladas con capacidad de aclimatación a bajas temperaturas) mostró diferencias en la estructura lipídica de la membrana luego de ser expuestas a bajas temperaturas, incluyendo un incremento de los ácidos grasos insaturados para aumentar su fluidez. Sugiriendo que esta capacidad sería un mecanismo de adaptación a bajas temperaturas en *S. commersonii* (Palta *et al.*, 1993).

Asimismo, bajas temperaturas pueden inducir la acumulación de especies reactivas de oxígeno ROS (por su sigla en inglés, Reactive Oxygen Species) causando daño oxidativo (Thomashow, 1999), las cuales pueden ser el resultado de fallas en la transferencia de electrones durante la fotosíntesis y/o a daños en el fotosistema II, con la consecuente disminución de la eficiencia fotosintética (Steffen y Palta, 1989; O’Kane *et al.*, 1996; McKersie *et al.*, 2000). Un estudio que comparó la actividad fotosintética entre *Solanum acaule* y *S. tuberosum* luego de un periodo de aclimatación a bajas temperaturas, encontró una correlación positiva entre la actividad fotosintética y la capacidad de aclimatación (Steffen y Palta, 1989). Además, en *S. tuberosum*, se ha observado una importante disminución de la actividad fotosintética a bajas temperaturas e incluso con daños irreversibles en el sistema fotosintético (Seppänen y Coleman, 2003).

CAPACIDAD DE ACLIMATACIÓN A BAJAS TEMPERATURAS Y FUENTES DE TOLERANCIA A HELADAS EN PAPAS

A pesar que la mayoría de las variedades cultivadas de papas son sensibles a temperaturas inferiores a -2.5°C , algunas especies silvestres tienen la capacidad de sobrevivir a heladas de -5°C e incluso incrementar su tolerancia a temperaturas tan bajas como -10°C , previo periodo de aclimatación a bajas temperaturas (Chen y Li, 1980; Costa y Li, 1992; Vega y Bamberg, 1995). Esta capacidad de aclimatación a bajas temperaturas (CA) (por su sigla en inglés, Cold Acclimation) se caracteriza por la habilidad que tienen algunas especies de incrementar la tolerancia a temperaturas aún más bajas luego de estar expuestas por un corto tiempo a temperaturas entre 0° y 4°C . En la **Tabla 10.1**, se clasifican diferentes especies de papas según su respuesta a bajas temperaturas destacando *S. acaule*, *S. commersonii*, *S. multidissectum* y *S. chomatophilum* con tolerancias entre -4.5°C a -11.5°C . Estudios posteriores de Vega *et al.* (2000), reclasificaron a *S. megistacrolobum* y *S. sanctaerosae* sugiriendo que estas especies también tendrían capacidad de CA, reportando un aumento en su tolerancia a heladas desde -3.7°C a -6.3°C y de -3.8°C a -5.6°C , respectivamente.

La capacidad de CA está asociada a cambios anatómicos, fisiológicos, bioquímicos y moleculares en plantas; entre estos últimos destaca la expresión de genes relacionados por ejemplo con la producción de enzimas claves en la vía de síntesis de osmolitos, proteínas con funciones protectoras, enzimas antioxidantes, factores de transcripción (FT) y otras proteínas involucradas en la respuesta a estrés térmico (Thomashow, 1999). Detalles de osmoprotectores y genes de respuestas a estrés por bajas temperaturas son descritos en los capítulos 3 y 4 de esta publicación. Otro de los factores responsable de la adaptación a bajas temperaturas es el incremento de los ácidos grasos insaturados en las membranas celulares a fin de mantener su fluidez (Somerville y Browse, 1991; Palta *et al.*,

Tabla 10.1. Clasificación de especies *Solanum* con capacidad de tuberización según tolerancia a heladas y capacidad de aclimatación a bajas temperaturas (adaptado de Chen y Li 1980 y Vega *et al.*, 2000*).

Categoría	Especies	LT50 (°C) Sin Aclimatación	LT50 (°C) Con Aclimatación
Tolerantes a heladas, con capacidad de aclimatación a bajas temperaturas	<i>S. acaule</i>	-6.0	-9.0
	<i>S. commersonii</i>	-4.5	-11.5
	<i>S. multidissectum</i>	-4.0	-8.5
	<i>S. chomatophilum</i>	-5.0	-8.5
Tolerantes a heladas, sin capacidad de aclimatación a bajas temperaturas	<i>S. bolviense</i>	-4.5	-4.5
Sensible a Heladas, con capacidad de aclimatación a bajas temperaturas	<i>S. oplocense</i>	-3.0	-8.0
	<i>S. polytrichon</i>	-3.0	-6.0
	<i>S. megistacrolobum*</i>	-3.7	-6.3
	<i>S. sanctae-rosae*</i>	-3.8	-5.6
Sensible a Heladas, sin capacidad de aclimatación a bajas temperaturas	<i>S. brachistotrichum</i>	-3.5	-3.5
	<i>S. cardiophyllum</i>	-3.0	-3.0
	<i>S. fendleri</i>	-3.0	-3.0
	<i>S. jamesii</i>	-3.0	-3.0
	<i>S. kurtzianum</i>	-3.5	-3.5
	<i>S. microdontum</i>	-3.0	-3.0
	<i>S. pinnatisectum</i>	-2.5	-2.5
	<i>S. stonotonum</i>	-3.5	-3.5
	<i>S. stoloniferum</i>	-3.0	-3.0
	<i>S. sucrense</i>	-3.0	-3.0
	<i>S. tuberosum</i>	-3.0	-3.0
	<i>S. venturii</i>	-3.5	-3.5
<i>S. vernei</i>	-3.5	-3.5	
<i>S. verrucosum</i>	-3.0	-3.0	

LT50: temperatura letal a la cual el 50% de las muestras mueren

1993; Wada *et al.*, 1994). A bajas temperaturas, se ha observado la síntesis ácidos grasos insaturados vía síntesis de enzimas del tipo desaturasas para evitar la pérdida de fluidez a bajas temperaturas y la desnaturalización de las proteínas (Thomashow, 1999). Un estudio reciente que evaluó la sobre expresión del gen acyl-lipid-12-desaturasa en papas, sugirió que en conjunto con un incremento de los ácidos grasos insaturados en la membrana mejoraría la tolerancia a heladas (Amiri *et al.*, 2010). La capacidad de aclimatación a bajas temperaturas en papas también ha sido relacionada con cambios en la ultra estructura de la hoja y particularmente en la empalizada; tempranamente se observó que aquellas especies de papas más tolerantes a bajas temperaturas tenían doble empalizada, sugiriéndolo incluso como un criterio indirecto de selección (Palta y Li, 1979; Tiwari y Garg, 1982; Tiwari *et al.*, 1986). El índice de estomas también se ha propuesto como un criterio de selección en papas. Algunos estudios han reportado mayor número de estomas por área en aquellas especies más tolerantes a heladas (Palta y Li, 1979) y en híbridos de *S. commersonii* x *S. cardiophyllum* (Kleinhenz *et al.*, 1995). Similares resultados fueron reportados en un estudio que comparó la respuesta a heladas entre líneas transgénicas de *S. commersonii* (35S::AtCBF1) y su control no transgénico; las líneas transgénicas en conjunto con mostrar mayor tolerancia a heladas presentaron una empalizada más gruesa y mayor número de estomas por área que el control, ver **Figura 10.1** (Pino *et al.*, 2006). Además, en algunas especies silvestres de papas, se ha asociado la tolerancia a heladas con la presencia de pigmentos antocianos tanto en hojas como en tallos (Estrada, 1982).

MEJORAMIENTO GENÉTICO CONVENCIONAL VERSUS INGENIERÍA GENÉTICA PARA LA TOLERANCIA A HELADAS

Uno de los desafíos de los mejoradores de papas, es transferir la capacidad de algunas papas silvestres para aclimatarse a bajas temperaturas y soportar heladas inferiores a -3°C . Se han realizado varios intentos por transferir este carácter a la papa cultivada vía mejoramiento genético convencional, con resultados no muy alen-

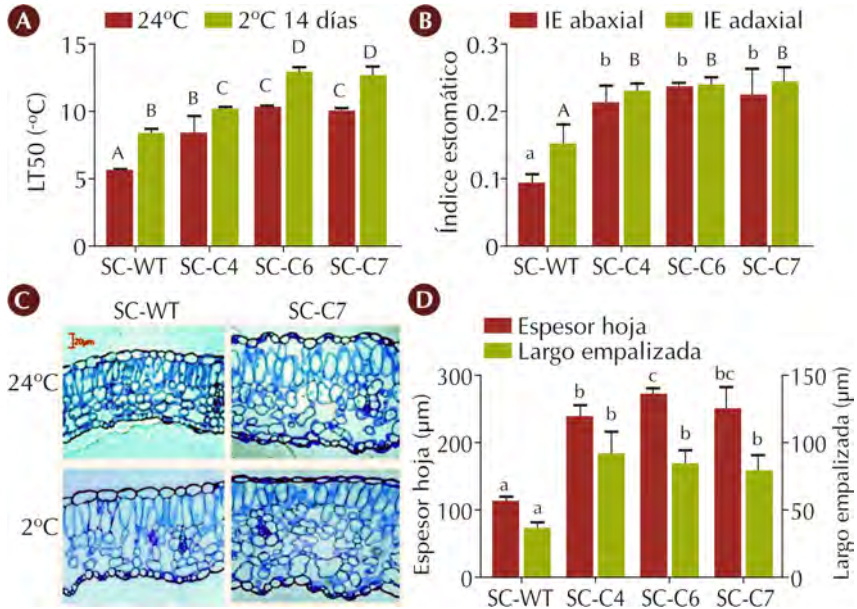


Figura 10.1. Análisis comparativo entre *Solanum commersonii* Dun (SC-WT) y tres líneas transgénicas de *S. commersonii* transformadas con 35S: AtCBF1 (SC-C4, SC-C6, SC-C7). **A**) LT50 temperatura letal en plantas sin aclimatación (24°C) y luego de dos semanas en aclimatación a 2°C. **B**) Índice estomático (IE) en la cara abaxial y cara adaxial de la hoja. **C**) Corte transversal de la hoja (200X) sin aclimatación (24°C) y luego de dos semanas en aclimatación a 2°C. **D**) Espesor de la hoja y largo de las células empalizadas (Adaptado de Pino *et al.*, 2006).

tadores; básicamente porque la mayoría de las papas silvestres son sexualmente incompatibles con la papa cultivada y además porque la tolerancia a heladas está regulada por varios genes. Como estrategia se ha recurrido a la fusión de protoplastos, al rescate de embriones, y al uso de especies puentes para superar las barreras naturales propias de cruzamientos inter-específicos. Sin embargo, se ha observado que “the linkage drag”, limita la introgresión de genes desde papas silvestres a la cultivada porque muchos caracteres exóticos e indeseables pueden ser transmitidos en conjunto con la tolerancia a heladas, tales como alto contenido de alcaloides y largos estolones (Estrada *et al.*,

1993). Algunos ejemplos de cruzamientos inter específicos entre *S. tuberosum* x *S. commersonii* son los estudios de Cardi *et al.* (1993a, b) y de Nyman y Waara (1997). En ambos estudios, la mayoría de los híbridos mostraron un fenotipo similar a *S. tuberosum*, mayor vigor y mejoraron su capacidad de CA en diferentes grados. Sin embargo, varios de ellos fueron más sensibles a bajas temperaturas que *S. tuberosum*, mostrando además clorosis foliar. Asimismo, la mayoría de estos híbridos mostraron macho esterilidad limitando su uso en los programas de mejoramiento genético (Cardi *et al.*, 1993a; Nyman y Waara, 1997). Otro estudio en cruzamientos inter específicos entre *S. commersonii* y *S. tuberosum*, mostró que el F1 (triploide), presentó tolerancia a heladas y capacidad de CA similar a *S. commersonii*, pero con algunas pérdidas en las características agronómicas de *S. tuberosum*. Sin embargo, el seguimiento de los genotipos BC1 (pentaploide) y BC2 (tetraploide o cercano) mostró menor tolerancia a heladas que el F1 (Carputo *et al.*, 2000). Otro estudio entre híbridos *S. commersonii* (5X) y *S. tuberosum* (4X), mostró que los valores LT50 de los híbridos fluctuaron entre ambos padres, y sólo algunos de ellos mejoraron su tolerancia a heladas, superando los -3°C (Iovene *et al.*, 2004). En otro estudio, la incorporación del citoplasma de *S. commersonii* no mejoró la tolerancia a heladas en papas sensibles a heladas como *S. brachistotrichum*, *S. cardiophyllum*, y *S. Pinnatisectum* (Bamberg *et al.*, 2005). Por otra parte, un estudio tendiente a construir un mapa parcial de ligamiento entre cruzamientos de *S. commersonii* y *S. cardiophyllum*, indicó que la tolerancia a heladas y la capacidad de CA están bajo control genético independiente (Vega *et al.*, 2003).

El mejoramiento convencional para incrementar la tolerancia a heladas y transmitir la capacidad de CA entre papas silvestres y cultivadas, además de las limitantes antes mencionada, requiere considerable tiempo en retrocruzas, en evaluaciones y en selección fenotípica (Pavek y Corsini, 2001; Iovene *et al.*, 2004). Sin embargo, el uso de herramientas biotecnológicas modernas como la ingeniería genética y la genómica, prometen acelerar este proceso. Los marcadores moleculares han sido una herramienta útil para alcanzar algunos objetivos del mejoramiento genético, permiten realizar un tipo de

selección asistida a través de la relación de la variabilidad genotípica y fenotípica, acelerando el proceso de selección. Entre los principales marcadores moleculares están los del tipo AFLPs (polimorfismo en el largo de los fragmentos amplificados), RFLPs (polimorfismo en el largo de los fragmentos de restricción) y microsatélites (SSRs) entre otros, los cuales han sido muy efectivos en la identificación de genes que controlan características simples, asociadas a uno o pocos genes. También destacan los marcadores del tipo SNPs (polimorfismos en una sola base), que se caracterizan por su abundancia en el genoma. Sin embargo, su identificación y evaluación fue inicialmente limitada por su alto costo. En los últimos años, la secuenciación a gran escala, así como la aplicación de la técnica de genotipado mediante secuenciación de nueva generación o GBS (por su sigla en inglés, Genotyping by Sequencing) permite genotipar un gran número de individuos mediante secuenciación masiva a bajo costo, obteniendo marcadores (SNPs de alta calidad) representativos por todo el genoma. Esta técnica permitirá genotipar las diferentes generaciones obtenidas (F1, F2..., Fn), en los programas de mejoramiento genético en forma efectiva. Por otra parte, estudios de Asociación del Genoma Completo o GWAS (por su sigla en inglés, Genome Wide Association Studies), permite realizar un análisis de asociación entre los SNPs y caracteres o rasgos de interés como la productividad, la calidad, y tolerancia a estrés abiótico, entre otros (Elshire *et al.*, 2011; Davey *et al.*, 2011). Herramientas como estas, unida a la selección genómica (SG), prometen acelerar la obtención de variedades tolerantes a estrés abiótico.

Respecto a los genes asociados a la tolerancia a heladas, el uso de la transgenia ha permitido introgresar algunos de estos genes a papa cultivada con resultados variables (ver Capítulo 4 y Tabla 4.1). Uno de los primeros intentos fue la transformación genética del cultivar Russet Burbank con un gen sintético AFP (por su sigla en inglés, Antifreezing Protein). Los resultados mostraron en las líneas transgénicas menor pérdida de electrolitos y mayor tolerancia a heladas con un LT50 entre -3.0°C a -3.5°C (Wallis *et al.*, 1997). Luego, el cultivar Desireé fue transformado con un gen de levadura del tipo invertasa (INVase) bajo el control del promotor B33

Patatín, las líneas transgénicas mostraron mejor comportamiento a bajas temperaturas debido a cambios en la relación de azúcares solubles (Deryabin *et al.*, 2003). El cultivar Desireé también ha sido transformado con el gen desaturasa ($\omega 9$) con el objeto de producir cambios en la conformación lipídica de la membrana e inducir tolerancia a heladas (De Palma *et al.*, 2008). Estudios en el cultivar Desnitsa, usando como transgen el gen delta12-desaturasa (desA) proveniente de una cianobacteria y bajo un promotor constitutivo, mostraron un incremento en la tolerancia a heladas debido a un aumento de los ácidos grasos insaturados (Maali-Amiri *et al.*, 2007; Demin *et al.*, 2008; Amiri *et al.*, 2010). Algunos cultivares de papas también han sido transformados con FT del tipo DREB/CBF (DREB1b/AtCBF1, DREB1c/AtCBF2, DREB1a/AtCBF3). Estudios en el cultivar Umatilla mostraron que la expresión de los FTs, AtCBF1 y AtCBF3, bajo control de un promotor inducible rd29A, mejoró la tolerancia a heladas sin causar efectos negativos en el fenotipo de la planta, mientras que la expresión de AtCBF1 y AtCBF3 bajo control de un promotor constitutivo mejoró la tolerancia a heladas, pero alteró el fenotipo de la mayoría de las líneas transgénicas (Pino *et al.*, 2007; Pino *et al.*, 2008). El efecto de estos FT fue ratificado en el cultivar Desireé; el gen DREB1a/AtCBF3 bajo control del promotor inducible (rd29A), mostró consecuentemente mayor tolerancia a heladas en plantas *in vitro* (Behnam *et al.*, 2007). También la expresión constitutiva del gen DREB1b/AtCBF1 en el cv Desireé mejoró la tasa de sobrevivencia en plantas (en macetas) sometidas a -6°C durante 0, 15, 30 y 45 horas (Movahedi *et al.*, 2012).

HERRAMIENTAS PARA EVALUAR EL DAÑO POR HELADAS EN PAPAS

Los métodos para evaluar respuestas a heladas se resumen en la **Tabla 10.2**. Pueden existir algunas variaciones respecto a otros cultivos en el tratamiento de aclimatación, en la tasa de enfriamiento por hora, y en las temperaturas mínimas evaluadas; porque no todas las especies responden a CA ni muestran el mismo grado de tolerancia a heladas. Uno de los métodos más utilizado, y citado en papas, es aquel que

Tabla 10.2. Análisis comparativo entre distintos métodos para evaluar daños por heladas en papas.

Método	Aclimatación	Descripción	Evaluaciones	Equipamiento
Helada directa en campo.	Natural.	Se realiza en el campo y depende del clima y de la ocurrencia heladas	<ul style="list-style-type: none"> - Daño visual de la hoja 5 días post helada (ver Figura 10.2). - Porcentaje de plantas muertas. - Porcentaje de plantas recuperadas post-helada. - Rendimiento/planta. 	<ul style="list-style-type: none"> - Termómetro de suelo con dataloggers - Estación meteorológica.
Heladas simuladas en cámara de crecimiento controlada.	2°C durante dos semanas en cámara de crecimiento.	Se realiza en plantas contenidas en macetas. Post aclimatación, las plantas se someten a una tasa de enfriamiento de -1,0°C por hora.	<ul style="list-style-type: none"> - Daño visual de la hoja 5 días post helada (ver figura 10.2). - Porcentaje de plantas muertas. - Porcentajes de plantas recuperadas post-helada. - Rendimiento/planta 	<ul style="list-style-type: none"> - Cámara simulación de heladas y cámara de aclimatación. - Fitotrones.
Termo estabilidad de la membrana, (Ion leakage Test).	2°C durante dos semanas en cámara de crecimiento.	Se realiza en plantas contenidas en macetas. Post aclimatación, discos de hojas se someten a una tasa de enfriamiento de -1,0°C por hora.	<ul style="list-style-type: none"> - LT50, temperatura al cual se produce un 50% de rompimiento de las células por bajas temperaturas. - % Pérdida de electrolitos. 	<ul style="list-style-type: none"> - Cámara de aclimatación. - Baños refrigerados con circulación y control digital de temperaturas. - Conductivímetro.
Clorofila fluorescente.	Natural o a 2°C durante dos semanas en cámara de crecimiento.	Método indirecto post heladas, se evalúa en hojas expandidas y fisiológicamente activas.	Índice rendimiento cuántico máximo del PSII (Fv/Fm).	Fluorómetro.

evalúa la termo estabilidad de la membrana o pérdida de electrolitos a temperaturas de congelamiento. Este es un método no destructivo validado hace varios años que evalúa hojas expandidas y fisiológicamente activas, según lo descrito por Sukumaran y Weiser (1972). Básicamente, se cortan discos de hojas previamente lavadas en agua desionizada, se colocan en tubos de ensayos e incuban a -1°C durante 60 minutos en un baño termo-regulado. Luego, se agregan pequeñas piezas de hielo a cada tubo para asegurar la formación de cristales de hielo y se incuban a -1.5°C durante 60 minutos. Posteriormente, la temperatura se va disminuyendo a una tasa de $-1,0^{\circ}\text{C}$ por hora y los tubos se retiran según las temperaturas en evaluación. Finalmente, los discos de hojas se agitan con agua desionizada durante una hora para extraer los electrolitos liberados producto del daño por congelamiento y se mide la conductividad eléctrica inicial (EC1). Luego, de toda una noche a 4°C , se incuban durante 15 min a una temperatura de 100°C ; para extraer todos los electrolitos liberados y se mide la conductividad eléctrica final (EC2). El porcentaje de electrolitos se calcula con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Electrolitos} = \frac{EC1}{EC2} \times 100$$

Otros métodos utilizados para evaluar el efecto de las heladas en el cultivo de papa, es la evaluación del daño directo causado por heladas ocurridas en campo y por heladas simuladas en cámara de crecimiento controlada. Ambos son métodos destructivos que permiten evaluar; daño visual del follaje a los 5 días post helada (ver escala en **Figura 10.2**), porcentaje de plantas muertas, porcentajes de plantas recuperadas pos-helada y el rendimiento por planta (Chang *et al.*, 2014). La principal desventaja, de la evaluación directa en campo es que depende del clima, de la ocurrencia de la helada y no permite controlar la intensidad de la helada. Por otra parte, la principal desventaja de la evaluación de heladas simuladas en cámara de crecimiento controlada, es la necesidad de infra-estructura, alto costo y el bajo número de plantas que se puede evaluar por experimento.

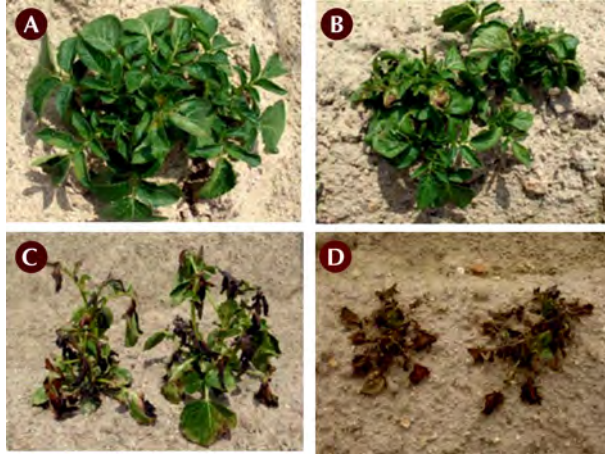


Figura 10.2. Escala de daño en plantas de papas afectadas por heladas 40 días después de la plantación. **A)** sin daño o muy bajo. **B)** daño bajo (<25%). **C)** daño moderado (50%). **D)** daño severo (>75%). El daño fue registrado cinco días después de ocurrida la helada según el porcentaje de área foliar dañada (Chang *et al.*, 2014).

Entre los métodos indirectos no destructivos, el más utilizado es la medición del rendimiento cuántico máximo del PSII (F_v/F_m) mediante un fluorómetro. Básicamente, en post aclimatación y/o helada, las hojas son sometidas a oscuridad durante 10-30 minutos y se miden algunos parámetros de fluorescencia de clorofilas. Entre el más reportado en respuesta a bajas temperaturas está F_v/F_m , que indica el porcentaje de centros de reacción funcionales del PSII. Su disminución indicaría pérdida de la función fotosintética y valores inferiores a 0.800 indicarían estrés (Steffen y Palta, 1989; O’Kane *et al.*, 1996; McKersie *et al.*, 2000).

LITERATURA CONSULTADA

- Amiri, R. M., Yur'eva, N. O., Shimshilashvili, K. R., Goldenkova-Pavlova, I. V., Pchelkin, V. P., Kuznitsova, E. I., Tsydendambaev, V. D., Trunova, T. I., Los, D. A., Jouzani, G. S., and Nosov, A. M. (2010).** Expression of Acyl-lipid Δ 12-desaturase Gene in Prokaryotic and Eukaryotic Cells and Its Effect on Cold Stress Tolerance of Potato. *Journal of Integrative Plant Biology*, 52(3), 289-297.
- Bamberg, J. B., Palta, J. P., and Vega, S. E. (2005).** *Solanum commersonii* cytoplasm does not improve freezing tolerance in substitution backcross hybrids with frost-sensitive potato species. *American Journal of Potato Research*, 82(3), 251-254.
- Barrientos, M., Mol, E., Peruzzo, G., Contreras, A., and Alberdi, M. (1994).** Responses to cold of Chilean wild *Solanum* species. *Environmental and Experimental Botany*, 34(1), 47-54.
- Behnam, B., Kikuchi, A., Celebi-Toprak, F., Kasuga, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Watanabe, K. N. (2007).** Arabidopsis rd29A::DREB1A enhances freezing tolerance in transgenic potato. *Plant Cell Reports*, 26(8), 1275-1282.
- Cardi, T., Puite, K. J., Ramulu, K. S., D'Ambrosio, F., and Frusciante, L. (1993a).** Production of somatic hybrids between frost tolerant *Solanum commersonii* and *S. tuberosum*: Protoplast fusion, regeneration and isozyme analysis. *American Potato Journal*, 70(11), 753-764.
- Cardi, T., D'Ambrosio, E., Consoli, D., Puite, K. J., and Ramulu, K. S. (1993b).** Production of somatic hybrids between frost-tolerant *Solanum commersonii* and *S. tuberosum*: characterization of hybrid plants. *Theoretical and Applied Genetics*, 87(1-2), 193-200.

- Carputo, D., Cardi, T., Palta, J. P., Sirianni, P., Vega, S., and Frusciante, L. (2000).** Tolerance to low temperatures and tuber soft rot in hybrids between *Solanum commersonii* and *Solanum tuberosum* obtained through manipulation of ploidy and endosperm balance number (EBN). *Plant Breeding*, 119(2), 127-130. doi: 10.1046/j.1439-0523.2000.00477.x
- Chang, D. C., Sohn, H. B., Cho, J. H., Im, J. S., Jin, Y. I., Do, G. R., Kim, S.J., Cho, H.M., and Lee, Y. B. (2014).** Freezing and Frost Damage of Potato Plants: a Case Study on Growth Recovery, Yield Response, and Quality Changes. *Potato Research*, 57(2), 99-110.
- Chen, T.H. H., and Li, P. H. (1980).** Characteristics of cold acclimation and deacclimation in tuber-bearing *Solanum* species. *Plant Physiology*, 65(6), 1146-1148.
- Costa, A., and Li, P. H. (1992).** Development of cold hardiness in *Solanum tuberosum* by abscisic acid and mefluidide. In: *Advances in Plant Hardiness*. Li, P.H. and Christersson, L. (Eds). CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, 139-140.
- Davey, J. W., Hohenlohe, P. a, Etter, P. D., Boone, J. Q., Catchen, J. M., and Blaxter, M. L. (2011).** Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. *Nature Reviews. Genetics*, 12(7), 499-510.
- Demin, I. N., Deryabin, A. N., Sinkevich, M. S., and Trunova, T. I. (2008).** Insertion of cyanobacterial desA gene coding for $\Delta 12$ -acyl-lipid desaturase increases potato plant resistance to oxidative stress induced by hypothermia. *Russian Journal of Plant Physiology*, 55(5), 639-648.
- De Palma, M., Grillo, S., Massarelli, I., Costa, A., Balogh, G., Vigh, L., and Leone, A. (2008).** Regulation of desaturase gene expression, changes in membrane lipid composition and freezing tolerance in potato plants. *Molecular Breeding*, 21(1), 15-26.

- Deryabin, A. N., Trunova, T. I., Dubinina, I. M., Burakhanova, E. A., Sabel'nikova, E. P., Krylova, E. M., and Romanov, G. A. (2003).** Chilling tolerance of potato plants transformed with a yeast-derived invertase gene under the control of the B33 patatin promoter. *Russian Journal of Plant Physiology*, 50(4), 449-454.
- Elshire, R. J., Glaubitz, J. C., Sun, Q., Poland, J. a, Kawamoto, K., Buckler, E. S., and Mitchell, S. E. (2011).** A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PLoS one*, 6(5), e19379.
- Estrada, N. (1982).** Breeding wild and primitive potato species to obtain frost resistant cultivated varieties. *In: Plant Hardiness and Freezing Stress. Mechanism and Crop Implications*. Li, P.H. and Sakai, A. (Eds). Academic Press, New York, 615-633.
- Estrada, N., Garcia, W., Carrasco, I., and Carrasco. E. (1993).** Breeding potato for tolerance to frost and resistance to late blight. *American Potato Journal*, 70, 809-810.
- Fairlie, T. E., and Ortega, A. (1995).** Efecto de la presencia de heladas simuladas en diferentes estados fenológicos y su impacto en el rendimiento de la papa cv Ccompis: estudio preliminar. *Revista Latinoamericana de la Papa*, 7(8), 86-93.
- Hijmans, R. J. (1999).** Estimating frost risk in potato production on the Altiplano using interpolated climate data. *CIP Program Report*, 1998, 373-380.
- Iovene, M., Barone, A., Frusciante, L., Monti, L., and Carputo, D. (2004).** Selection for aneuploid potato hybrids combining a low wild genome content and resistance traits from *Solanum comersonii*. *Theoretical and Applied Genetics*, 109(6), 1139-1146.

- Kleinhenz, M. D., Bamberg, J. B., and Palta, J. P. (1995).** Use of stomatal index as a marker to screen backcross populations of two wild potato species segregating for freezing tolerance. *American Potato Journal*, 72(4), 243-250.
- McKersie, B. D., Murnaghan, J., Jones, K. S., and Bowley, S. R. (2000).** Iron-superoxide dismutase expression in transgenic alfalfa increases winter survival without a detectable increase in photosynthetic oxidative stress tolerance. *Plant Physiology*, 122(4), 1427-1438.
- Maali-Amiri, R., Goldenkova-Pavlova, I. V., Yur'Eva, N. O., Pchelkin, V. P., Tsydendambaev, V. D., Vereshchagin, A. G., Der-yabin, A.N., Trunova, T.I., Los D.A., and Nosov, A. M. (2007).** Lipid fatty acid composition of potato plants transformed with the $\Delta 12$ -desaturase gene from cyanobacterium. *Russian Journal of Plant Physiology*, 54(5), 600-606.
- Movahedi, S., Tabatabaei, B. S., Alizade, H., Ghobadi, C., Yamchi, A., and Khaksar, G. (2012).** Constitutive expression of Arabidopsis DREB1B in transgenic potato enhances drought and freezing tolerance. *Biologia Plantarum*, 56(1), 37-42.
- Nyman, M., and Waara, S. (1997).** Characterisation of somatic hybrids between *Solanum tuberosum* and its frost-tolerant relative *Solanum commersonii*. *Theoretical and Applied Genetics*, 95(7), 1127-1132.
- O'Kane, D., Gill, V., Boyd, P., and Burdon, R. (1996).** Chilling, oxidative stress and antioxidant responses in *Arabidopsis thaliana* callus. *Planta*, 198(3), 371-377.
- Palta, J. P., and Li, P. H. (1979).** Frost-hardiness in relation to leaf anatomy and natural distribution of several *Solanum* species. *Crop Science*, 19(5), 665-671.

- Palta, J. P., and Li, P. H. (1980).** Alterations in membrane transport properties by freezing injury in herbaceous plants: Evidence against rupture theory. *Physiologia Plantarum*, 50(2), 169-175.
- Palta, J. P., Whitaker, B. D., and Weiss, L. S. (1993).** Plasma membrane lipids associated with genetic variability in freezing tolerance and cold acclimation of *Solanum* species. *Plant Physiology*, 103(3), 793-803
- Pavek, J. J., and Corsini, D. L. (2001).** Utilization of potato genetic resources in variety development. *American Journal of Potato Research*, 78(6), 433-441.
- Pino, M.T., Skinner, J.S., Jeknic, Z., Park, E.J., Hayes, P.M., and Chen, T.H.H. (2006).** Ectopic Overexpression of AtCBF1 in Potato Enhances Freezing Tolerance. *In: Cold Hardiness in Plants: Molecular Genetics, Cell Biology, and Physiology*. Chen, T.H.H., Uemura M., and Fujikawa, S. (Eds.). ISBN 0-851-99059-2 CAB International, Oxon, UK, 103- 123.
- Pino, M. T., Skinner, J. S., Park, E. J., Jeknic, Z., Hayes, P. M., Thomashow, M. F., and Chen, T. H. H. (2007).** Use of a stress inducible promoter to drive ectopic AtCBF expression improves potato freezing tolerance while minimizing negative effects on tuber yield. *Plant Biotechnology Journal*, 5(5), 591-604.
- Pino, M. T., Skinner, J. S., Jeknic, Z., Hayes, P. M., Soeldner, A. H., Thomashow, M. F., and Chen, T.H.H. (2008).** Ectopic AtCBF1 over-expression enhances freezing tolerance and induces cold acclimation-associated physiological modifications in potato. *Plant, Cell and Environment*, 31(4), 393-406.
- Seppänen, M. M., and Coleman, G. D. (2003).** Characterization of genotypic variation in stress gene expression and photosynthetic parameters in potato. *Plant, Cell and Environment*, 26(3), 401-410.

- Somerville, C., and Browse, J. (1991).** Plant lipids: metabolism, mutants, and membranes. *Science*, 252(5002), 80-87.
- Steffen, K. L., and Palta, J. P. (1989).** Light stress following a frost episode influences the frost tolerance of a wild potato species. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 114, 656-661.
- Steponkus, P. L. (1984).** Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation. *Annual Review of Plant Physiology*, 35(1), 543-584.
- Sukumaran, N.P., and Weiser, C.J. (1972).** An excised leaflet test for evaluating potato frost tolerance. *HortScience*, 7, 467-468.
- Thomashow, M. F. (1999).** Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annual Review of Plant Biology*, 50(1), 571-599.
- Tiwari, S. P., and Garg, K. C. (1982).** Inheritance of frost resistance in potato. *Current Science*, 51, 249-251.
- Tiwari, S. P., Sukumaran, N. P., and Khushu, C. L. (1986).** Path-Coefficient Analysis of Leaf-Anatomical Characters Affecting Frost Injury in Potato. *Plant Breeding*, 97(3), 272-274.
- Toivio-Kinnucan, M. A., Chen, H. H., Li, P. H., and Stushnoff, C. (1981).** Plasma membrane alterations in callus tissues of tuber-bearing *Solanum* species during cold acclimation. *Plant Physiology*, 67(3), 478-483.
- Vega, S. E., and Bamberg, J. B. (1995).** Screening the US potato collection for frost hardiness. *American Potato Journal*, 72(1), 13-21.
- Vega, S. E., Palta, J. P., and Bamberg, J. B. (2000).** Variability in the rate of cold acclimation and deacclimation among tuber-bearing *Solanum* (potato) species. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 125(2), 205-211.

- Vega, S.E., Alfonso, H., Jung, G., Bamberg, J. B., and Palta, J. P. (2003).** Marker-assisted genetic analysis of non-acclimated freezing tolerance and cold acclimation capacity in a backcross *Solanum* population. *American Journal of Potato Research*, 80(6), 359-369.
- Wada, H., Gombos, Z., and Murata, N. (1994).** Contribution of membrane lipids to the ability of the photosynthetic machinery to tolerate temperature stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(10), 4273-4277.
- Wallis, J. G., Wang, H., and Guerra, D. J. (1997).** Expression of a synthetic antifreeze protein in potato reduces electrolyte release at freezing temperatures. *Plant Molecular Biology*, 35(3), 323-330.