

25. Medio ambiente

**Plasticidad fenotípica y variabilidad epigenética en la especie silvestre de papa**

***Solanum kurtzianum***

Ibañez Verónica Noé; Masuelli, Ricardo W; Marfil, Carlos F.

[veronicanoeibanez@gmail.com](mailto:veronicanoeibanez@gmail.com); [rmasuelli@fca.uncu.edu.ar](mailto:rmasuelli@fca.uncu.edu.ar); [cmarfil@fca.uncu.edu.ar](mailto:cmarfil@fca.uncu.edu.ar)

Facultad de Ciencias Agrarias

Universidad Nacional de Cuyo

**Resumen**

Las especies silvestres de papa tienen una extensa distribución geográfica y una amplia variabilidad fenotípica, aunque poco se sabe sobre los mecanismos que operan en las respuestas a las fluctuaciones ambientales. Se sugiere que mecanismos epigenéticos participarían en la generación de variabilidad fenotípica posibilitando la aclimatación y adaptación de las plantas a diversos retos ambientales. Para avanzar en estos interrogantes se utilizó un modelo experimental en el que se cultivaron clones de la especie silvestre de papa *Solanum kurtzianum* dentro de la Reserva Natural Villavicencio, Mendoza, en dos jardines experimentales (JE) ubicados a 1100 y 2100 m s.n.m., diferencia en altitud que genera variaciones significativas en los niveles de radiación, temperatura y humedad. Se observaron diferencias significativas en el fenotipo entre plantas cultivadas en los diferentes JE. Con la técnica MSAP (*Methylation-Sensitive Amplification Polymorphism*) se distinguieron patrones de metilación diferenciales entre clones en función al JE en que fueron cultivados. Se encontró correlación significativa entre variabilidad fenotípica y epigenética ( $R^2=0,27$ ;  $p=0,013$ ). Estas observaciones sugieren que la variabilidad epigenética participa en la respuesta a cambios en las condiciones ambientales y tendría un rol importante en la adaptación y/o aclimatación de *S. kurtzianum*.

**Palabras clave:** Metilación del DNA, MSAP, Parientes silvestres de los cultivos, *Solanum* sección *Petota*, Trasplantes recíprocos.

## Introducción

El ambiente en el que se desarrollan las poblaciones naturales está cambiando. La variabilidad intraespecífica es el insumo fundamental para afrontar nuevos desafíos climáticos. La variabilidad genética generada por diferencias en la secuencia del DNA (*i.e.* diversidad alélica; Violle et al., 2012) es la principal fuente de variabilidad intraespecífica. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que los mecanismos epigenéticos también contribuyen al origen de esta variabilidad (Medrano et al., 2014; Richards, 2011). La variabilidad fenotípica no asociada a la diversidad alélica es lo que se conoce como variabilidad epigenética.

La metilación de las citosinas es el mecanismo epigenético más estudiado (Richards, 2011). Diversos trabajos han documentado cambios en los patrones de metilación inducidos por el ambiente (Downen et al., 2012; Verhoeven et al., 2010; Verhoeven et al., 2016). También se sugiere que estos efectos inducidos por el ambiente pueden afectar caracteres de importancia ecológica (Cortijo et al., 2014; Cubas et al., 1999; Johannes et al., 2009; Richards, 2011; Zhang et al., 2013).

Diversos estudios en poblaciones naturales se han enfocado en descifrar el rol de la variabilidad epigenética como fuente de diversidad intraespecífica y sus consecuencias ecológicas están siendo consideradas (Alonso et al., 2014;

Kellenberger et al., 2016; Wilschut et al., 2016).

Los diferentes fenotipos que puede expresar un genotipo dado en diversos ambientes es lo que se conoce como plasticidad (Pigliucci, 2005; Schlichting, 1986). En plantas con reproducción asexual, la plasticidad fenotípica le permite a los individuos optimizar su performance para adaptarse a nuevos ambientes (Kooke et al., 2015; Nicotra et al., 2015). Por lo tanto, las especies clonales ofrecen un modelo experimental para estudiar cambios epigenéticos inducidos ambientalmente y su rol en la generación de plasticidad fenotípica.

Uno de los cultivos más importantes para la alimentación humana es la papa, *Solanum tuberosum* L. (FAO, 2014). La misma, presenta cientos de especies silvestres distribuidas a lo largo de los Andes en América (Spooner, 2009). Una de las grandes preguntas a resolver es cómo este grupo de plantas logró adaptarse a ecosistemas tan contrastantes como desiertos, regiones costeras o valles andinos. Diversas investigaciones han evaluado diferentes especies con un amplio número y tipo de marcadores moleculares y han mostrado la falta de correlación entre la variabilidad genética, morfológica y la distribución geográfica; tampoco ha sido exitoso el uso de factores biogeográficos como predictores de la resistencia a pestes y enfermedades (Bedonni & Camadro,

2009; Del Rio et al., 2001; Jansky et al., 2009; McGregor et al., 2002; Spooner, 2009). Estos resultados indican que en adición a la variabilidad genética otros mecanismos estarían operando en la generación de la amplia variabilidad morfológica.

*Solanum kurtzianum* Bitter & Wittm. crece en la región árida del oeste argentino, a lo largo de una transecta de aproximadamente 900 km de extensión y desde los 1082 a los 2490 m s.n.m. (Hijmans, 2002; Marfil et al., 2015). Esta especie perenne ha sido utilizada en programas de mejoramiento de la papa cultivada con éxito (Marfil et al., 2015). La reproducción sexual a través de semillas y la reproducción asexual a través de tubérculos, juegan un rol importante en poblaciones naturales. Por un lado, las semillas permiten el establecimiento de las poblaciones y es fuente de variabilidad genética. Por otro lado, los tubérculos son importantes para el mantenimiento de las poblaciones en diversas condiciones climáticas (Marfil et al., 2015).

El presente trabajo fue realizado con *S. kurtzianum*, especie que crece naturalmente en la Reserva Natural Villavicencio (RNV), Mendoza. El objetivo del trabajo fue evaluar la variabilidad epigenética a través de la metilación del DNA y la variabilidad fenotípica en clones cultivados en sitios de condiciones microclimáticas contrastantes. Para ello, se establecieron dos jardines

experimentales (JE) dentro de la RNV. Uno se localizó a 1141 m s.n.m. (JE1100) y el otro a 2113 m s.n.m. (JE2100).

### Objetivos

- I. Caracterizar la temperatura atmosférica y del suelo y la humedad relativa del aire en los JE ubicados a dos altitudes contrastantes dentro de la RNV.
- II. Analizar la variabilidad epigenética de clones de *S. kurtzianum* cultivados en los JE.
- III. Analizar la variabilidad fenotípica de los clones cultivados en los JE.

### Materiales y Métodos

#### Diseño experimental

Dos JE fueron establecidos dentro de la RNV, Mendoza, Argentina: el JE 1100 localizado a 1141 m s.n.m. (S 32°34'39.57", O 68°56'45.65") y el JE 2100 a 2113 m s.n.m. (S 32°35'6.47", O 69°5'56.85"). En ambos jardines, plantas de tres genotipos (G1, G2 y G3) fueron cultivados desde enero del año 2017 en macetas de 10 L con sustrato enriquecido con materia orgánica y autoclavado para su esterilización. Seis replicas biológicas (i.e. clones obtenidos de tubérculos) por genotipo fueron usados en cada JE (n=6). Los clones fueron distribuidos en cada JE mediante diseño completamente al azar (Ibañez et al., 2017).

#### Extracción de DNA

Para uniformizar un estado fenológico se recolectó hojas apicales seleccionando todas aquellas plantas que

estuvieran florecidas. La extracción de DNA se llevó a cabo de acuerdo al protocolo descrito en Marfil et al. (2009).

### **Variabilidad epigenética**

Se utilizó la técnica MSAP (*Methylation Sensitive Amplification Polymorphism*) para caracterizar la variabilidad epigenética. Brevemente, la técnica evalúa secuencias anónimas del genoma que contienen diferencias en la metilación de las citosinas del sitio de corte de las enzimas *HpaII* y *MspI* (5'-CCGG-3'). El protocolo se realizó de acuerdo a lo descrito por Cara et al. (2014). La reacción de amplificación selectiva se realizó utilizando tres combinaciones de cebadores. Los productos finales de amplificación fueron separados por electroforesis en gel desnaturizante de poliacrilamida al 6% y teñidos con plata siguiendo el protocolo descrito por Benbouza et al. (2006). Para analizar los datos de MSAP, la presencia de fragmentos en *HpaII* indica la metilación de la citosina externa y la presencia en *MspI* indica la metilación en la citosina interna del sitio de corte en ambas cadenas. Mientras que la presencia o ausencia de fragmentos en conjunto indica, ninguna o todas las citosinas metiladas, respectivamente (Salmon et al., 2008).

### **Caracterización del ambiente**

Se registró la temperatura atmosférica y del suelo y la humedad relativa (HR) del aire en cada JE utilizando

sensores *data logger* (iButton Hygrochron, Maxim Integrated, USA).

### **Variabilidad fenotípica**

#### **Morfología foliar**

Se tomó la sexta y séptima hoja de cada planta y mediante fotografías se analizó el área foliar total, área del foliolo terminal y longitud del raquis. Se utilizó el software AxioVison (AxioVision Viewer 4.8, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Alemania). El espesor de las hojas fue estimado a través de la relación entre área y peso de dos discos de hojas. Para ello, se tomaron 2 cm<sup>2</sup> de disco de hojas y se secaron a 40°C hasta peso constante. Se determinó la concentración de compuestos fotoprotectores UVACs (*UV-Absorbing Compounds*) y antocianinas a partir de los disco de hojas, siguiendo el protocolo descrito por Berli et al. (2010).

#### **Tubérculos**

Se cosecharon individualmente los tubérculos de cada una de los clones en el mes de agosto. Fueron conservados hasta octubre a 4 °C. Posteriormente, fueron colocados a 24 °C para registrar el número de tubérculos que rompen dormición y la longitud del brote por medición directa con calibre. Se determinó el número total, el peso total y peso medio de los tubérculos.

#### **Análisis de datos**

#### **Variabilidad epigenética**

Para determinar las relaciones entre los clones de cada JE, se utilizó el análisis de coordenadas principales

(ACoP) con el software InfoStat (InfoStat version 2017 software; Grupo InfoStat, Córdoba, Argentina). Se obtuvieron matrices de distancia utilizando el coeficiente Dice (Marfil et al., 2015; Sneath et al., 1973). El efecto de los JE fue evaluado mediante el análisis de varianza de las matrices de distancia con la función adonis del paquete vegan de R (Oksanen et al., 2018). Esta función permite diferenciar la media de los grupos a través de la partición de las fuentes de variabilidad y con test de permutación, permite obtener la significancia de las particiones.

### **Variabilidad fenotípica**

Para determinar las relaciones entre los clones de cada JE para número de folíolos laterales en la sexta y séptima hoja, espesor foliar, longitud de raquis en la sexta y séptima hoja, peso medio de tubérculos, longitud del brote, porcentaje de tubérculos brotados, número de tubérculos, antocianinas, UVACs y área foliar de la sexta y séptima hoja se realizó un análisis de componentes principales con InfoStat.

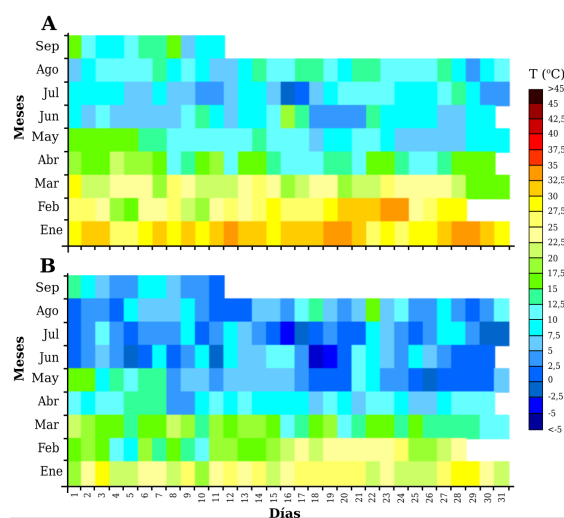
### **Correlaciones**

La correlación lineal entre las matrices de distancia de variabilidad epigenética y variabilidad fenotípica fue evaluada mediante el test de Mantel usando InfoStat

## **Resultados**

### **Variabilidad climática**

La temperatura atmosférica (Fig. 1), humedad relativa (HR; Fig. 2) y temperatura del sustrato (Fig. 3) fueron registrados durante el ciclo de cultivo en cada JE. Desde el comienzo del cultivo hasta la cosecha (enero a septiembre), el JE2100 fue más frío y húmedo que el JE 1100. La temperatura media anual y la HR fue 33% más baja y 17% mayor en el JE2100 respecto a la registrada en el JE1100 (10,6°C y 71% vs 15,9°C y 59,2%, respectivamente).



**Fig. 1. Variabilidad climática entre jardines experimentales (JE) ubicados en un gradiente altitudinal natural.** Temperatura media diaria para A. JE1100 y B. JE 2100.

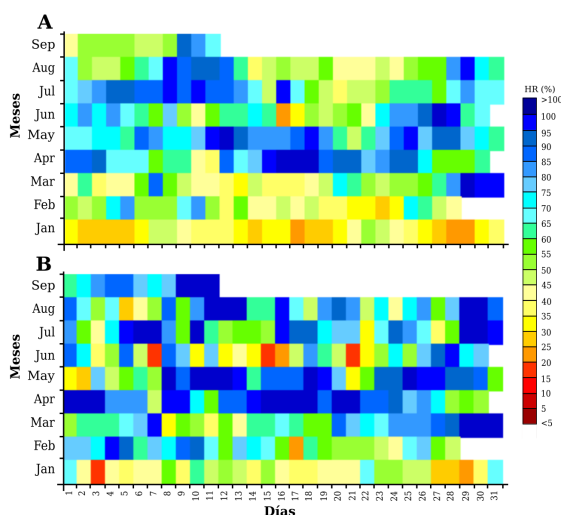
Además, en el periodo vegetativo, entre enero y marzo, el JE1100 fue más cálido y seco. Las diferencias en temperatura fueron 34% mayor respecto al JE2100 (26.1°C vs 19.5°C, respectivamente).

Las diferencias en HR fue 26% menor en el JE1100 que en JE2100 (45% vs 61%, respectivamente). Así mismo, en otoño e invierno se observó la misma tendencia

Universidad Nacional de Cuyo | Mendoza | Argentina

17, 18 y 19 de octubre de 2018

entre JE. La temperatura en JE2100 fue menor a 10°C y la HR mayor al 75% (6.1°C y 76%). Mientras tanto, en JE1100 se observó lo contrario: la temperatura fue mayor a 10°C y la HR menor al 75% (10,8°C y 66%). Las diferencias en temperatura media del suelo fueron similares a las observadas para la temperatura atmosférica (Fig. 3). Desde enero a septiembre las temperaturas del suelo fueron 22.6% mayores en el JE1100 que en el JE2100 (19.5°C vs 15.9°C). Desde el periodo vegetativo entre enero y marzo, las temperaturas fueron 33% mayores en el JE1100 que en el JE2100 (27.5°C vs 20.7°C).

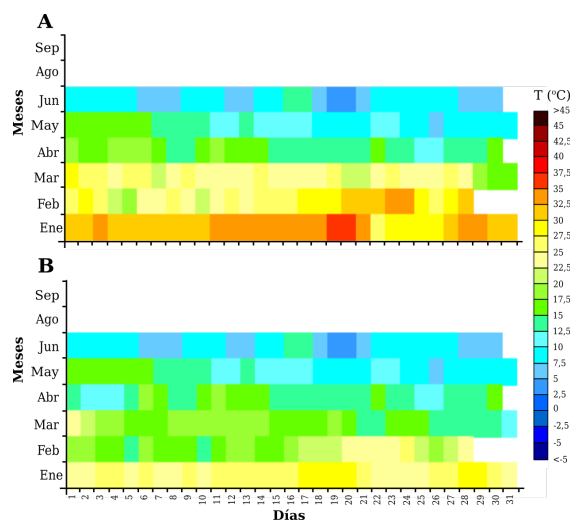


**Fig. 2. Variabilidad climática entre jardines experimentales (JE) ubicados en un gradiente altitudinal natural.** Humedad relativa (HR) media diaria para A, JE1100 y B, JE2100.

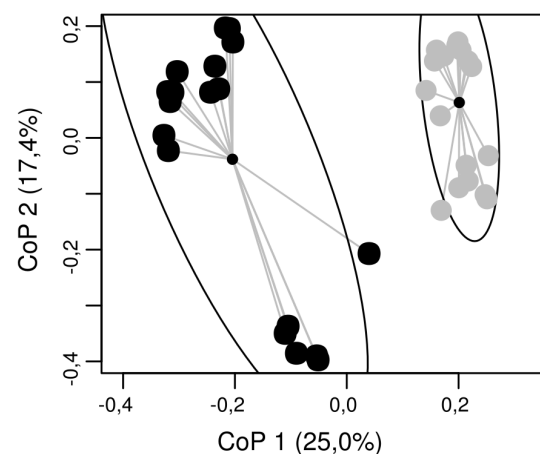
### Variabilidad epigenética

Se establecieron claras diferencias entre genotipos en función del jardín donde fueron cultivados (Fig. 4). Esta tendencia fue confirmada con el análisis

multivariado de la varianza y de la variabilidad total, los JE explican el 23% (p-valor=0,0001).



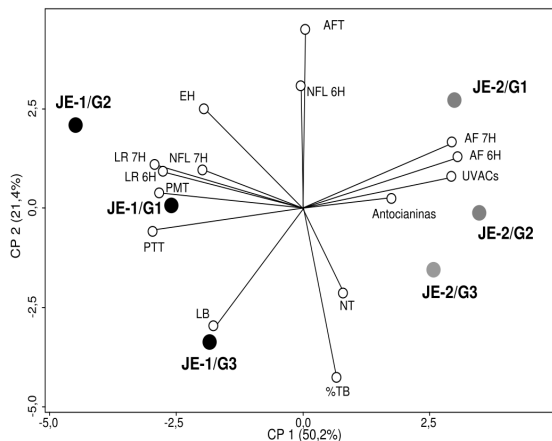
**Fig. 3. Variabilidad climática entre jardines experimentales (JE) ubicados en un gradiente altitudinal natural.** Temperatura del sustrato media diaria para A, JE1100 y B, JE2100.



**Fig. 4. Variabilidad epigenética entre jardines experimentales (JE) ubicados en un gradiente altitudinal natural.** Representación de la variabilidad mediante coordenadas principales de la metilación del DNA basado en la matriz binaria obtenida con marcadores MSAP para el JE1100 (puntos negros) y el JE2100 (puntos grises).

### Variabilidad fenotípica

Se observaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los JE para la longitud del raquis, el número de foliolos laterales en la séptima hoja, en la concentración de UVACs y antocianinas y en la longitud del brote del tubérculo.



**Fig. 5. Variabilidad fenotípica entre jardines experimentales (JE) ubicados en un gradiente altitudinal natural.** Análisis de componentes principales para área foliar total (AFT), número de foliolos laterales en la sexta y séptima hoja (NFL 6H y NFL 7H, respectivamente), espesor foliar (EH), longitud de raquis en la sexta y séptima hoja (LR 6H y LR 7H, respectivamente), peso medio de tubérculos (PMT), longitud del brote (LB), porcentaje de tubérculos brotados (%TB), número de tubérculos (NT), antocianinas, UVACs, área foliar de la sexta y séptima hoja (AF 6H y AF 7H, respectivamente), determinados para tres genotipos (G1, G2 y G3) cultivados en los jardines experimentales JE1100 (JE-1) y JE2100 (JE-2).

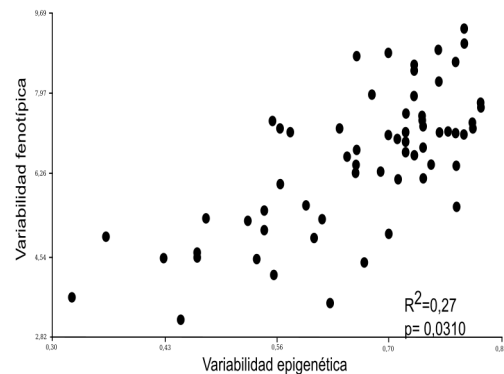
Las plantas cultivadas en el JE2100 presentaron mayor longitud de raquis (8,8 cm vs 7,45 cm), contenido de UVACs ( $0,27 \text{ DO}_{305}\text{cm}^{-2}$  vs  $0,21\text{DO}_{305}\text{cm}^{-2}$ ) y antocianinas ( $0,02 \text{ DO}_{546}\text{cm}^{-2}$  vs

$0,01\text{DO}_{546}\text{cm}^{-2}$ ) y longitud del brote (20 cm vs 10 cm) que los clones cultivados en el JE1100 ( $p < 0,05$ ).

Mediante el análisis de componentes principales (Fig. 5), se observó que el JE1100 estuvo relacionado con mayor espesor de hoja, número de foliolos laterales, longitud del raquis, peso medio y total de tubérculos; mientras que el JE2100 mostró asociación con altos contenidos de UVACs y antocianinas y con mayor área foliar.

### Correlaciones

Se observó asociación positiva entre la variabilidad epigenética y la variabilidad fenotípica (Fig. 6).



**Fig. 6. Análisis de correlación mediante test de Mantel.** Representación de la correlación entre la variabilidad epigenética obtenida mediante el marcadores MSAP y la variabilidad fenotípica observada en clones de 3 genotipos cultivados en el JE1100 y JE2100.

### 4. Discusión

En los últimos años los trabajos han aumentado los estudios acerca de la contribución de los mecanismos

epigenéticos en los rasgos fenotípicos y su relevancia ecológica (Richards et al., 2017). Trabajando en condiciones naturales, en nuestro trabajo observamos respuestas de las plantas a diversos y complejos factores ambientales, respuestas que reflejan mayor realismo ecológico y que podrían diferir si el ensayo se situara en condiciones controladas de laboratorio (Richards 2017).

Con los jardines experimentales hemos mostrado que los clones experimentaron remodelaciones en la metilación del DNA y que, además, mostraron significativos cambios morfológicos en respuesta a los diferencias microclimáticas impuestas por un gradiente altitudinal natural. Los cambios en la metilación fueron inducidos en un periodo de tiempo corto como lo es una temporada de crecimiento. Nuestro resultado concuerda con el obtenido por Gao et al. (2010) en el que trabajando con *Alternanthera philoxeroides* en ambientes naturales y manipulados encontraron una rápida remodelación en la metilación del DNA y del fenotipo en respuesta a dos tratamientos hídricos.

Varios rasgos fenotípicos mostraron plasticidad entre los JE. La temporada de cultivo fue muy cálida y seca, característica muy marcada en el JE de menor altitud (JE1100). En respuesta a ello, en el JE de menor altura se encontraron hojas con gran espesor foliar, rasgo morfológico típicamente asociado

con zonas secas (Coneva & Chitwood, 2018). Además, el JE2100 se asoció con altos contenidos de UVACs y antocianinas, compuestos que colaboran en la aclimatación a condiciones de altitud (Ibañez et al., 2017).

A pesar de las limitantes de nuestro trabajo en tamaño muestral y número de marcadores, hemos encontrado correlación entre la variación en la metilación del DNA y la variación fenotípica. Nicotra et al. (2015) en un experimento con *Wahlenbergia ceracea* evaluaron el posible mecanismo responsable de la plasticidad fenotípica inducida por ambiente. Usando AFLP y MSAP encontraron diferenciación fenotípica significativa a lo largo de un gradiente altitudinal basado en diferencias genéticas pero no epigenéticas.

El presente trabajo en el que estudiamos la variabilidad epigenética y fenotípica inducida por el ambiente en clones, nos permite sugerir que la variabilidad epigenética es un mecanismo importante que permitiría a las poblaciones naturales de *S. kurtzianum* enfrentar con éxito diversos retos ambientes.

### Conclusiones

Las condiciones climáticas en cada JE fueron muy contrastantes en cuanto a temperatura y HR a lo largo del año. Al evaluar clones, se eliminan las diferencias genéticas entre jardines y se puede estimar el rol de la variabilidad epigenética generada por las diferencias



microambientales en el fenotipo. Observamos diferenciación del epigenoma en función del JE en donde se cultivaron los clones. La gran plasticidad fenotípica para los caracteres evaluados sugiere un posible rol de la variabilidad epigenética en la modulación y/u origen de las variantes fenotípicas.

### Financiamiento

Variabilidad genética y epigenética en poblaciones naturales de la especie silvestre de papa *Solanum kurtzianum* distribuidas a lo largo de un gradiente altitudinal". PICT 2014-2016. Director: Carlos Marfil.

### Referencias

Alonso, C., Pérez, R., Bazaga, P., Medrano, M., & Herrera, C. M. (2014). Individual variation in size and fecundity is correlated with differences in global DNA cytosine methylation in the perennial herb *Helleborus foetidus* (Ranunculaceae). *American Journal of Botany*, 101(8), 1309–1313.  
<http://doi.org/10.3732/ajb.1400126>

Bedonni, M. C., & Camadro, E. L. (2009). Morphological and molecular evidence of natural interspecific hybridization in the diploid potato *Solanum kurtzianum* from Argentina. *Botany*, 87(1), 78–87.

Benbouza, H., Jacquemin, J., Baudoin, J., & Mergeai, G. (2006). Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. *Pharmacia*, 10(2), 77–81.  
<http://doi.org/10.1067/mod.2002.129195>

Berli, F. J., Moreno, D., Piccoli, P., Hespanhol-Viana, L., Silva, M. F., Bressan-Smith, R., Bottini, R. (2010). Abscisic acid is involved in the response of grape (*Vitis vinifera* L.) cv. Malbec leaf tissues to ultraviolet-B radiation by enhancing ultraviolet-absorbing compounds, antioxidant enzymes and membrane sterols. *Plant, Cell & Environment*, 33(1), 1–10.

Cara, N., Marfil, C. F., Lampasona, S. C. G., & Masuelli, R. W. (2014). Comparison of two detection systems to reveal AFLP markers in plants. *500*(June), 1–4.  
<http://doi.org/10.1139/cjb-2014-0047>

Cara, N., Marfil, C. F., & Masuelli, R. W. (2013). Epigenetic patterns newly established after interspecific hybridization in natural populations of *Solanum*. *Ecology and Evolution*, 3(11), 3764–3779.  
<http://doi.org/10.1002/ece3.758>

Coneva, V., & Chitwood, D. H. (2018). Genetic and Developmental Basis for Increased Leaf Thickness in the *Arabidopsis Cvi* Ecotype. *Frontiers in Plant Science*, 9(March), 1–10.  
<http://doi.org/10.3389/fpls.2018.00322>

Cortijo, S., Wardenaar, R., Colomé-Tatché, M., Gilly, A., Etcheverry, M., Labadie, K., ... Johannes, F. (2014). Mapping the epigenetic basis of complex traits. *Science*, 343(6175), 1145–1148.  
<http://doi.org/10.1126/science.1248127>

Cubas, P., Vincent, C., & Coen, E. (1999). An epigenetic mutation responsible for natural variation in floral

- symmetry. *Nature*, 401(6749), 157–161. <http://doi.org/10.1038/43657>
- Del Rio, A. H., Bamberg, J. B., Huaman, Z., Salas, A., & Vega, S. E. (2001). Association of ecogeographical variables and RAPD marker variation in wild potato populations of the USA. *Crop Science*, 41(3), 870–878.
- Downen, R. H., Pelizzola, M., Schmitz, R. J., Lister, R., Downen, J. M., Nery, J. R., Ecker, J. R. (2012). Widespread dynamic DNA methylation in response to biotic stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(32), E2183–91. <http://doi.org/10.1073/pnas.1209329109>
- FAO, U. N. (2014). FAOstat. Retrieved Feb, 2014.
- Gao, L., Geng, Y., Li, B., Chen, J., & Yang, J. (2010). Genome-wide DNA methylation alterations of *Alternanthera philoxeroides* in natural and manipulated habitats: Implications for epigenetic regulation of rapid responses to environmental fluctuation and phenotypic variation. *Plant, Cell and Environment*, 33(11), 1820–1827. <http://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2010.02186.x>
- Hijmans, R. J. (2002). *Atlas of wild potatoes* (Vol. 10). Bioversity International.
- Ibañez, V. N., Berli, F. J., Masuelli, R. W., Bottini, R. A., & Marfil, C. F. (2017). Influence of altitude and enhanced ultraviolet-B radiation on tuber production, seed viability, leaf pigments and morphology in the wild potato species *Solanum kurtzianum* Bitter & Wittm collected from an elevational gradient. *Plant Science*, 261(April), 60–68. <http://doi.org/10.1016/j.plantsci.2017.04.014>
- Jansky, A. S. H., Simon, R., Spooner, D. M., & Jansky, S. H. (2009). A Test of Taxonomic Predictivity : Resistance to the Colorado Potato Beetle in Wild Relatives of Cultivated Potato A Test of Taxonomic Predictivity : Resistance to the Colorado Potato Beetle in Wild Relatives of Cultivated Potato. *Journal of Economic Entomology*, 102(1), 422–431.
- Johannes, F., Porcher, E., Teixeira, F. K., Saliba-Colombani, V., Simon, M., Agier, N., ... Colot, V. (2009). Assessing the impact of transgenerational epigenetic variation on complex traits. *PLoS Genetics*, 5(6). <http://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000530>
- Kellenberger, R. T., Schlüter, P. M., & Schiestl, F. P. (2016). Herbivore-Induced DNA demethylation changes floral signalling and attractiveness to pollinators in *brassica rapa*. *PLoS ONE*, 11(11), 1–17. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0166646>
- Kooke, R., Johannes, F., Wardenaar, R., Becker, F., Etcheverry, M., Colot, V., Keurentjes, J. J. B. (2015). Epigenetic Basis of Morphological Variation and Phenotypic Plasticity in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, 27(FEBRUARY), 337–348. <http://doi.org/10.1105/tpc.114.133025>

- Marfil, C. F., Hidalgo, V., & Masuelli, R. W. (2015). In situ conservation of wild potato germplasm in Argentina: Example and possibilities. *Global Ecology and Conservation*, 3, 461–476.
- Marfil, C. F., & Masuelli, R. W. (2014). Reproductive ecology and genetic variability in natural populations of the wild potato, *Solanum kurtzianum*. *Plant Biology*, 16(2), 485–494.
- McGregor, C. E., Van Treuren, R., Hoekstra, R., & Van Hintum, T. J. L. (2002). Analysis of the wild potato germplasm of the series *Acaulia* with AFLPs: Implications for ex situ conservation. *Theoretical and Applied Genetics*, 104(1), 146–156. <http://doi.org/10.1007/s001220200018>
- Medrano, M., Herrera, C. M., & Bazaga, P. (2014). Epigenetic variation predicts regional and local intraspecific functional diversity in a perennial herb. *Molecular Ecology*, 23(20), 4926–4938. <http://doi.org/10.1111/mec.12911>
- Nicotra, A. B., Segal, D. L., Hoyle, G. L., Schrey, A. W., Verhoeven, K. J. F., & Richards, C. L. (2015). Adaptive plasticity and epigenetic variation in response to warming in an Alpine plant. *Ecology and Evolution*, 5(3), 634–647. <http://doi.org/10.1002/ece3.1329>
- Oksanen, J., Blanchet, F. G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P. R., O'hara, R. B., ... Oksanen, M. J. (2018). Vegan: community ecology package. *R Package Version 2*. 4-6. <http://doi.org/10.1093/molbev/msv334>
- Pigliucci, M. (2005). Evolution of phenotypic plasticity: Where are we going now? *Trends in Ecology and Evolution*, 20(9), 481–486. <http://doi.org/10.1016/j.tree.2005.06.001>
- Richards, C. L., Alonso, C., Becker, C., Bossdorf, O., Bucher, E., Colomé-Tatché, M., ... Verhoeven, K. J. F. (2017). Ecological plant epigenetics: Evidence from model and non-model species, and the way forward. *Ecology Letters*, 20(12), 1576–1590. <http://doi.org/10.1111/ele.12858>
- Richards, E. J. (2011). Natural epigenetic variation in plant species: A view from the field. *Current Opinion in Plant Biology*, 14(2), 204–209. <http://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.03.009>
- Salmon, A., Clotault, J., Jenczewski, E., Chable, V., & Manzanares-Dauleux, M. J. (2008). Brassica oleracea displays a high level of DNA methylation polymorphism. *Plant Science*, 174(1), 61–70. <http://doi.org/10.1016/j.plantsci.2007.09.012>
- Schlichting, C. D. (1986). The evolution of phenotypic plasticity in plants. *Ann Rev Ecol Syst* 17:667-693, (143).
- Sneath, P. H. A., Sokal, R. R., & others. (1973). *Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification*.
- Spooner, D. M. (2009). Dna barcoding will frequently fail in complicated groups: An example in wild potatoes. *American Journal of Botany*, 96(6), 1177–1189. <http://doi.org/10.3732/ajb.0800246>

Verhoeven, K. J. F., Jansen, J. J., van Dijk, P. J., & Biere, A. (2010). Stress-induced DNA methylation changes and their heritability in asexual dandelions. *New Phytologist*, 185(4), 1108–1118.

<http://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.03121.x>

Verhoeven, K. J. F., VonHoldt, B. M., & Sork, V. L. (2016). Epigenetics in ecology and evolution: What we know and what we need to know. *Molecular Ecology*, 25(8), 1631–1638.

<http://doi.org/10.1111/mec.13617>

Violle, C., Enquist, B. J., McGill, B. J., Jiang, L., Albert, C. H., Hulshof, C., Messier, J. (2012). The return of the variance: Intraspecific variability in community ecology. *Trends in Ecology and Evolution*, 27(4), 244–252.

<http://doi.org/10.1016/j.tree.2011.11.014>

Wilschut, R. A., Oplaat, C., Snoek, L. B., Kirschner, J., & Verhoeven, K. J. F. (2016). Natural epigenetic variation contributes to heritable flowering divergence in a widespread asexual dandelion lineage. *Molecular Ecology*, 25(8), 1759–1768.

<http://doi.org/10.1111/mec.13502>

Zhang, Y. Y., Fischer, M., Colot, V., & Bossdorf, O. (2013). Epigenetic variation creates potential for evolution of plant phenotypic plasticity. *New Phytologist*, 197(1), 314–322.

<http://doi.org/10.1111/nph.12010>