

Mendelova univerzita v Brně  
Lesnická a dřevařská fakulta  
Ústav lesnické botaniky, dendrologie a geobiocenologie

**Hybridizace v rámci rodu *Carex* a způsoby jejího testování**

Disertační práce

## Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci: „Hybridizace v rámci rodu *Carex* a způsoby jejího testování“ vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Nesouhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v plném rozsahu v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou *Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

Jsem si vědoma, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně dne:.....

.....

podpis

## PODĚKOVÁNÍ

Zpracovaná disertační práce byla finančně podpořena z prostředků specifického vysokoškolského výzkumu prostřednictvím projektu IGA LDF č. 11/2013 a LDF\_VP\_2015024.

Své poděkování chci také věnovat Dr. Ing. Jaroslavu Mráčkovi za podporu v doktorském studiu, kolegům, které se podílely na mém profesním rozvoji a rodině za morální podporu.

**Petra Veselá**

**Název:** Hybridizace v rámci rodu *Carex* a způsoby jejího testování

### **Abstrakt**

K objasnění široké škály přírodních vztahů, jak vnitrodruhových, tak i mezidruhových, může skvěle posloužit rod *Carex*. Jedná se o největší rod čeledi Cyperaceae a jeden z celosvětově nejrozšířenějších rodů, který je také zajímavý několika specifickými rysy. Kromě již zmíněné druhové diverzity je pro tento rod charakteristická značná vnitrodruhová variabilita a také relativně častá hybridizace. Dále jsou to cytogenetická specifika jako je přítomnost holocentrických chromozomů, což je spojeno s agmatoploidií a symploidií či invertovaná meióza.

Cílem této práce bylo objasnit příčiny morfologické variability několika domnělých hybridních jedinců vzniklých křížením různých kombinací parentálních druhů pomocí molekulárních markerů. Jako vhodné markery byly zvoleny AFLP a mikrosatelitové markery, neboť mají dostatečnou rozlišovací schopnost mezi blízkce příbuznými druhy a vysokou informační hodnotu. Mezi analyzované kombinace rodičovských druhů byly *C. flacca* subsp. *flacca* a *C. tomentosa*, *C. acutiformis* a *C. nigra*, *C. caryophyllea* a *C. fritschi*, *C. paniculata* a *C. echinata*, *C. paniculata* a *C. appropinquata*. Ve většině případů bylo dosaženo značné genetické diferenciace mezi páry taxonů zjištěné pomocí Neiových genetických vzdáleností, ale výjimku tvořila kombinace *C. paniculata* a *C. appropinquata*, což mohlo být zapříčiněno velmi blízkým vztahem těchto taxonů. Nicméně z těchto pěti kombinací byla pouze u *C. paniculata* × *echinata* detekována genetická intermediárnost na základě molekulárních markerů. Získané výsledky na jednu stranu poukazují na přítomnost mezidruhové hybridizace u některých kombinací. Ale na stranu druhou, domnělá morfologická intermediárnost mezi dvěma druhy může být připsána dosud nedetekované vnitrodruhové morfologické variabilitě. Tato práce dokládá značný význam, a to nejenom ve sporných případech, molekulárních markerů, které dokáží ozřejmit genetické pozadí těchto taxonů.

**Klíčová slova:** AFLP, *Carex*, hybridizace, mikrosatelitové markery

**Title:** Hybridisation within the genus *Carex* and the methods for its testing

**Abstract**

To clarify the wide range of natural relationships, intra- as well as interspecific, may serve the genus *Carex*. It is the largest genus of the family Cyperaceae and one of the most widespread genera worldwide, which is also interesting several specific features. Instead the above mentioned species diversity, it is for the genus characteristic considerable intraspecific variability and relatively frequent hybridization. Furthermore, there are also cytogenetic features, such as the presence of holocentric chromosomes, which is associated with agmatoploidy and symplody or inverted meiosis.

The aim of this study was to clarify the causes of morphological variability of several putative hybrids resulting from cross of different combinations of the parental taxa using molecular markers. As suitable markers were chosen AFLP and microsatellite markers, because they have sufficient resolution power between closely related species and also high information value. Among the analysed combinations of parental species were *C. flacca* subsp. *flacca* and *C. tomentosa*, *C. acutiformis* and *C. nigra*, *C. caryophyllea* and *C. fritschii*, *C. paniculata* and *C. echinata*, *C. paniculata* and *C. appropinquata*. In most cases, it was achieved significant genetic differentiation between taxon pairs according to Nei's genetic distances, with the exception of combination *C. paniculata* and *C. appropinquata*, which could be due to the very close relationship of these taxa. However, from these five combinations it was only in *C. paniculata* × *echinata* detected genetic intermediary based on molecular markers. The obtained results indicated the presence of interspecific hybridization. On the other hand, putative morphological intermediary between two species can be ascribed to the yet undetected intraspecific morphological variability. This work also gives the evidence of considerable importance of molecular markers that can elucidate the genetic background of these taxa.

**Keywords:** AFLP, *Carex*, hybridisation, microsatellite markers

## **OBSAH**

1. ÚVOD.....	1
2. CÍLE PRÁCE .....	2
3. STRUKTURA PRÁCE .....	3
4. ÚVOD DO PROBLEMATIKY .....	4
4.2 Hybridizace u rostlin.....	4
4.3 Rod <i>Carex</i> a jeho obecné vymezení .....	8
4.4 Markery.....	22
4.4.1 Polymorfnní náhodně amplifikovaná DNA (RAPD).....	24
4.4.2 Polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů (AFLP).....	25
4.4.3 Mikrosatelitové markery .....	26
5. LITERATURA .....	28

## **Přílohy**

I. Optimisation of AFLP for extremely large genomes over 70 Gb

II. Are there hybrids between *Carex flacca* and *C. tomentosa* in the Czech Republic and Slovakia?

III. Morphological and genetic variation of several putative *Carex* hybrids

# 1. ÚVOD

Molekulární biologie představuje dynamicky se rozvíjející vědní obor a nachází široké spektrum uplatnění při řešení nejrůznějších problematik. Význam molekulární biologie se stále zvyšuje a její využití ve stále větší míře přesahuje do řady jiných disciplín, jako jsou například medicína či zemědělství a lesnictví. Potřeba analýzy stále větších objemů dat současně při stále se rozšiřujícím poli působnosti vedou nejen k vývoji nových metod zpracování a analýzy dat, jaké představují například metody NGS (Next Generation Sequencing). Na stranu druhou své uplatnění nacházejí i metody konvenční, jakými je sekvenování jednotlivých lokusů, nebo například metoda AFLP, která představuje metodu takřka univerzální a navíc využitelnou i pro druhy, u nichž nejsou prozatím k dispozici specifické DNA markery (Vos et al. 1995; Qi a Lindhout, 1997).

Tato práce je zaměřená na využití molekulárních markerů při determinace mezidruhově hybridizace v rodu *Carex*, neboť právě pro tento rod je hybridizace relativně často popisovaným jevem (Ford et al. 1993; Smith a Waterway, 2008; Volkova et al. 2008; Korpelainen et al. 2010), ale nemalá část publikací se opírá pouze o markery morfologické (Catling, 1993; Blackstock a Ashton, 2010; Wieclaw a Koopman, 2013; Bergeron a Pellerin, 2014; Wieclaw a Wilhelm, 2014) a jak je patrné z výsledků této i dalších prací (Escudero et al. 2014, Řepka et al. 2014), nevede tento postup vždy ke správným závěrům. Na základě těchto indicií je možné předpokládat, že hybridizace v rámci rodu *Carex* je nadhodnocená a naopak podhodnocená je vnitrodruhoví variabilita taxonů. Část práce je také věnována optimalizaci AFLP, která – ač s četným uplatněním – má také své nedostatky, jakým je například velikostní homoplasie.

## 2. CÍLE PRÁCE

Rod *Carex* je charakteristický značnou vnitrodruhovou variabilitou a relativně častou hybridizací a tyto vlastnosti dále komplikují determinaci a taxonomickou klasifikaci. Cílem této práce bylo objasnit genetické pozadí morfologické variability několika domnělých hybridních jedinců rodu *Carex* pomocí vhodných molekulárních markerů.

Další část práce řeší podrobně problematiku metody AFLP, která byla s úspěchem použita pro detekci hybridizace v rodu *Carex*. Cílem bylo objasnit hlavní faktory ovlivňující velikostní homoplazii u AFLP a následně navrhnout optimalizaci pro její redukci, zejména u druhů s extrémně velkým genomem.



### 3. STRUKTURA PRÁCE

Disertační práce je zpracována formou souboru publikací v anglickém jazyce, který je doplněn o české kapitoly podávající podrobný úvod vztahující se k problematice předkládaných článků.

U publikací s prvním autorstvím jsem realizovala experimentální části, podílela se značnou měrou na analýze dat a také psaní manuskriptů. U publikace, v níž jsem uvedena, jako druhý autor jsem se podílela na zpracování a analýze části molekulárních dat (Tab. 1).

Tab. 1: Přehled publikací uvedených v disertační práci

Název publikace	Typ	Periodikum	Stav	Autorský podíl
<i>Optimisation of AFLP for extremely large genomes over 70 Gb</i>	článek v odborném periodiku	<i>Molecular Ecology Resources</i> (in press)	přijato do tisku	Veselá, P. (60 %) Volařík, D. Mráček, J.
<i>Are there hybrids between Carex flacca and C. tomentosa in the Czech Republic and Slovakia?</i>	článek v odborném periodiku	<i>Preslia</i> 2014, 86: 367-379	publikováno	Řepka, R. Veselá, P. (15 %) Mráček, J.
<i>Morphological and genetic variation of several putative Carex hybrids</i>	článek v odborném periodiku		manuskript v přípravě	Veselá, P. (80%) Řepka, R. Mráček, J.

## 4. ÚVOD DO PROBLEMATIKY

### 4.2 Hybridizace u rostlin

Hybridizace a introgrese jsou běžné procesy u rostlin (Mallet, 2005), mající velký význam v jejich speciaci (Barton, 2001). Procento rostlinných druhů, které hybridizují s druhy dalšími se odhaduje na 3 – 25 %, přičemž frekvence mezidruhov<sup>é</sup> hybridizace je ovlivněna pre- a postzygotickými izolačními mechanizmy. Sterilita hybridů je běžnou formou postzygotické reprodukční izolace redukující tok genů mezi různými populacemi, čímž může přispívat k formování druhů (Yakimowski a Rieseberg, 2014). Reprodukční izolace může usnadnit akumulaci genetických diferencí mezi skupinami populací, čímž se vyostřují hranice mezi nimi a umožňuje adaptivním znakům, aby se přiblížily jejich optimálnímu fitness. Jakákoliv redukce v efektivní míře migrace usnadňuje divergenci. Ačkoli individuální reprodukční bariéry mohou vznikat rychle, většina rostlinných druhů zůstává separovaná četnými bariérami, což naznačuje, že kompletní speciace typicky vyžaduje mnoho tisíc generací. Plně izolované polyploidní druhy mohou vznikat v jedné či dvou generacích, a diploidní nebo homoploidní hybridní druhy mohou dosáhnout izolace v méně než 60 generacích. Vnitřní postzygotická izolace může být zapříčiněna chromozomovými přestavbami anebo změnami v genech (Rieseberg a Willis, 2007). Chromozomové přestavby, duplikace/delece chromozomových segmentů a posuny v ploidii přispívají k adaptaci, umožňují změny fenotypu a fitness jedince (Otto, 2007), redukují tok genů a tím usnadňují speciaci (Rieseberg, 2001; Livingstone a Rieseberg, 2008). Chromozomové přestavby také přispívají ke sterilitě hybridních rostlin, které poté často obnovují fertilitu duplikací chromozomů. Na stranu druhou, mikrochromozomální přestavby mohou vést k inkompatibilitě hybridů bez ztráty fitness. Chromozomové přestavby jsou snáze stabilizovány, čím je jejich vliv na fitness hybrida menší. Na stranu druhou, nepřispívají v takové míře k reprodukční izolaci (Rieseberg a Willis, 2007).

Rostliny jsou oproti živočichům více benevolentní ke genetickým změnám většího rozsahu, jaké plynou z hybridizace či polyploidie (Mallet, 2005). Přirozená hybridizace podporuje adaptaci, speciaci a je důležitým zdrojem genetické variability díky novým kombinacím příznivých genů (Paun et al. 2007). Introgrese může umožnit vznik adaptivních kombinací ve větší míře, než bez ní (Mallet, 2005). Paun et al. (2009) napsali, že hybridizace se jeví jako stimulant speciace u rostlin: kombinace různých genomů

v hybridních liniích má značné evoluční a ekologické důsledky a potenciálně usnadňuje evoluční inovaci a adaptivní radiaci.

Speciace může probíhat dvěma cestami. Jednou je homoploidní hybridní speciace, při níž nedochází ke změně ploidie a další cestou alopolyploidní hybridní speciace se změnou ploidie. Nově utváření hybridů se stávají pravými druhy, jakmile se stanou reprodukčně izolováni a udrží si svoji identitu (Paun et al. 2007). Pokud je divergence páru rodičovských druhů větší než 3/4 průměru v daném rodu, hybridizace pravděpodobně ústí ve zvýšení ploidie. Rodiče alopolyploidů vykazují v průměru více jak dvakrát větší divergenci, než rodiče homoploidních hybridů (Paun et al. 2009).

Alopolyploidní hybridní speciace je častější než homoploidní, což je částečně zapříčiněno reprodukční izolací mezi hybridními jedinci a rodičovskými druhy (Yakimowski a Rieseberg, 2014). Krytosemenné rostliny prošly několika koly polyploidizačních událostí v průběhu evoluce a i diploidní rostlinné genomy stále nesou důkazy těchto událostí. Paleopolyploidi pravděpodobně obnovovali fertilitu a stabilitu během několika generací díky chromozomovým přestavbám a diploidizaci. Duplikace genomu byla stěžejní pro tvorbu řady důležitých vývojových a regulačních genů nalezených v genomech krytosemenných rostlin a mohla mít významnou roli při diverzifikaci kvetoucích rostlin (Paun et al. 2007). Bylo navrženo, že polyploidie se v minulosti vyskytla u 50 – 70 % kvetoucích rostlin, což naznačuje, že 100 % krytosemenných jsou paleopolyploidi (Otto, 2007) a více jak 70 % existujících kvetoucích rostlinných druhů jsou v současnosti polyploidi. Předpokládá se, že krytosemenné rostliny pocházejí z polyploidního předka a jsou paleopolyploidi (Paun et al. 2009).

Spojené genomy u polyploidů obvykle čelí komplikovanému procesu reorganizace před plnou stabilizací (Otto, 2007; Paun et al. 2009). Mezi tyto přestavby patří chromozomové přestavby v rámci parentálních genomů, ztráta low-copy DNA sekvencí, epigenetické vlivy na expresi duplikovaných genů a aktivace transpozibilních elementů. Takové změny genomu mají také potenciál indukovat nové expresní vzory, což spolu s permanentní heterozygotitou a genovou redundancí, může ústít ve výrazný posun morfologie, ekologické tolerance a ve vysokou evoluční flexibilitu (Paun et al. 2009). Transpozibilní elementy, které jsou potlačeny u každé parentální linie, ale aktivovány u hybridů, mohou usnadnit pohyb genů a podpořit nerovnoměrný crossing-over. Změnou genomického kontextu genů, může reorganizace genomu zvýšit genetickou variabilitu dostupnou nově zformovaným polyploidním populacím. Polyploidi navíc často vykazují změny v genové expresi, které jsou mimořádně individuální a pletivově specifické (Otto,

2007). Homeologní genové kopie sdílené parentálními genomy mohou vést ke genovému umlčení a jejich ztrátě v průběhu času. Duplikované geny jsou pouze zřídka exprimovány v téže úrovni, což ústí v nestejnou expresi nebo dokonce epigenetické umlčení jedné kopie (Paun et al. 2007). Polyploidie mění také strukturální vztah mezi jistými buněčnými komponentami a tyto efekty mohou modifikovat genovou expresi skrze reversibilní regulaci nebo stálý epigenetický restart. Jedním z těchto efektů je změna dávky faktorů, které jsou kódovány chromozomy mající odlišný počet kopií než diploidní. Další je efekt epigenetických remodelačních mechanismů na nespárované chromatinové regiony. Tyto epigenetické vlivy mohou zvýšit diverzitu a plasticitu či heterozii a tím přispět k adaptivnímu potenciálu polyploidů (Comai, 2005).

Stabilizace polyploidní linie nezávisí pouze na stochastických událostech, jako je dostupnost vhodného prostředí, ale také na míře životaschopnosti, fertilitě, heterozygositě a fitness. Fertilita alopolyploidů může být zvýšena parentální divergencí, kvůli menšímu množství meiotických abnormalit. Očekává se, že také heterozygositě, mající za důsledek heterozii, obvykle poskytuje vyšší fitness a adaptivní potenciál, skrze zvýšený potenciál prostorových, časových a funkčních změn genové exprese. Extenzivní změny v genové expresi se jeví, že jsou spouštěny hybridizací spíše než polyploidii (Paun et al. 2009). Polyploidní taxony jsou také snáze stabilizovány umožněním korektního párování chromozomů a tím snazšímu překonání počáteční sterility (Paun et al. 2007). Vynucené párování homologních chromozomů u alopolyploidů brání intergenomické rekombinaci a efektivně udržuje stejnou úroveň heterozygosity napříč generacemi (Comai, 2005). Na fenotypové úrovni jsou vlivy polyploidizace často mírné a individuální. Velikost buňky obecně stoupá se zvyšující se velikostí genomu, nicméně patrně vykazují nižší růstovou míru a díky tomu pomalejší vývoj, což ovšem není obecně platný vzor a může být revertován (Otto, 2007). Alopolyploidii mohou dosáhnout výsledků podobných transgresivní segregaci skrze delecii méně adaptivních nebo špatně adaptivních lokusů a postupná diploidizace jim umožňuje obývat stanoviště nedostupná jejich rodičům (Paun et al. 2007; Otto, 2007). Adaptování polyploidii nastupují evoluční trajektorii diploidizace, během které je redukována genomická redundance (Comai, 2005).

Dlouhodobý osud polyploidní linie závisí na jejich schopnosti se adaptovat. Jedním z benefitů je zvýšený počet genových kopií, které mohou skrývat prospěšné mutace. Na straně druhé mohou vykazovat vyšší úroveň segregačních chyb kvůli duplikaci centromery. Genová exprese se také může lišit mezi homeology, dokonce mezi nově zformovanými alopolyploidy a také mezi pletivy. Selektce obecně zachovává obě genové

kopie, ale každá může mít odlišnou funkci, tedy procházejí subfunkcionalizací a neofunkcionalizací (Otto, 2007).

Homoploidní hybridní speciace je méně častá a časné generace mívají silně redukovanou fitness v důsledku selekce eliminující inkompatibilitu. Duplikace genomu chrání genetickou integritu nově odvozených polyploidů, nicméně takové bariéry nechrání homoploidní hybridy od zpětného křížení s parentálními druhy. Homoploidní hybridy se mohou stát reprodukčně izolovanými rychlou evolucí karyotypu, ekologickou divergencí či prostorovou izolací nové hybridní linie (Rieseberg a Willis, 2007). Diploidní hybridní druhy mohou být schopné si ponechat různé části parentálních genomů, což může umožnit vznik různých jedinců týž rodičů (Rieseberg, 1995). Tvorba homoploidních hybridů je přímo limitována silou a povahou reprodukční izolace mezi páry druhů. Pravděpodobnost produkce diploidního hybrida je nejvyšší, jestliže je parentální divergence menší nebo rovna polovině průměru v rodu. Další vliv mají také genová anebo chromozomová inkompatibilita. Na stranu druhou, se zvyšující genomovou divergencí rychle klesá fertilita (Paun et al. 2009). V 79 % případů homoploidní hybridní speciace je stanoviště hybridních druhů odlišné od stanoviště druhů rodičovských, což patrně také přispívá k reprodukční izolaci (Yakimowski a Rieseberg, 2014).

Aby byli homoploidní hybridy evolučně úspěšnější, fertilní a astabilní, musí být reprodukčně izolovaní od rodičovských druhů, buď genetickými, nebo chromozomálními faktory sterility, nebo prezygotickými izolačními bariérami (Paun et al. 2009).

K hybridní speciaci může spíše docházet, je-li zkombinována s polyploidí, což vede ke tvorbě hybridů s vysokým stupněm postzygotické reprodukční izolace od jejich předků (Paun et al. 2009). Alopolyloidní speciace se u rostlin vyskytuje v míře zhruba 2 – 4 % případů speciace, zatímco případy homoploidní hybridní speciace se v tak časté míře nevyskytují (Mallet, 2005).

Jak bylo zmíněno výše, hybridizace a introgrese jsou jevy vcelku běžné u rostlin, nicméně co se týká jejich morfologického vzezření, nemusejí být hybridní jedinci a tím více introgresanti morfologicky intermediární. Introgresanti navíc často bývají v přírodě obtížně morfologicky odlišitelní od rodičovských druhů (Mallet, 2005; Rieseberg a Ellstrand, 1993 z přehledu Rieseberg, 1995). Hybridní jedinci vykazují jak znaky intermediární, tak znaky parentální, ale i extrémní či nové znaky. V první generaci hybridů bylo detekováno 10 % extrémních znaků, zatímco v další generaci tato hodnota převýšila 30 % (Rieseberg, 1995). Dále mohou kombinovat znaky obou rodičů a/nebo vykazovat transgresivní znaky, které jim umožní ekologickou specifičnost (Paun et al. 2009). Expres

znaků také závisí na povaze genetické kontroly a interakci s prostředím. Na speciaci hybridů má také vliv selfing; samosprašné druhy produkují vyšší úroveň transgresivních znaků, pravděpodobně kvůli vyšší úrovni fixovaných diferencí nezbytných pro komplementární genovou akci, díky čemuž jsou tyto linie predisponované k hybridní speciaci. Co se týká fitness hybridů, to je velmi variabilní a ve většině případů podmíněno genotypem a vlivy prostředí. K izolaci hybridů od parentálních druhů přispívají chromozomové přestavby, genová inkompatibilita a také bariéry hybridní sterility. Všechny tyto faktory mají za následek evoluční nezávislost hybridů (Yakimowski a Rieseberg, 2014).

Hybridizace se také může podílet na ekologické divergenci, která je za normálních podmínek obtížná, jelikož vyžaduje změnu několika znaků a právě díky hybridizaci mohou být tyto obtíže překonány (Paun et al. 2007).

### **4.3 Rod *Carex* a jeho obecné vymezení**

Rod *Carex* je sám o sobě pozoruhodný kvůli řadě specifických aspektů. V první řadě se jedná o jeho nesmírnou druhovou diverzitu, neboť tento rod má více než 2000 zástupců rozšířených po celém světě. Dalšími rysy charakterizujícími tento rod je značná vnitrodruhová variabilita a relativně častá hybridizace. Dále jsou to také cytogenetické odlišnosti, které dělají tento rod zajímavým. Především se jedná o přítomnost holocentrických chromozomů, což je spojeno s agmatoploidíí a symplodií či invertovaná meióza. Obtížná taxonomická klasifikace je dána redukovánými květy a morfologickou podobností řady druhů.

Jak již bylo zmíněno, hybridizace je v tomto rodě relativně častým fenoménem, ale na stranu druhou počáteční snahy podchytit tuto problematiku se opíraly zejména o morfologické markery a jak také naznačují naše výsledky uvedené níže, ne vždy je morfologická intermediárnost nebo kombinace znaků více druhů zárukou hybridizace.

Rod *Carex* je největším rodem čeledi Cyperaceae a jedním z celosvětově nejrozšířenějších rodů s těžištěm rozšíření v mírném pásmu obou polokoulí a horských polohách tropických oblastí (Reznicek, 1990). Původ tribu *Cariceae*, a patrně i rodu *Carex*, se datuje alespoň do období třetihor, což je odvozováno areálem jeho rozšíření; tribus *Cariceae* se vyvinul v horských mokřinách tropů a subtropů, odkud se rozšířil dále do pásma temperátního a

boreálního (Reznicek, 1990). Ve velké většině se jedná o bylinné anemofilní rostliny vyznačující se mimořádnou diverzitou a značnou aneuploidií, obývající exponovaná stanoviště a různé biogeografické vzory (Starr a Ford, 2009). Řada zástupců tohoto rodu náleží k ekologicky významným součástem řady rostlinných společenstev, jakými jsou lužní lesy, stepní společenstva, alpské louky, rašeliniště, bažinné lesy a řada dalších rostlinných společenstev (Hipp et al. 2006).

Rod *Carex* se taxonomicky řadí do oddělení rostlin krytosemenných, třídy jednoděložných, řádu lipnicotvarých a čeledi šachorovitých, podčeleď Caricoideae a tribu Cariceae. Tribus Cariceae, do kterého náleží i rod *Carex*, je charakterizován uniformními, jednopohlavnými květy, kde samičí jsou obklopeny částečně či zcela uzavřeným perigyniem. Konkrétně rod *Carex* má perigynium zcela uzavřené a pouze u podrodu *Vignea* se na perigyniu nachází abaxiální falešný šev. Květenství rodu *Carex* je vysoce variabilní, pouze několik druhů má solitérní androgynické klasy (Reznicek, 1990).

Rod *Carex* je členěn do tří podrodů, z velké části je toto členění založeno právě na struktuře květenství. Těmito podrody jsou *Carex*, *Vignea* a *Indocarex*. Z těchto podrodů pouze podrod *Vignea*, který má mezi 400 – 500 druhů výrazně zastoupenými v severní i jižní Americe a také temperátní a boreální oblasti Eurasie, je uznán jako monofyletický (Reznicek, 1990; Hendrichs et al 2004b; Ford et al. 2006; Starr a Ford, 2009). Tento podrod je morfologicky charakterizován chybějícím kladoprofylem, většinou oboupohlavnými, přisedlými klasy a obvykle dvěma, vzácně třemi bliznami (Hendrichs et al. 2004b) – pouze tři druhy tohoto podrodu mají tři blizny (Starr a Ford, 2009). Podrod *Carex* čítá okolo 1400 druhů zastoupených v celé oblasti rozšíření rodu a vyznačuje se rozmanitou morfologií, zejména co se týká variability utváření květenství. Tento podrod je charakterizován přítomností kladoprofylu a obvykle jednopohlavnými klasy, mající dvě nebo tři blizny (Yen a Olmstead, 2000). Podrod *Indocarex* zahrnuje okolo 100 převážně tropických a subtropických druhů (Reznicek, 1990) a je charakterizován přítomností kladoprofylu a výrazně větvenými, oboupohlavnými klasy s květy se třemi bliznami (Yen a Olmstead, 2000) a sekundárními a terciárními květními agregacemi s profylem (Starr a Ford, 2009). Něktými autory je tento podrod považován za součást podrodu *Carex*, jak například naznačují výsledky Hendrich et al. (2004a), kde v jejich taxonomickém zpracování na základě molekulárních markerů nedošlo k oddělení druhů *C. polystachya* a *C. filicina* od zástupců podrodu *Carex*. Nicméně vzhledem k použití pouze dvou jedinců tohoto podrodu doporučují rozsáhlejší sběr vzorků pro potvrzení této hypotézy. Stejněho výsledku, jako Hendrich et al. (2004a), nicméně dosáhli také Yen a Olmstead (2000)

s využitím molekulárních markerů a obdobných výsledků také Starr a Ford (2009) a Roalson et al. (2001).

Většina druhů rodu *Carex* jsou samosprašné, často autogamní a opylení větrem je nejčastější způsob opylení a vzhledem k tomu, že některé druhy, jako *C. backii* nebo *C. abscondita* mají květenství uzavřené, je u nich pravděpodobná vysoká úroveň selfingu (Catling et al. 1990).

Taxonomická klasifikace rodu *Carex* je složitá z řady důvodů a pokusy o její komplexní pojetí a rozřazení druhů do jednotlivých sekcí, případně členění do podrodů, s výjimkou podrodu *Vignea*, který je řadou molekulárních studií deklarován jako monofyletický, není stále dosaženo. Skutečnosti komplikující klasifikaci rodu *Carex* jsou kromě nesmírné druhové diverzity také morfologická podobnost řady druhů a jejich odlišování na základě velmi jemných morfologických nuancí (Cattling et al. 1990; Reznicek, 1990). Dalším rysem jsou redukované květy (Reznicek, 1990) a také značná vnitrodruhová variabilita (Stenström et al. 2001; Košnar et al. 2012) a relativně častá hybridizace, týkající se zejména určitých sekcí, jmenovitě *Ceratocystis*, *Phacocystis*, *Vesicariae* v rámci podrodu *Carex* a *Heleonastes*, *Vulpinae*, *Heleoglochin* u podrodu *Vignea* (Wieclaw a Wilhelm, 2014). Méně častá je také hybridizace mezi druhy náležejícími k různým sekcím (Wronska-Pilarek et al. 2010).

Kromě výše zmíněného se tento rod vyznačuje také řadou cytogenetických specifíků, mezi které patří že: (i) tři ze čtyř jader vznikajících při meiotickém dělení zanikají, (ii) invertovaná meióza, (iii) holocentrické chromozomy podporující tvorbu aneuploidních sérií skrze jejich fúzi, štěpení a přestavby (Escudero a Luceño, 2009).

Holocentrické chromozomy jsou také označovány jako polycentrické či mající difúzní centromeru (Hipp et al. 2009) a jejich přítomnost je spojena s agmatoploidií a symploidií (Luceño and Guerra, 1996), kdy v důsledku těchto jevů dochází ke štěpení a fúzím chromozomů ústící ve změny chromozomového čísla (Hipp et al. 2009) bez podstatných změn obsahu DNA (Roalson et al. 2007). Tyto změny mohou vést ke vzniku životaschopných gamet s aneuploidním počtem chromozomů, které mohou být stabilizovány skrze zpětné křížení nebo samosprašení (Hipp et al. 2009, Escudero et al. 2010). Jako důsledek všech těchto událostí jsou velké rozdíly vnitro- i mezidruhové variability chromozomového čísla (Escudero et al. 2013), nabývající rozpětí od  $n = 6$  do  $n = 66$  (Tanaka, 1949), což může ovlivnit vnitrodruhovou variabilitu a následně speciaci v rámci rodu *Carex* (Hipp et al. 2009; Escudero et al. 2010). Na straně druhé, polyploidie



je u zástupců rodu *Carex* mnohem méně častým jevem (Lipnerová et al. 2013), kde nejlépe charakterizovaným polyploidním druhem je *C. siderosticta*, u níž byl prokázán dvojnásobný počet chromozomů a dvakrát tak velký genom než u *C. ciliato-marginata* (Roalson et al. 2007). Rotreklová et al. (2011) ve své studii dále poukázali na možný výskyt polyploidie v sekci *Digitatae*, kde *C. macroura* pocházející z České republiky vykazovala diploidní počet chromozomů  $2n = 70$ , tedy dvakrát tak velké chromozomové číslo, oproti ruskému nálezu  $2n = 35$ . Kromě toho ovšem poukázali také na fakt, že pro podrody *Vignea* i *Carex* je u některých druhů typická stabilita chromozomového čísla, např. *C. brizoides* či *C. capitata* u podrodu *Vignea* a *C. adelostoma* či *C. alba* z podrodu *Carex* a dále na možný vztah mezi hybridizací a vnitrodruhovou variabilitou chromozomového čísla (Rotreklová et al. 2011). Lipnerová et al. (2013) detekovali, kromě několika polyploidních jedinců, také pozoruhodný vztah mezi velikostí genomu dvoudomých druhů podrodu *Vignea* a jejich jednodomými příbuznými, kdy tyto dvoudomé druhy měly větší genom a kromě toho detekovaly i neobvykle velký pár chromozomů u dvoudomé *C. davalliana*. Kromě autopolyploidních druhů byly popsány i druhy alopolyploidní, kde jedním z těchto případů je *C. bonpladii* komplex (*C. roraimensis* – *C. bonpladii*), který patrně reprezentuje alopolyploidní linii. *C. roraimensis* má jedno z nejvyšších chromozomových čísel rodu, čítající  $n = 62$ , které představuje nejvyšší euploidní chromozomové číslo známé pro tento rod. Hybridní původ tohoto taxonu, s jedním z rodičů náležejícím k sekci *Stellulatae* a druhým sekci *Ovales*, byl podpořen jak molekulárními daty, tak morfologickými znaky (Hipp et al. 2006). Na opačném pólu, co se chromozomového čísla týká, se nachází *C. siderosticta* s  $n = 6$ , která spolu s dalšími zástupci sekce *Siderostictae*, zaujala sesterskou pozici ke zbytku rodu *Carex* (Waterway et al. 2009) a podpořila tímto hypotézu, že reprezentuje ancestrální typ tohoto rodu (Löve et al. 1957 uvedeno v přehledu Hipp et al. 2009). Oproti tomuto tvrzení ovšem stojí výzkum Roalson et al. (2001), ve kterém jako pravděpodobného ancestrálního jedince tribu *Cariceae* navrhli druh se středním až vysokým chromozomovým číslem na základě předpokladu, že se fúze může vyskytovat se stejnou frekvencí nebo i častěji než štěpení. Fakt, že polyploidizace není častým jevem v rodu *Carex*, byl podpořen i studií Roalson et al. (2007), ve které na stranu druhou byla výše zmiňovaná *C. siderosticta* detekována jako polyploidní s  $n = 12$  a tedy počtem chromozomů dvakrát tak velkým.

Agmatoploidie je tedy primárním mechanismem chromozomových přestaveb u ostřic, při kterém nedochází ke zvyšování obsahu DNA, ovšem dle Roalson et al. (2007) s narůstajícím chromozomovým číslem se naopak může velikost genomu snižovat, což

může být dáno tím, že při štěpení může docházet ke ztrátám segmentu zlomového bodu DNA před novým koncem chromozomu. Negativní korelace mezi velikostí genomu a chromozomovým číslem byla detekována také ve studii Lipnerová et al. (2013), ve které poukázali na to, že může docházet ke ztrátám zlomených chromozomových konců před obnovením nově zformovaných telomerických regionů.

Evoluce chromozomů je tedy realizována různými mechanismy, kde agmatoploidie hraje významnou roli, přičemž chromozomové číslo se mění zvyšováním i snižováním (Hipp et al. 2009) a potenciálně může hrát významnou roli v reprodukční izolaci populací a následné speciace rostlin (Hipp, 2007). Tato hypotéza byla ovšem následně vyvrácena Hipp et al. (2010), kteří poukázali na to, že pouze přestavby nejsou pravděpodobně schopné řídit speciaci u ostřic. Nicméně, na základě deklarované korelace mezi genetickou vzdáleností a rozdíly chromozomového čísla, bylo poukázáno na to, že čím jsou tyto rozdíly větší, tím větší jsou bariéry pro genový tok mezi populacemi (Hipp et al. 2010). Chromozomové rasy v rámci druhu mohou vznikat nebo se může jednat o kryptické druhy, nicméně nedokazují, zda změny chromozomového čísla předcházejí nebo následují divergenci populací (Hipp et al. 2009).

Zatímco rozdíly chromozomového čísla zahrnující menší množství přestaveb mají minimální efekt, rozdíly zahrnující větší množství přestaveb mohou redukovat schopnost různých populací se křížit (Luceño a Castroviejo, 1991) a mohou zvýšit potenciál dát vzniku nového druhu (Hipp, 2007; Escudero et al. 2010). Jestliže rozdíly mezi populacemi spočívají v jednotlivé fúzi či štěpení, poté párování chromozomů mezi F1 mezipopulačními hybridy může ústit ve tvorbu heteromorfních trivalentů, které představují malé či žádné překážky pro rekombinaci (Hipp, 2007). Chromozomové přestavby postupně narůstají s věkem populace, tedy starší druhy mohou být motory speciace u ostřic (Escudero et al. 2010). Podobných závěrů bylo dosaženo i kolektivem autorů Rieseberg et al. (1995), kteří při studii strukturních rozdílů chromozomů na genový transfer mezi *Helianthus annuus* a *H. petiolaris* detekovali, že introgrese chromozomových částí podrobených přestavbě probíhá s podstatně nižší frekvencí. Nicméně strukturální změny chromozomů a chromozomového čísla nemusejí být přímo zodpovědné za reprodukční izolaci mezi populacemi, která dle Escudero et al. (2013) je spíše zapříčiněna vzdáleností mezi nimi. Na straně druhé, tyto změny redukovují genový tok a umožňují tyto změny fixovat v populaci (Rieseberg, 2001).

Jak bylo zmíněno výše, dalším rysem rodu *Carex* je výrazná vnitrodruhová variabilita a relativně častá hybridizace, což se týká zejména určitých sekcí. Tato morfologická variabilita může být způsobena jednak genotypovou diferenciací nebo fenotypovou plasticitou. Rostliny obecně vykazují schopnost u jednotlivých genotypů produkovat různé, funkčně vhodné fenotypy v rozdílných prostředích, tedy vykazují adaptivní fenotypovou plasticitu, která spočívá ve změnách anatomických i morfologických znaků (Sultan, 1995). Plastické odpovědi jsou indukovány spacio-temporálními změnami faktorů prostředí, které jsou často zpracovávány a vyjadřovány v semiautonomních strukturálních a funkčních podjednotkách rostliny a tyto semiautonomní jednotky rostliny mohou vzájemně interagovat (Kroon et al. 2005). Vzhledem k faktu, že rostliny nemají možnost uniknout z místa svého výskytu, vyvinula se u nich značná adaptabilita, která jim umožňuje vypořádat se změnami abiotických i biotických faktorů, přičemž tyto odpovědi jsou rychlé a specifické pro jednotlivé znaky (Sultan, 1995). Stenström et al. (2002) zase poukázali na fakt, že míra genotypové diferenciaci vzrůstá s délkou izolace populací a také mezi geograficky vzdálenými populacemi. Stenström et al. (2001) poukázali, že možné příčiny genetické variability a klonální diverzity několika druhů rodu *Carex* může být zapříčiněna kromě environmentálních faktorů také areálem geografického rozšíření či způsobem opylení. Mimo vysoké genetické variability detekovali také vysokou úroveň klonální diverzity, které jsou kromě výše zmíněných faktorů také ovlivněny přítomností jiného taxonu na dané lokalitě a tedy možnou hybridizací. Vliv přítomnosti jiného taxonu na zvýšení variability trsnaté ostřice *C. sempervirens* doložil i Yu et al. (2006) a jako možné vysvětlení uvedli, že trsy mohou pocházet z různých semenáčků, k čemuž může docházet obklopením semenáčku či malého trsu větším rozrůstajícím se. Podobně i Stenström et al. (2002) detekovali výrazné mezipopulační morfologické difference mezi studovanými taxony rodu *Carex*, které byly nejvíce ovlivněny zeměpisnou šířkou a cyklickým přemnožováním hlodavců. Potvrdili pozitivní korelaci mezi morfologickou, geografickou a genetickou vzdáleností rostlin a výrazné plastické změny v reakci na prostředí, které potvrdili transplantačními experimenty, kdy došlo ke snížení rozsahu morfologické variability. Lech Urbanek (1998) propojil morfologické difference plev *C. ligerica* s geografickou distribucí populací a jako možnou příčinu uvedl odlišné migrační dráhy, což v souvislosti s geografickou vzdáleností může být příčinou zamezení toku genů.

Studiem morfologické variability v rámci rodu *Carex* se zabývala řada autorských kolektivů. Například Košnar et al. (2012) sledovali vliv různé délky zaplavení na růstovou formu a utváření kořenového systému *C. nigra*, které spočívají v kvantitativních rozdílech

počtu a délky rhizomů. Zatímco permanentní zaplavení zapříčinilo proliferaci kořenového systému, trsnatý růst představoval adaptivní reakci na ohrožení náhlým zaplavením a tyto změny pravděpodobně představují adaptivní odpovědi na podmínky prostředí. Nicméně u jedné populace, rostoucí v nejdrsnějších klimatických podmínkách, byla zjištěna možná genetická podmíněnost, kdy došlo k selekci jedinců směrem k trsnatému morfotypu. Trvalé či přechodné zaplavení mělo u *C. flacca* vliv na tvorbu adventivních kořenů a také změny v koncentracích manganu a železa v pletivech kořenů a zvýšený transport manganu do stonku, nicméně nemělo vliv na biomasu rostlin (Heathcote et al. 1987). Podmínky prostředí ovlivnily i růst ramet *C. physodes* a došlo také ke zvyšování morfologické plasticity kvantitativních znaků v příznivějších podmínkách. Tato morfologická plasticita tedy umožňuje klonálním rostlinám se přizpůsobit heterogenním podmínkám prostředí (Abudurehman et al. 2014).

Prostředí různým způsobem ovlivňuje různé rostlinné orgány a každý z nich projevuje odlišnou míru variability u různých druhů. Bugg et al. (2013) studovali vnitrodruhovou variabilitu několika parametrů listů různých druhů rodu *Carex* a zjistili, že tyto anatomické znaky vykazovaly nízkou variabilitu. Míra variability se ovšem lišila u různých parametrů, některé byly i uniformní, ale na straně druhé např. přítomnost průduchů na adaxiálním povrchu vykazovala významné ovlivnění prostředím. Vztahem anatomických znaků listů k orografickým, geologickým a bioklimatickým podmínkám se zabývali i Jakovljevic et al. (2014), kterým se nepodařilo nalézt jednoznačný trend, podle kterého by listy reagovaly na zmíněné proměnné, což je zapříčiněno širokou ekologickou tolerancí, která vede k vývoji určitých vlastností vykazujících značnou vnitro- i mezipopulační variabilitu.

Z výše uvedených studií vyplývá, že různé taxony rodu *Carex* se s různou intenzitou vyrovnávají s měnícími se podmínkami prostředí a právě tato fenotypová plasticita či genotypová variabilita umožňuje jedincům téhož druhu osidlovat stanoviště s různými podmínkami.

Mimo genetické variability a fenotypové plasticity se u různých druhů rodu *Carex* uplatňují i jiné procesy, jakými jsou hybridizace či introgresivní hybridizace (Choler et al. 2003; Blackstock a Ashton, 2010; Escudero et al. 2014), které hybridním jedincům umožňují osidlovat odlišné biotopy než jejich rodiče a často se jedná o intermediární stanoviště (Choler et al. 2003).

Celosvětově byla popsána řada mezidruhových hybridů, například Koopmen (2011) uvedl 300 hybridů nacházejících se v Evropě. Na Britských ostrovech bylo identifikováno více než 40 mezidruhových hybridů (Jermy et al. 2007).

Ford et al. (1993) se zabývali hybridizací v rámci sekce *Vesicariae*. V této studii se pokusili ověřit hybridní původ morfologicky intermediárních jedinců, kde jedním ze studovaných taxonů byla *C. paludivagans*, u níž potvrdili, že se jedná o částečně fertillního hybrida mezi *C. rotundata* a *C. utriculata*. Dalšími studovanými taxony byly *C. stenolepis*, *C. grahamii*, *C. mainensis*, představující sterilní, hybridní jedince mezi *C. vesicaria* a *C. saxatilis*. Z dalších lze uvést *C. ×physocarpoides* jako hybridní taxon mezi *C. saxatilis* a *C. utriculata*, taktéž sterilní. Současně také uvažovali o možném zpětném křížení, driftu či selekci směrem k jednomu z rodičů, neboť hybridní taxony nebyly přesně intermediární.

Ve studii Volkova et al. (2008) se zabývali genetickou a morfologickou variabilitou několika domnělých hybridních jedinců a jejich rodičů (*C. aquatilis*, *C. paleacea* a *C. subspathacea*). Na základě analýzy AFLP a morfologických dat došlo k potvrzení jejich hypotéze o hybridním původu a dále detekovali výrazný tok genů v celé skupině *C. salina* na poloostrově Kola. Jedinci označení jako *C. recta* coll. představují heterogenní, polyfyletickou skupinu (odvozenou buď z křížení mezi *C. aquatilis* a *C. paleacea*, nebo *C. aquatilis* a *C. salina*), geneticky velmi podobnou a morfologicky neodlišitelnou od jedinců označených jako *C. salina*. Ta patrně představuje hybridní shluk mezi *C. subspathacea* a *C. recta* s. str. a vykazuje obdobnou heterogenitu jako *C. recta* coll. Celou problematiku této skupiny dále komplikuje pravděpodobné zpětné křížení a přítomnost hybridních jedinců v různém stupni stabilizace.

Bergeron a Pellerin (2014) identifikovali a verifikovali výskyt sterilního hybridního jedince na základě intermediárních morfologických znaků mezi *C. comosa* (*Vesicariae*) a *C. lupulina* (*Lupulinae*) nazývaného *C. ×cayouettei*. Tímto nálezem také potvrdili spřízněnost těchto dvou sekcí, jak již byla například detekována ve studii Hendrichs et al. (2004a).

Jedním z velmi složitých uskupení taxonů v rámci rodu *Carex*, je *C. flava* agg. Tato skupina se vyznačuje morfologickou variabilitou, nejasnými hranicemi mezi druhy a častou hybridizací (Wieclaw, 2014). Hybridizací taxonů v rámci této skupiny se zabývali Wieclaw a Wilhelm (2014), kteří zjistili, že kromě morfologicky intermediárních jedinců, se také jejich morfologie může více blížit jednomu z rodičů a navíc mohou mít i unikátní znaky. *C. ×alsatica* (hybrid mezi *C. flava* a *C. demissa*), kromě kompletní sterility, vykazovala znaky intermediární nebo více podobné *C. flava*. Podobný trend se projevil i u

*C. ×ruedtii* (*C. flava* × *C. lepidocarpa*), morfologicky intermediární nebo podobnější *C. lepidocarpa*, což může být dáno zpětným křížením s tímto rodičem, který byl navíc na dané lokalitě přítomen v převaze. Navíc kromě kompletně sterilních jedinců se vyskytovali i jedinci s mošničkami a zralými nažkami. Obdobně na tom byla i *C. ×schatzii*, kde kromě intermediárních jedinců, byli přítomni i jedinci morfologicky bližší *C. lepidocarpa*, což naznačovalo introgresi směrem k *C. lepidocarpa*. Podobně jako u předešlého i u *C. ×schatzii* byli přítomni fertilní jedinci. Hybridy *C. demissa* × *C. viridula* byli částečně fertilní a morfologicky podobní *C. demissa*, několik jedinců vykazovalo navíc několik extrémních znaků. Z těchto výsledků vyplývá, že v rámci skupina *C. flava* agg. probíhá neustálý tok genů nejen mezi „čistými druhy“, ale také introgresivní hybridizací mezi hybridními jedinci a jejich rodiči.

Dalšími autory, zabývajícími se touto problematikou, byli Wieclaw a Koopman (2013), kteří detekovali hybridizaci *C. hostiana*, ze sekce *Ceratocystis*, se třemi druhy rodu *Carex* na základě morfologických znaků. Prvním analyzovaným hybridním jedincem byla *C. ×xanthocarpa*, vzniklá křížením *C. hostiana* a *C. flava*, jejíž morfologické znaky byly intermediárními, nebo se vzhledem více podobala *C. hostiana*. Další hybridní jedinci vznikly křížením *C. hostiana* × *lepidocarpa* (*C. ×leutzii*), morfologicky velmi podobní *C. hostiana* a *C. demissa* × *hostiana* (*C. ×fulva*), se znaky intermediárními nebo podobnější *C. demissa*. Jedním z rysů těchto hybridních jedinců byla také jejich sterilita.

Hybridizaci v *C. complanata* komplexu studovali Smith a Waterway (2008). V první řadě potvrdili rozdílnost druhů *C. complanata*, *C. hirsutella*, *C. bushii*, *C. caroliniana* na základě molekulárních, morfologických nebo fenologických dat. *C. complanata* × *C. oxylepis* byl jedním z hybridních vzorků, zjevně sterilní a morfologicky intermediární mezi předpokládanými rodiči. Hybridní status tohoto jedince byl podpořen i molekulárními daty, stejně jako u dalších hybridních jedinců *C. swanii* × *C. complanata* a *C. bushii* × *C. swanii*. U jedinců *C. caroliniana* × *C. hirsutella* a *C. bushii* × *C. hirsutella* se autoři přiklonili k introgresi směrem k *C. hirsutella*, neboť jedinci byli sice morfologicky intermediární, nicméně AFLP data poukázala na spřízněnost s *C. hirsutella*. Všechny tyto hybridní exempláře jsou ovšem velmi vzácné a navíc sterilní.

Dalšími studovanými mezidruhovými hybridy byli *C. aquatilis* × *recta*, *C. paleacea* × *recta* a *C. recta* (*C. aquatilis* × *C. paleacea*) mající překrývající areál rozšíření. Hybridní původ byl potvrzen u *C. recta*, nicméně částečně unikátní alelické složení *C. paleacea* × *recta* naznačuje ještě i přítomnost odlišného zdroje genetické materiálu (Korpelainen et al.

2010). Dalšími autory, kteří popsali mezidruhového hybridního jedince mezi *Carex canescens* × *mackenziei* (*C. ×pseudohelvola*) byli autoři Carlsson et al. (2011).

Hybridní jedinci jsou při terénním průzkumu identifikováni na základě morfologické intermediárnosti mezi dvěma domnělými rodičovskými druhy, nebo na základě kombinace znaků sdílených od obou rodičovských druhů. Nicméně i hybridní jedinec často vykazuje unikátní znaky nepřítomné u obou rodičů (Rieseberg, 1995; Wieclaw a Wilhelm, 2014) a dalšími jevy komplikujícími identifikaci hybridních jedinců, jak již bylo popsáno výše, je také introgrese nebo doba která uplynula od hybridizační události. Tímto jevem se zabývali v práci Choler et al. (2003), kteří studovali introgresi u *C. curvula* subsp. *curvula* a *C. curvula* subsp. *rosae*. Genetická diferenciace mezi těmito poddruhy je připisována geografické či reprodukční izolaci, která omezila tok genů mezi nimi, nicméně u okrajových populací těchto dvou poddruhů byla detekována introgrese na základě AFLP markerů. Zjistili, že počáteční hybridizace byla následována opakovaným zpětným křížením preferenčně s jedním rodičem. Navíc tyto stabilizované introgresanti se vyskytovali v ekologicky intermediárních stanovištích. K obdobným závěrům dospěli také Escudero et al. (2014), kteří dokázali introgresivní hybridizaci mezi druhy sekce *Ovales*, *C. suberecta* a *C. scoparia*. Jejich zjištění byla podpořena, stejně jako u předešlých autorů, překrývajícím se areálem těchto druhů. V této studii dále poukázali na to, že hybridizační události mají pouze lokální výskyt, nebo jsou nedávné a celkově hodnotí hybridizaci v sekci *Ovales* jako nadhodnocenou. Introgresivní hybridizace byla zjištěna i u hybridních jedinců mezi *C. lepidocarpa* a *C. flava*, kdy tyto jedinci vykazovali morfologické znaky *C. lepidocarpa*, nicméně některé alozymy náležely *C. flava*. Na základě těchto výsledků došli k závěru, že po iniciální hybridizaci následovalo zpětné křížení s *C. lepidocarpa* (Blackstock a Ashton, 2010).

Na základě uvedených dat není vždy snadné identifikovat hybridnost jedinců či dokonce jejich přesné druhové zařazení. Morfologické znaky nemusejí korelovat se znaky genetickými, neboť na oba soubory dat působí jiné selekční tlaky. Míra genetické variability přítomná v populacích se liší mezi molekulárními markery a kvantitativními znaky, neboť vlastnosti ovlivněné více lokusy mají vyšší mutační vstup. Fenotypová variabilita navíc závisí na prostředí, zatímco genetické markery nikoli. Reed a Frankham (2001) zjistili, že molekulární markery vysvětlují pouze 4 % variability kvantitativních znaků a je tedy mezi nimi slabá korelace. Fakt, že kombinace morfologických znaků více taxonů, eventuálně domnělá morfologická intermediárnost, nemusí poukazovat na

hybridizační událost, dokládají také výsledky Řepka et al. (2014), kteří poukazují právě na tento nesoulad mezi morfologickými charakteristikami a molekulárními markery u čtyř domnělých hybridních jedinců mezi *C. flacca* subsp. *flacca* a *C. tomentosa*. Jedinci vykazující kombinaci znaků mezi jmenovanými parentálními druhy, byli na základě AFLP dat neoddělitelní od *C. flacca*. Také další výsledky vycházející ze studie čtyř kombinací parentálních taxonů a domnělých hybridních druhů (Veselá et al. v přípravě), detailně popsané níže, poukazují na skutečnost, že příčiny morfologické variability mohou, ale nemusí poukazovat na hybridizační událost.

Těmito parentálními druhy jsou *C. paniculata* a *C. echinata*, *C. paniculata* a *C. appropinquata*, *C. caryophylla* a *C. fritschii*, *C. acutiformis* a *C. nigra* a domnělí hybridní jedinci mezi těmito rodičovskými druhy. Předpokládání hybridní jedinci byli identifikováni na základě morfologické intermediárnosti, případně charakterizování kombinací znaků zděděných od domnělých rodičů a rezultat jejich původu byl stanoven na základě výsledků kombinace morfologických a molekulárních markerů, konkrétně AFLP a mikrosatelitových dat.

U *C. acutiformis* a *C. nigra* a jejich domnělého hybrida, AFLP analýzou bylo detekováno 176 lokusů, z nichž bylo 147 polymorfních; 1 lokus byl specifický pro domnělého hybridního jedince, 35 lokusů bylo sdíleno s *C. acutiformis* a pouze 1 s *C. nigra*. Počet detekovaných alel pěti analyzovaných mikrosatelitových lokusů, se pohyboval od sedmi do devíti (Tab. 2) a žádná z detekovaných alel nebyla specifická pro domnělého hybridního jedince, naopak všechny byly shodné s *C. acutiformis*.

U kombinace *C. paniculata* a *C. echinata* bylo detekováno 163 AFLP lokusů, z nichž 139 bylo polymorfních a 6 bylo specifických pro domnělého hybridního jedince. Domnělý hybrid sdílel 25 lokusů s *C. paniculata* a 42 s *C. echinata*. U mikrosatelitových dat bylo analyzováno 5 lokusů a detekováno od jedné do šesti alel (Tab. 2). Žádná z alel nebyla specifická pro domnělého hybrida a s výjimkou jediného lokusu, který byl monomorfní, byla vždy přítomna jedna alela od každého z rodičů.

U parentálních druhů *C. paniculata* a *C. appropinquata* a domnělého hybridního jedince bylo detekováno 114 lokusů, z nichž 77 bylo polymorfních a žádný specifický pro domnělého hybrida. 6 lokusů bylo sdíleno pouze s *C. appropinquata* a 1 s *C. paniculata*. Mikrosatelitových lokusů bylo analyzováno šest s celkovým počtem alel od jedné do pěti



alel a žádná z nich nebyla specifická pro domnělého hybridu. Alelické složení taxonů je uvedeno v Tab. 2.

U kombinace *C. caryophyllea* a *C. fritschii* byly analyzovány dva vzorky, označené *C. x moravica1* a *C. x moravica2*. U AFLP dat bylo detekováno 95 lokusů, z nichž 75 bylo polymorfních, a v případě *C. x moravica1* bylo 27 lokusů sdílených s *C. caryophyllea* a dva byly specifické pro domnělého hybridu, žádný z lokusů nebyl sdílen s *C. fritschii*. V případě *C. x moravica2* bylo pět lokusů sdíleno s *C. caryophyllea* a sedm *C. fritschii*, jeden byl specifický pro domnělého hybridu. U mikrosatelitových dat bylo analyzováno pět lokusů a detekováno od dvou do devíti alel. Nicméně výsledky nebyly jednoznačné, u většiny mikrosatelitových lokusů byly alely detekované u hybridů specifické. Podrobné alelické složení je uvedeno v Tab. 2.

Tab. 2: Alelická kompozice taxonů a domnělých hybridních jedinců

	CM01	Cko1-9	Cko2-139	Cko1-47	Cko1-11	Cko2-112	CM35
<i>C. acutiformis</i>	<b>261, 267, 274</b>	216, <b>217</b>	258, <b>259</b>	<b>143</b>	<b>216, 218, 223, 263</b>		
<i>C. nigra</i>	249, 259, 264, 282, 286	166, 205, 208, 209, 211, 212, 216, 223	209, 247, 249, 251, 253, 254, 258	141, 148, 150, 154, 156, 160	186, 190, 191, 194		
<i>C. acutiformis</i> × <i>nigra</i>	<b>261, 274</b>	<b>217</b>	<b>259</b>	<b>143</b>	<b>216, 218</b>		
<i>C. paniculata</i>	<b>217, 222, 224</b>	<b>213</b>	<b>255</b>			<b>206, 227</b>	<b>192</b>
<i>C. echinata</i>	231, <b>233</b>	168, 189, 215, 219, <b>221</b>	210, 231, 258, 261, <b>263</b>			<b>231</b>	<b>192</b>
<i>C. paniculata</i> × <i>echinata</i>	<b>217, 233</b>	<b>213, 221</b>	<b>255, 263</b>			<b>206, 231</b>	<b>192</b>
<i>C. paniculata</i>	217, 222, <b>224</b>	<b>213</b>	<b>255</b>		<b>188, 190, 207, 209, 215</b>	206, 227	<b>192</b>
<i>C. appropinquata</i>	<b>224</b>	211, <b>213</b>	253, <b>255</b>		<b>188</b>	<b>241</b>	<b>192</b>
<i>C. paniculata</i> × <i>appropinquata</i>	<b>224</b>	<b>213</b>	<b>255</b>		<b>188</b>	<b>228, 241</b>	<b>192</b>
<i>C. caryophyllea</i>	270, <b>273, 274, 276</b>	213, 221, 223	255, 263, 265			217, 225, 227, 239	<b>204</b>
<i>C. fritschii</i>	<b>273, 276, 279, 288</b>	203, 204, 210	245, 246, 251, 252			213, <b>216</b>	195
<i>C. ×moravica</i> 1	<b>273, 276</b>	<u>211</u>	<u>253</u>			<u>221, 222</u>	<b>204</b>
<i>C. ×moravica</i> 2	<u>255, 279</u>	<u>202</u>	<u>244</u>			<b>216, 218</b>	<b>204</b>

Výsledky analýzy molekulární variance (AMOVA) pro všechny studované parentální kombinace a jejich domnělé hybridní jedince jsou shrnuty v Tab. 3. Procento molekulární variance udává příspěvek vnitro- a mezipopulační variability u mikrosatelitových a AFLP dat. U většiny kombinací byla detekována vyšší genetická diverzita mezi populacemi, nicméně příspěvek vnitropopulační variability též není nezanedbatelný.

Tab. 3: Procenta molekulární variance v rámci populací a mezi populacemi

	Procenta molekulární variance			
	Uvnitř populací		Mezi populacemi	
	AFLP	mikrosatelity	AFLP	mikrosatelity
pa, ec, pc × ec	19	49	81	51
ac, ni ac × ni	36	53	64	47
ca, fr, moravica	24	33	76	67
pa, ap, pa × ap	39	46	61	54

pa = *C. panicullata*, ec = *C. echinata*, pc x ec = *C. paniculata* x *echinata*, ac = *C. acutiformis*, ni = *C. nigra*, ac x ni = *C. acutiformis* x *nigra*, ca = *C. caryophyllea*, fr = *C. fritschii*, moravica = *C. x moravica*, ap = *C. appropinquata*, pa x ap = *C. paniculata* x *appropinquata*

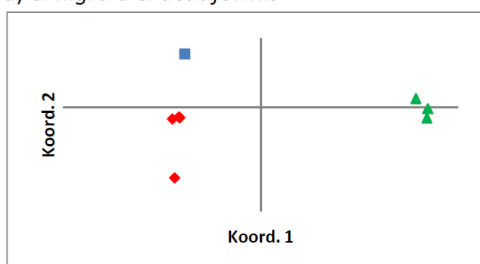
Neiova genetická vzdálenost mezi páry taxonů se pohybuje ve značném rozmezí (Tab. 4), s výjimkou *C. acutiformis* a domnělého hybridu, kde byla pro AFLP data získána hodnota 0,101 a pro *C. caryophyllea* a *C. x moravica* byla dle AFLP dat detekována hodnota 0,133. Ještě bližší vzdálenost byla zjištěna mezi *C. appropinquata* a domnělého hybridu, kde se hodnoty pohybovaly 0,064 pro AFLP data a 0,028 pro mikrosatelity. S výjimkou kombinace *C. appropinquata* a *C. paniculata* byla genetická vzdálenost podle Neie téměř vždy výrazně vyšší pro mikrosatelitová data oproti AFLP datům.

Tab. 4: Neiovy genetické vzdálenosti pro páry taxonů

		Neiovy genetické vzdálenosti	
		AFLP	mikrosatelity
<i>C. paniculata</i>	<i>C. paniculata</i> × <i>echinata</i>	0,563	0,293
<i>C. paniculata</i>	<i>C. echinata</i>	0,754	1,268
<i>C. paniculata</i> × <i>echinata</i>	<i>C. echinata</i>	0,372	0,416
<i>C. acutiformis</i>	<i>C. acutiformis</i> × <i>nigra</i>	0,101	0,577
<i>C. acutiformis</i>	<i>C. nigra</i>	0,518	2,158
<i>C. acutiformis</i> × <i>nigra</i>	<i>C. nigra</i>	0,541	x
<i>C. fritschii</i>	<i>C. ×moravica2</i>	0,228	2,333
<i>C. fritschii</i>	<i>C. ×moravica1</i>	0,597	2,151
<i>C. ×moravica2</i>	<i>C. ×moravica1</i>	0,547	1,386
<i>C. fritschii</i>	<i>C. caryophyllea</i>	0,480	2,720
<i>C. ×moravica2</i>	<i>C. caryophyllea</i>	0,440	1,176
<i>C. ×moravica1</i>	<i>C. caryophyllea</i>	0,133	1,004
<i>C. paniculata</i>	<i>C. paniculata</i> × <i>appropin.</i>	0,407	0,381
<i>C. paniculata</i>	<i>C. appropinquata</i>	0,362	0,373
<i>C. paniculata</i> × <i>appropin.</i>	<i>C. appropinquata</i>	0,064	0,028

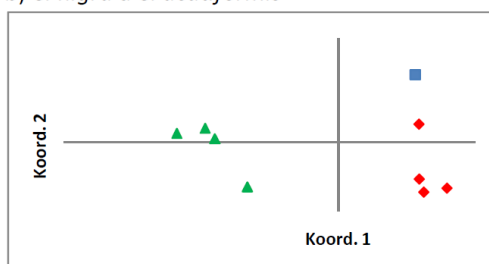
Grafické znázornění genetických vztahů mezi všemi jedinci jednotlivých kombinací je vyobrazeno na PCoA grafu, data byla zpracována zvlášť pro AFLP a mikrosatelitové markery (Obr. 1a-h). Z těchto ordinačních grafů jsou patrné vzájemné vzdálenosti odrážející vztahy mezi jedinci na základě molekulárních dat charakterizujících jejich genotypy. A také je patrná vzájemná podpora obou typů dat.

a) *C. nigra* a *C. acutiformis*

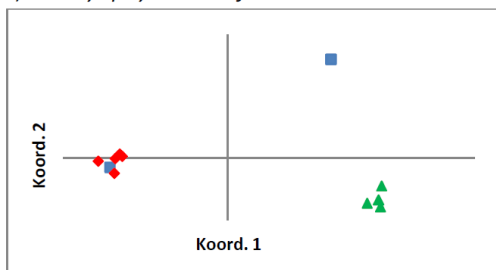


▲ *C. nigra* ◆ *C. acutiformis* ■ *C. acutiformis* x *nigra*

b) *C. nigra* a *C. acutiformis*

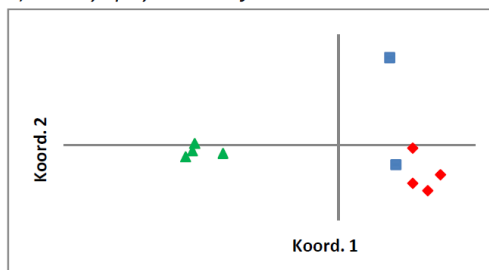


c) *C. caryophyllea* a *C. fritschii*

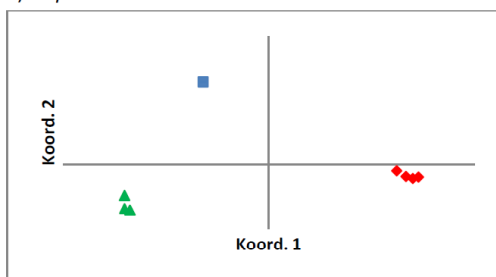


▲ *C. fritschii* ◆ *C. caryophyllea* ■ *C. x moravica*

d) *C. caryophyllea* a *C. fritschii*

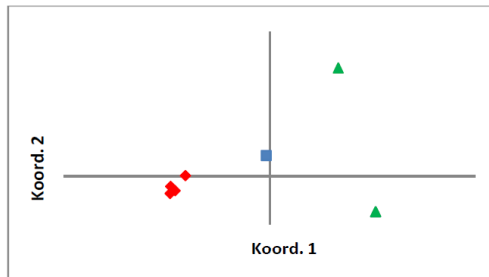


e) *C. paniculata* a *C. echinata*

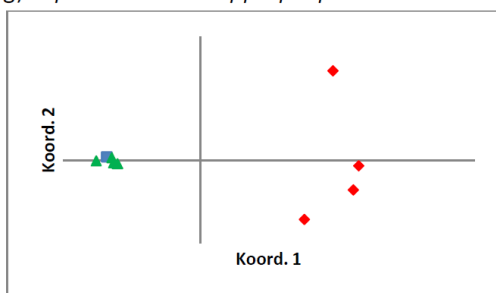


▲ *C. echinata* ◆ *C. paniculata* ■ *C. paniculata* x *echinata*

f) *C. paniculata* a *C. echinata*

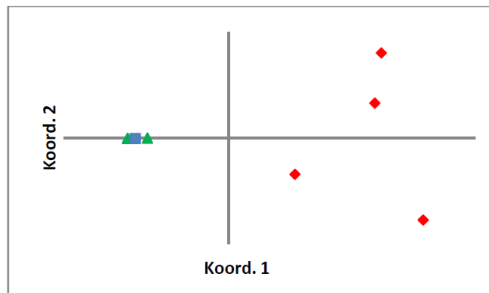


g) *C. paniculata* a *C. appropinquata*



▲ *C. appropinquata* ◆ *C. paniculata* ■ *C.paniculata* x *appropinquata*

h) *C. paniculata* a *C. appropinquata*



Obr. 1: PCoA graf zobrazující diferenciaci genotypů mezi parentálními druhy a domnělými hybridními vzorky; v levém sloupci pro AFLP data, v pravém sloupci pro mikrosatelitová data.

Specifické alelické složení, eventuálně zastoupení lokusů u jednotlivých taxonů umožňuje usuzovat na (ne-)hybridní původ studovaných jedinců. Ve většině případů bylo dosaženo značné genetické diferenciace mezi páry taxonů. Výjimku tvoří *C. acutiformis* a domnělý hybrid, což poukazuje na neoddělitelnost tohoto jedince od druhu *C. acutiformis*. Podobného výsledku bylo dosaženo také u *C. caryophyllea* a jedince označeného *C. ×moravica1*, u kterého byly ovšem detekovány unikátní mikrsoatelitové alely, stejně jako u domnělého hybridního jedince *C. ×moravica2*, a lze tedy předpokládat účast i jiného taxonu při jejich vzniku. Jediným jedincem, u něž byl detekován hybridní původ mezi stanovenými rodiči je *C. paniculata* × *echinata*. U poslední studované kombinace *C. paniculata* a *C. appropinquata* a jejich domnělým hybridním jedincem byly zaznamenány jedny z nejnižších hodnot Neiovy genetické vzdálenosti, což může být dáno jejich blízkým vztahem, neboť oba druhy pocházejí z téže sekce. Nicméně na základě dosažených výsledků tento jedinec vykazuje bližší vztah s *C. appropinquata*.

Tyto výsledky jednoznačně poukazují na přítomnost mezidruhově hybridizace v rodu *Carex*. Na stranu druhou, morfologická intermediárnost, respektive znaky odrážející morfologickou podobnost s domnělými parentálními druhy nemusí vždy poukazovat na hybridizační událost, ale může se jednat o vnitrodruhovou variabilitu, vycházející ať už z genotypové diferenciace, nebo fenotypové plasticity. Lze tedy shrnout, že z hlediska systematické klasifikace je potřeba obezřetně zacházet s jednotlivými taxony a jejich charakteristikami a v případě komplikovaných taxonů a tím spíše domnělých hybridních jedinců využívat genetické markery, které dokáží ozřejmit genetické pozadí těchto komplikovaných vztahů.

#### 4.4 Markery

Markery neboli znaky z pohledu přírodovědeckého představují vlastnosti určitých organismů, které vypovídají o podobnosti těchto organismů. V základu rozlišuje markery fenotypové, založené na pozorování rozdílů ve fenotypu jedinců a markery molekulární, které podávají informace o organismu získané analýzou jeho molekul DNA nebo proteinů.

DNA markery jsou založeny na polymorfismu v sekvencích DNA a rozlišujeme je na markery založené na hybridizaci, kam se řadí například RFLP markery (délkový polymorfismus restrikčních fragmentů) a markery založené na PCR. Tento typ markerů dále rozdělujeme na metody analyzující celý genom, jako např. RAPD (náhodná amplifikace polymorfní DNA) a AFLP (délkový polymorfismus amplifikovaných fragmentů) a metody získávající informace z konkrétní části genomu, kde se zejména jedná o mikrosatelitové markery. V neposlední řadě mají své uplatnění také informace získané sekvenací konkrétního genomického lokusu.

Co se týká rozdílů mezi fenotypovými a molekulárními markery, ty lze shrnout následovně. Fenotypové markery mají obvykle menší nároky na materiální či přístrojové vybavení, ale na stranu druhou je jich pouze omezený počet, vyskytují se často pouze v určitém ontogenetickém stádiu, jsou ovlivněny prostředím a také lze pomocí nich obtížně rozlišovat mezi blízce příbuznými druhy. Molekulární markery bývají naproti tomu nákladnější, ovšem může jich být značný počet. Dále při analýze nezáleží na ontogenetickém stádiu, nejsou ovlivněny prostředím a při vhodném výběru typu markerů je možné rozlišit i blízce příbuzné druhy.

Podle Miah et al. (2013) jsou důležitými vlastnostmi, které je potřeba zohlednit při výběru vhodného DNA markeru následující: dostupnost markerového systému pro studovaný organismus, časová náročnost, pracnost, nezbytné vybavení a finanční náklady vynaložené na získání dat. Dalšími parametry zohledňovanými při výběru vhodného markeru jsou úroveň polymorfismu ve studovaných populacích a velikost a struktura populace, kterou je nezbytné analyzovat a reprodukovatelnost. V neposlední řadě je nutné brát v úvahu i kvantitu a kvalitu potřebné DNA a typ dědičnosti markeru. Využití DNA markerů jako moderních metod analýzy doznalo značného rozšíření v řadě aplikací a každá z nich má své výhody i nevýhody. Při výběru je potřeba zohlednit řadu parametrů jako požadovanou úroveň polymorfismu, či kodominanci, která umožní rozlišit homozygotní a heterozygotní jedince. Dalším faktorem je dostupnost markerového systému pro konkrétní druh. Při použití AFLP a RAPD není potřebná předchozí znalost analyzovaného genomu a u metody AFLP lze říci, že je takřka univerzální (Veselá et al. in press). Také reprodukovatelnost se různí u jednotlivých metod a obecně je můžeme rozdělit na metody s vysokou reprodukovatelností, kam se řadí SSR a AFLP a metoda s nízkou reprodukovatelností, RAPD. Dále je potřeba zohlednit potřebné laboratorní vybavení a pracnost jednotlivých metod, která je srovnatelná u SSR a RAPD, pracnější je potom metoda AFLP, neboť

zde je nezbytná restrikce a ligace a poté preselektivní a selektivní amplifikace. Garcia et al. (2004) analyzovali hodnoty polymorfního informačního obsahu (PIC) těchto metod a jako metoda s nejvyšší průměrnou PIC byla vyhodnocena metoda SSR. Metody RAPD a AFLP vykazovali téměř shodné hodnoty, patrně díky své dominantní povaze. Rozdíly mezi minimální a maximální PIC hodnotou byla nižší u SSR oproti AFLP a RAPD. Pearsonovy korelační hodnoty byly nejvyšší mezi SSR a AFLP, tyto metody se tedy jeví nejpodobnější z hlediska rozsahu produkovaných genetických vzdáleností. Dominantní markery tedy vykazovaly nižší úroveň polymorfismu oproti kodominantním markerům.

#### **4.4.1 Polymorfni náhodně amplifikovaná DNA (RAPD)**

Metoda polymorfni náhodně amplifikované DNA (RAPD) je metoda založená na PCR amplifikaci využívající jediného krátkého syntetického oligonukleotidového primeru náhodné sekvence. Jako nejefektivnější délka primeru byla ustanovena délka 10 pb se zastoupením G+C bazí podobným, jaký je obsah studovaného organismu, čímž bude dosaženo maximalizace frekvence vazebných míst (Hadrys et al. 1992). Tento primer náhodné sekvence se váže k řadě různých genomických lokusů a produktem jsou náhodně amplifikované DNA sekvence v podobě několika diskretních produktů (Bardacki, 2001). Příčiny polymorfismu jsou mutace v, anebo mezi místy nasedání primerů a jsou detekovány jako přítomnost/absence příslušného RAPD produktu (Kumar a Gurusubramanian, 2011).

RAPD metoda je relativně jednoduchá na provedení, vyžaduje pouze malé množství genomické DNA a nevyžaduje žádnou předchozí znalost genomu studovaného organismu. Současně je tedy získán velký počet genetických markerů bez nutnosti předchozí molekulární charakterizace genomu (Kumar a Gurusubramanian, 2011). Na stranu druhou, RAPD markery jsou nejméně informativní ze všech známých DNA markerů, kvůli neznámému původu fragmentů a v porovnání s AFLP jsou používány nižší teploty nasedání primerů a může tedy snáze docházet k produkci nespecifických produktů. Další nevýhodou je jejich dominantní povaha. Komplikace této metody spočívají také v obtížně dosažitelné reprodukovatelnosti a přenositelnosti mezi laboratořemi, neboť je tato metoda citlivá na teplotní profil, koncentraci polymerázy a DNA a koncentraci hořčnatých iontů. Tedy pouze striktně standardizovaný protokol může zaručit reprodukovatelnost amplifikačních produktů. Dále je tu možnost



komigrujících fragmentů či přítomnost nereprodukovatelných fragmentů odvozených z nesespecifického nasedání primerů (Hadrys et al. 1992).

Navzdory všem těmto nevýhodám našla tato metoda uplatnění v řadě aplikací, jako genetické mapování (jedna z nejrozšířenějších aplikací RAPD techniky je identifikace markerů ve vazbě se znaky zájmu bez nutnosti mapování celého genomu) (Chen et al. 2014), populační a evoluční genetika (Fayyaz et al. 2014; Suresh et al. 2013), fylogenetické studie (Przybos et al. 2003), studie genetické diverzity (Chuan-you et al. 2015), detekce mezidruhového genového toku a identifikaci hybridů (Saeedi et al. 2013), determinace paternity a příbuzenských vztahů, detekce somaklonální variability (Kozyrenko et al. 2004) či identifikace kultivarů (Frotscher et al. 2014).

#### **4.4.2 Polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů (AFLP)**

Metoda polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů (AFLP) byla poprvé publikována Vos et al. (1995) a její princip spočívá v amplifikaci množiny genomických restrikčních fragmentů pomocí PCR. DNA je nejprve štěpena dvojicí restrikčních enzymů, po které následuje ligace dvouvláknových adaptorů na konce DNA restrikčních fragmentů. Tato místa následně slouží jako místa nasedání primerů. Posledním krokem je amplifikace restrikčních fragmentů a jejich elektroforetická separace a detekce.

Tato metoda dosáhla značného rozšíření v řadě experimentů, jakými jsou studie genetické diverzity (Lu et al. 1996; Hazen et al. 2002; Shoaib a Arabi, 2006; Guillot a Santos, 2010), taxonomické studie (Huys et al. 1996; Nakamatte a Lye, 2007; Koopman et al. 2008), populační analýzy (Paul et al. 1997; Vieira et al. 2007; Mott a Wang, 2012), klasifikace a identifikace genotypů (Ellis et al. 1997; Shoaib a Arabi, 2006; Lasso, 2008; Boscary et al. 2014), tvorba genetických map (Redoña a Mackill, 1996; Qi a Lindhout, 1997; Khrustaleva et al. 2005), nebo monitoring dědičnosti znaků (Jin et al. 1998; Lerceteau a Szmidt, 1999).

AFLP má řadu nesporných výhod, mezi které patří schopnost analýzy vzorku DNA bez ohledu na jeho původ či komplexnost genomu a bez nutnosti předchozí znalosti těchto genomů. Další výhodou je možnost testovat velké množství markerů současně a napříč celým genomem (Vos et al. 1995; Qi a Lindhout, 1997). Na stranu druhou má také nevýhody, kde stejně jako mikrosatelitové markery a RAPD je i tato technika zatížena homoplasíí (Vekemans et al. 2002; Veselá et al. in press). Dále se jedná o

dominantní marker, což komplikuje identifikaci homologních fragmentů (Mueller a Wolfenbarger, 1999).

Původně byla vyvinuta pro organismy s malým až středně velkým genomem (<6.12pg DNA/1 C; Guan a Shiraishi, 2011). Druhy s velkými genomy mají tendenci vytvářet profily se slabě amplifikovanými a často komigrujícími fragmenty (Fay et al. 2005). Pro druhy s velkými genomy bylo nicméně učiněno několik optimalizačních pokusů. Některé z nich využily zvýšený počet selektivních nukleotidů (Vos et al. 1995; Han et al. 1999; Lerceteau a Szmidt, 1999; Remington et al. 1999; Costa et al. 2000), další jsou založeny na optimalizaci počtu preamplifikačních kroků (Han et al. 1999; Remington et al. 1999; Costa et al. 2000), nebo použití alternativních restričních enzymů (Vos et al. 1995; Paglia a Morgante, 1998; Díaz et al. 2001; Guan a Shiraishi, 2011, Veselá et al. in press).

Ve studii Veselá et al. (in press) byly použity restriční enzymy rozpoznávající 8 pb sekvenci, jako alternativa oproti standardně používanému protokolu podle Vos et al. (1995). Při využití vhodné kombinace restričních enzymů, s ohledem na velikost a komplexitu genomu příslušného organismu, bylo dosaženo výrazného zlepšení kvality profilu. Ten byl lépe analyzovatelný, s nízkým pozadím a méně četnými, zato silněji amplifikovanými fragmenty, což umožnilo snazší čitelnost těchto profilů. Data vytvořená pomocí tohoto optimalizovaného protokolu si navíc zachovala velkou informační hodnotu, kdy i druhy s velkými genomy vykazovaly vysokou vnitrodruhovou variabilitu a také vysokou úroveň polymorfismu mezi blízce příbuznými individui.

Co se týká problematiky homoplasie, tu se sice nepodařilo tímto optimalizovaným protokolem zcela eliminovat, nicméně tato data poskytla důkaz, že homoplasie je v pozitivní korelaci s počtem detekovaných fragmentů a vhodnou kombinací restričních enzymů je tedy umožněno zredukovat počet fragmentů a tím i homoplasii.

#### **4.4.3 Mikrosatelitové markery**

Mikrosatelity jsou úseky DNA sestávající se z tandemově uspořádaných jednotek o délce opakování 1-6 pb, charakterizované kodominantní dědičností, širokou distribucí v genomu, hypervariabilní a multialelickou povahou. Mikrosatelity jsou všudypřítomné v kódujících a nekódujících regionech, nicméně u rostlin jsou SSR markery hojnější a preferenčně spojené s nepřekládanými regiony (UTR) prepisovaných regionů (Senan et

al. 2014). Míra mutace tohoto typu genetických markerů je odhadována na  $10^{-2}$  až  $10^{-4}$  na generaci (Miah et al. 2013), kdy změny délky nejčastěji vznikají replikačním skluzem či nerovnoměrným crossing-overem (Ellegren, 2004).

S ohledem na počet nukleotidů na repetici, mikrosatelity mohou být klasifikovány na mono-, di-, tri-, tetra-, penta-, hexa-nukleotidové repetice (Miah et al. 2013). Podle výskytu se SSR rozlišují na genomické, někdy označované jako jaderné mikrosatelity, EST nebo jinak řečeno genové mikrosatelity, organelární mikrosatelity (v chloroplastovém genomu jsou nejčastější mononukleotidové repetice složené z A či T motivu a také vykazují nižší mutační úroveň než jaderné SSR). Podle typu repetice na jednoduché repetice, které jsou kontinuální, přerušované repetice tvořené krátkou sekvencí uvnitř repetice a složené, sestavené ze dvou odlišných typů repetice v jednom motivu (Senan et al. 2014).

Přítomnost SSR v kódujících regionech vede ke zdání repetitivního vzoru v sekvenci aminokyselin. Bylo detekováno, že z aminokyselinových repetice převládá glutamin, alanin, glycin, kyselina glutamová a serin. Řada z proteinů obsahuje tandemové aminokyselinové repetice patřící mezi transkripční regulátory (Katti et al. 2000). Přítomnost těchto trinukleotidových repetice v kódujících regionech je tolerována vzhledem k faktu, že jejich delece nebo expanze nenarušuje čtecí rámeček (Katti et al. 2001). Přítomnost v nekódujících regionech také ovlivňuje transkripční genovou regulaci (Martin et al. 2004) nebo mohou sloužit jako rekombinační signály (Bagshaw et al. 2008). Nevýhody spojené s mikrosatelity jsou výskyt nulových alel (Senan et al. 2014) a homoplasie (Estoup et al. 2002).

Mikrosatelity jsou robustní, mají značnou informační hodnotu a mohou být využity pro řadu aplikací, mezi něž patří populační studie (Hodoki et al. 2009; Hodoki et al. 2014), hodnocení genetické diverzity mezi blízkými příbuznými druhy/kultivary (Lopes et al. 2015), analýzy rodičovství (Weinman et al. 2015), ideální markery pro genetické mapování (Singh et al. 2015) či markery pro asistovanou selekci (Xu et al. 2004; Oliveira et al. 2010).

## 5. LITERATURA

- Abudurehman, B., Liu, H., Zhang, D., Guan, K., Zhang, Y. 2014. The responses of the quantitative characteristics of a ramet population of the ephemeroïd rhizomatous sedge *Carex physodes* to the moisture content of the soil in various locations on sand dunes. *The Scientific World Journal*: 1-10.
- Bagshaw, A.T.M., Pitt, J.P.W., Gemmell, N.J. 2008. High frequency of microsatellites in *S. cerevisiae* meiotic recombination hotspots. *BMC Genomics* 9:49.
- Bardakci, F. 2001. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Turkish journal of Biology* 25: 185-196.
- Barton, N.H. 2001. The role of hybridization in evolution. *Molecular Ecology* 10: 551-568.
- Bergeron, A., Pellerin, S. 2014. *Carex* ×*cayouettei* (Cyperaceae), a new intersectional sedge hybrid from southern Québec, Canada. *Phytoneuron* 52: 1–11.
- Blackstock, N., Ashton, P.A. 2010. Genetic markers and morphometric analysis reveal past hybridization and introgression in putative *Carex flava* L. s.str. (Cyperaceae) hybrid populations. *Plant Systematics and Evolution* 287: 37–47.
- Boscari, E., Barmintseva, A., Pujolar, J.M. et al. 2014. Species and hybrid identification of sturgeon caviar: a new molecular approach to detect illegal trade. *Molecular Ecology Resources* 14: 489–98.
- Bugg, C., Smith, C., Blackstock, N., Simpson, D., Ashton, P.A. 2013. Consistent and variable leaf anatomical characters in *Carex* (Cyperaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 172: 371-384.
- Carlsson, R., von Numers, M., Haeggström, C. 2011. *Carex mackenziei* and *C. canescens* × *mackenziei* in the Åland Island, SW Finland. *Memoranda Soc. Fauna Flora Fennica* 87: 75-79.
- Catling, P.M., Reznicek, A.A., Crins, W.J. 1990. Introduction. *Canadian Journal of Botany* 68: 1405-1408.

- Chen, Y., Zhang, L., Qi, J. et al. 2014. Genetic linkage map construction for white jute (*Corchorus capsularis* L.) using SRAP, ISSR and RAPD markers. *Plant Breeding* 133(6): 777-781.
- Choler, P., Erschbamer, B., Tribsch, A., Gielly, L., Taberlet, P. 2004. Genetic introgression as a potential to widen a species' niche: Insights from alpine *Carex curvula*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101: 171-176.
- Comai, L. 2005. The advantages and disadvantages of being polyploid. *Natur* 6: 836-846.
- Díaz, V., Muñiz, L.M., Ferrer, E. 2001. Random amplified polymorphic DNA and amplified fragment length polymorphism assessment of genetic variation in Nicaraguan populations of *Pinus oocarpa*. *Molecular Ecology* 10: 2593-603.
- Ellegren, H. 2004. Microsatellites: simple sequence with complex evolution. *Nature* 5: 435-445.
- Ellis, R., McNichol, J., Baird, E. et al. 1997. The use of AFLPs to examine genetic relatedness in barley. *Molecular Breeding* 3: 359-369.
- Escudero, M., Eaton, D.A.R., Hahn, M., Hipp, A.L. 2014. Genotyping-by-sequencing as a tool to infer phylogeny and ancestral hybridization: A case study in *Carex* (Cyperaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 79: 359-367.
- Escudero, M., Hipp, A.L., Luceño, M. 2010. Karyotype stability and predictors of chromosome number variation in sedges: A study in *Carex* section *Spirostachyae* (Cyperaceae). *Molecular Phylogenetics and evolution* 57: 353-363.
- Escudero, M., Luceño, M. 2009. Systematics and evolution of *Carex* sect. *Spirostachyae* and *Elateae* (Cyperaceae). *Plant Systematics and Evolution* 279: 163-189.
- Escudero, M., Weber, J.A., Hipp, A.L. 2013. Species coherence in the face of karyotype diversification in holocentric organisms: The case study of a cytogenetically variable sedge (*Carex scoparia*, Cyperaceae). *Annals of Botany* 112: 515-526.

Estoup, A., Jarne, P., Cornuet, J. 2002. Homoplasmy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. *Molecular Ecology* 11: 1591-1604.

Fay, M.F., Cowan, R.S., Leitch, I.J. 2005. The effects of nuclear DNA content (C-value) on the quality and utility of AFLP fingerprints. *Annals of Botany* 95: 237–46.

Fayaz, R., Qureshi, N.A., Shakeela, P. 2014. Genetic variation among the wild and hatchery raised populations of *Labeo rohita* (Hamilton, 1822) revealed by RAPD markers. *International Journal of Biosciences* 5(12): 237-249.

Ford, B.A., Ball, P.W., Ritland, K. 1993. Genetic and macromorphologic evidence bearing on the evolution of numbers of *Carex* section *Vesicariae* (Cyperaceae) and their natural hybrids. *Canadian Journal of Botany* 71: 486-500.

Ford, B.A., Iranpour, M., Naczi, R.F.C., Starr, J.R., Jerome, C.A. 2006. Phylogeny of *Carex* subg. *Vignea* (Cyperaceae) based on non-coding nrDNA sequence data. *Systematic Botany* 31(1): 70-82.

Frotscher, J., Nocentini, M., Ruehl, E. et al. 2014. Quality Control: Identification of Table Grape Cultivars Using RAPD Markers. *Acta Horticulturae* 1048: 193-196.

Garcia, A.A.F., Benchimol, L.L., Barbosa, A.M.M., Geraldi, I.O., Souza, C.L., Souza, A.P. 2004. Comparison of RAPD, RFLP, AFLP and SSR markers for diversity studies in tropical maize inbred lines. *Genetics and Molecular Biology* 27(4): 579-588.

Guan, L., Shiraishi, S. 2011. Improved AFLP protocol using dual-suppression PCR and its application to species with large genomes. *Molecular Ecology Resources* 11: 854–61.

Guillot, G., Santos, F. 2010. Using AFLP markers and the Geneland program for the inference of population genetic structure. *Molecular Ecology Resources* 10: 1082–4.

Guo C., Wang B., Lu Y. et al. 2015. RAPD analysis on genetic diversity of wild populations of *Carya cathayensis* in southern mountainous area of Anhui Province. *Shengtaixue Zazhi* 34(5): 1301-1306.

- Hadrys, H., Balick, M., Schierwater, B. 1992. Applications on random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Molecular Ecology* 1: 55-63.
- Han, T.H., van Eck, H.J., De Jeu, M.J., Jacobsen, E. 1999. Optimization of AFLP fingerprinting of organisms with a large-sized genome: a study on *Alstroemeria* spp. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 465–471.
- Hazen, S.P., Leroy, P., Ward, R.W. 2002. AFLP in *Triticum aestivum* L.: Patterns of genetic diversity and genome distribution. *Euphytica* 125: 89–102.
- Heathcote, C.A., Davies, M.S., Etherington, J.R. 1987. Phenotypic flexibility of *Carex flacca* Schreb. *New Phytologist* 105: 381-391.
- Hendrichs, M., Oberwinkler, F., Begerow, D., Bauer, R. 2004a. *Carex*, subgenus *Carex* (cyperaceae) – A phylogenetic approach using ITS sequences. *Plant Systematics and Evolution* 246: 89-107.
- Hendrichs M., Michalski S., Begerow D., Oberwinkler F., Hellwig F.H. 2004b. Phylogenetic relationship in *Carex*, subgenus *Vignea* (Cyperaceae), based on ITS sequences. *Plant Systematics and evolution* 246: 109-125.
- Hipp, A.L. 2007. Nonuniform processes of chromosome evolution in sedges (*Carex*: Cyperaceae). *Evolution* 61-9: 2175-2194.
- Hipp, A.L., Reznicek, A.A., Rothrock, P.E., Weber, J.A. 2006. Phylogeny and classification of *Carex* section *Ovales* (Cyperaceae). *International Journal of Plant Sciences* 167(5): 1029-1048.
- Hipp, A.L., Rothrock, P.E., Roalson, E.H. 2009. The evolution of chromosome arrangements in *Carex* (Cyperaceae). *The Botanical Review* 75: 96-109.
- Hipp, A.L., Rothrock, P.E., Whitkus, R., Weber, J.A. 2010. Chromosomes tell half of the story: the correlation between karyotype rearrangements and genetic diversity in sedges, a group with holocentric chromosomes. *Molecular Ecology* 19: 3124-3138.
- Hodoki, Y., Ohbayashi, K., Kunii, H. 2009. Genetic analysis of salt-marsh sedge *Carex scabrifolia* Steud. populations using newly developed microsatellite markers. *Conservation Genetics* 10: 1361-1364.

- Hodoki, Y., Ohbayashi, K., Kunii, H. 2014. Analysis of population clonal diversity using microsatellite markers in the salt marsh sedge *Carex scabrifolia* in western Japan. *Landscape and Ecological Engineering* 10: 9-15.
- Huys, G., Coopman, R., Janssen, P., Kersters, K. 1996. High-resolution genotypic analysis of the genus *Aeromonas* by AFLP fingerprinting. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46: 572–580.
- Jakovljevic, K.M., Šinžar-Sekulic, J.B., Vukojčić, S.S., Kuzmanovic, N.V., Lakušić, D.V. 2014. Leaf anatomy of *Carex humilis* does not correlate with orographic, geological and bioclimatic habitat conditions in C&SE Europe. *Biologia* 69/3: 332-340.
- Jermy, A.C., Simpson, D.A., Foley, M.J.Y., Porter, M.S. 2007. Sedges of the British Isles. BSBI Handbook No. 1, 3rd ed. London: Botanical Society of the British Isles.
- Jin, H., Domier, L.L., Kolb, F.L., Brown, C.M. 1998. Identification of quantitative Loci for tolerance to barley yellow dwarf virus in oat. *Phytopathology* 88: 410–5.
- Katti, M.V., Ranjekar, P.K., Gupta, V.S. 2001. Differential distribution of simple sequence repeats in eukaryotic genome sequences. *Molecular Biology and Evolution* 18(7): 1161-1167.
- Katti, M.V., Sami-Subbu, R., Ranjekar, P.K., Gupta, V.S. 2000. Amino acid repeat patterns in protein sequences: Their diversity and structural-functional implications. *Protein Science* 9:1203-1209.
- Koopman, J. (2011) *Carex Europaea*. The genus *Carex* L. (Cyperaceae) in Europe, 1. – Margraf Publishers, Weikersheim.
- Koopman, W.J.M., Wissemann, V., De Cock, K. et al. 2008. AFLP markers as a tool to reconstruct complex relationships: A case study in *Rosa* (Rosaceae). *American Journal of Botany* 95: 353–366.
- Korpelainen, H., Virtanen, V., Kostamo, K., Väre, H. 2010. Hybridization and introgression in *Carex aquatilis* and *C. paleacea*. *Plant Systematics and Evolution* 287:141–151.



Košnar, J., Štech, M., Koutecký, P. 2012. Environmental control of clonal growth in *Carex nigra*: What can be masked under the name *Carex nigra* subsp. *juncella* in the Czech Republic? *Flora* 207: 294-302.

Kozyrenko, M.M., Artyukova, E.V., Boltenkov, E.V. et al. 2004. Somaclonal variability of *Iris pseudacorus* L. judged by RAPD- and cytogenetic analyses. *Biotekhnologiya* 2: 13-23.

Kroon, H., Huber, H., Stuefer, J.F., Groenendael, J.M. 2005. A modular concept of phenotypic plasticity in plants. *New Phytologist* 166: 73-82.

Kumar, N.S., Gurusubramanian, G. 2011. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and its applications. *Science Vision* 11(3): 116-124.

Lasso, E. 2008. The importance of setting the right genetic distance threshold for identification of clones using amplified fragment length polymorphism: a case study with five species in the tropical plant genus *Piper*. *Molecular Ecology Resources* 8: 74–82.

Lerceteau, E., Szmidt, A.E. 1999. Properties of AFLP markers in inheritance and genetic diversity studies of *Pinus sylvestris* L. *Heredity* 82: 252–260.

Lipnerová, I., Bureš, P., Horová, L., Šmarda, P. 2013. Evolution of genome size in *Carex* (Cyperaceae) in relation to chromosome number and genomic base composition. *Annals of Botany* 111: 79-94.

Livingstone, K., Rieseberg, L. 2008. Chromosomal evolution and speciation: a recombination-based approach. *New Phytologist* 161(1): 107-112.

Lopes, A.D., Scapim, C.A., Pires da Silva Machado, M., Mangolin, C.A., Silva, T.A., Cantagali, L.B., Teixeira, F.F., Mora, F. 2015. Genetic diversity assessed by microsatellite markers in sweet corn cultivars. *Scientia Agricola* 72: 513-519.

Lu, J., Knox, M.R., Ambrose, M.J., Brown, J.K., Ellis, T.H. 1996. Comparative analysis of genetic diversity in pea assessed by RFLP- and PCR-based methods. *Theoretical and Applied Genetics* 93: 1103–11.

- Luceño, M., Castroviejo, S. 1991. Agmatoplydly in *Carex laevigata* (Cyperaceae). Fusion and fission of chromosomes as the mechanism of cytogenetic evolution in Iberian populations. *Plant Systematics and Evolution* 177: 149-159.
- Luceño, M., Guerra, M. 1996. Numerical variations in species exhibiting holocentric chromosomes: a nomenclatural proposal. *Caryologia* 49: 301-309.
- Mallet, J. 2005. Hybridization as an invasion of the genome. *Trends in Ecology and Evolution* 20: 229-237.
- Martin, P., Makepeace, K., Hill, S.A., Hood, D.W., Moxon, E.R. 2005. Microsatellite instability regulates transcription factor binding and gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102(10): 3800-3804.
- Miah, G., Rafii, M.Y., Ismail, M.R., Puteh, A.B., Rahim, H.A., Islam, K.N., Latif, M.A. 2013. A review of microsatellite markers and their applications in rice breeding programs to improve blast disease resistance. *International Journal of Molecular sciences* 14: 22499-22528.
- Mott, I.W., Wang, R.R.-C. 2012. Genetic variation among laboratory accessions of Chinese Spring wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Genetic Resources* 10: 97–100.
- Mueller, U.G., Wolfenbarger, L.L. 1999. AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends in Ecology & Evolution* 14: 389–394.
- Nakamatte, E., Lye, K.A. 2007. AFLP-based differentiation in north Atlantic species of *Carex* sect. *Phacocystis*. *Nordic Journal of Botany* 25: 318–328.
- Oliveira, E.J., Silva, A., de Carvalho, F.M., Ferraz dos Santos, L., Costa, J.L., de Oliveira Amorim, V.B., Loyola Dantas, J.L. 2010. Polymorphic microsatellite marker set for *Carica papaya* L. and its use in molecular-assisted selection. *Euphytica* 173: 279-287.
- Otto, S.P. 2007. The evolutionary consequences of polyploidy. *Cell* 131: 452-462.
- Paglia, G., Morgante, M. 1998. PCR-based multiplex DNA fingerprinting techniques for the analysis of conifer genomes. *Molecular Breeding* 4: 173–177.

- Paul, S., Wachira, F.N., Powell, W., Waugh, R. 1997. Diversity and genetic differentiation among populations of Indian and Kenyan tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) revealed by AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics* 94: 255–263.
- Paun, O., Fay, M.F., Soltis, D.E., Chase, M.W. 2007. Genetic and epigenetic alterations after hybridization and genome doubling. *Taxon* 56(3): 649–656.
- Paun, O., Forest, F., Fay, M.F., Chase, M.W. 2009. Hybrid speciation in angiosperms: parental divergence drives ploidy. *New Phytologist* 182: 507–518.
- Przybos, E., Skotarczak, B., Wodecka, B. 2003. Phylogenetic relationships of *Paramecium jenningsi* strains (classical analysis and RAPD studies) *Folia Biologica-Krakow* 51: 85-95.
- Redoña, E.D., Mackill, D.J. 1996. Molecular mapping of quantitative trait loci in japonica rice. *Genome* 39: 395–403.
- Reed, D.H., Frankham, R. 2001. How closely correlated are molecular and quantitative measures of genetic variation? A meta-analysis. *Evolution* 55(6): 1095–1103.
- Remington, D.L., Whetten, R.W., Liu, B.H., O'Malley, D.M. 1999. Construction of an AFLP genetic map with nearly complete genome coverage in *Pinus taeda*. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 1279–1292.
- Reznicek, A.A. 1990. Evolution in sedges (*Carex*, Cyperaceae). *Canadian Journal of Botany* 68: 1409-1432.
- Rieseberg, L.H. 1995. The role of hybridization in evolution: Old wine in new skins. *American Journal of Botany* 82(7): 944-953.
- Rieseberg, L.H. 2001. Chromosomal rearrangements and speciation. *Trends in Ecology & Evolution* 16(7): 351-358.
- Rieseberg, L.H., Linder, C.R., Seiler, G.J. 1995. Chromosomal and genic barriers to introgression in *Helianthus*. *Genetics* 141: 1163-1171.
- Rieseberg, L.H., Willis, J.H. 2007. Plant speciation. *Science* 317(5840): 910–914.

- Roalson, E.H., Columbus, J.T., Friar, E.A. 2001. Phylogenetic relationships in Cariceae (Cyperaceae) based on ITS (nrDNA) and *trnT-L-F* (cpDNA) region sequences: Assessment of subgeneric and sectional relationships in *Carex* with emphasis on section *Acrocystis*. *Systematic Botany* 26(2): 318-341.
- Roalson, E.H., McCubbin, A.G., Whitkus, R. 2007. Chromosome evolution in Cyperales. *A Journal of Systematic and Evolutionary Botany* 23: 62-71.
- Rotreklová, O., Bureš, P., Řepka, R., Grulich, V., Šmarda, P., Hralová, I., Zedek, F., Koutecký, T. 2011. Chromosome numbers of *Carex*. *Preslia* 83: 25-58.
- Řepka, R., Veselá, P., Mráček, J. 2014. Are there hybrids between *Carex flacca* and *C. tomentosa* in the Czech Republic and Slovakia? *Preslia* 86: 367-379.
- Saeedi, Y., P, Nobrega, Gouveia, L. et al. 2012. Identification of spontaneous Portuguese digitalis hybrids using RAPD markers. *Planta Medica* 78(11): 1112-1112.
- Senan, S., Kizhakayil, D., Sasikumar, B., Sheeja, T.E. 2014. Methods for development of microsatellite markers: An overview. *Notulae Scientia Biologicae* 6(1): 1-13.
- Shoab, A., Arabi, M.I.E. 2006. Genetic Diversity among Syrian Cultivated and Landraces Wheat Revealed by AFLP Markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* 53: 901-906.
- Singh, N.V., Abburi, V.L., Ramajayam, D., Kumar, R., Chandra, R., Sharma, K.K., Sharma, J., Babu, K.D., Pal, R.K., Mundewadikar, D.M., Saminathan, T., Cantrell, R., Nimmakayala, P., Reddy, U.K. 2015. Genetic diversity and association mapping of bacterial blight and other horticulturally important traits with microsatellite markers in pomegranate from India. *Molecular Genetics and Genomics* 290: 1393-1402.
- Smith, T.W., Waterway, M.J. 2008. Evaluating species limits and hybridization in the *Carex complanata* complex using morphology, amplified fragment length polymorphisms, and restriction fragment analysis. *Botany* 86: 809-826.
- Starr, J.R., Ford, B.A. 2009. Phylogeny and evolution in Cariceae (Cyperaceae): Current knowledge and future directions. *The Botanical Review* 75: 110-137.

- Stenström, A., Jónsdóttir, I.S., Augner, M. 2002. Genetic and environmental effects on morphology in clonal sedges in the Eurasian Arctic. *American Journal of Botany* 89(9): 1410-1421.
- Stenström, A., Jonsson, B.O., Jónsdóttir, I.S., Fagerström, T., Augner, M. 2001. Genetic variation and clonal diversity in four clonal sedges (*Carex*) along the Arctic coast of Eurasia. *Molecular Ecology* 10: 497-513.
- Sultan, S.E. 1995. Phenotypic plasticity and plant adaptation. *Acta Botanica Neerlandica* 44(4): 363-383.
- Suresh, S., Chung, J., Sung, J. et al. 2013. Analysis of genetic diversity and population structure of 135 dill (*Anethum graveolens* L.) accessions using RAPD markers. *Genetic Resources And Crop Evolution* 60(3): 893-903.
- Tanaka, N. 1949. Chromosome studies in the genus *Carex* with special reference to aneuploidy and polyploidy. *Cytologia* 15: 15-29.
- Urbanek, L. 1998. Morphometric differentiation of *Carex ligerica* Gay in Poland. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 67: 263-268.
- Vekemans, X., Beauwens, T., Lemaire, M., Roldán-Ruiz, I. 2002. Data from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers show indication of size homoplasy and of a relationship between degree of homoplasy and fragment size. *Molecular Ecology* 11: 139–151.
- Veselá, P., Volařík, D., Mráček, J. 2016. Optimisation of AFLP for extremely large genomes over 70 Gb. *Molecular Ecology Resources* doi: 10.1111/1755-0998.12506.
- Vieira, E.A., Carvalho, F.I.F. de, Bertan, I. et al. 2007. Association between genetic distances in wheat (*Triticum aestivum* L.) as estimated by AFLP and morphological markers. *Genetics and Molecular Biology* 30.
- Volkova, P.A., Shipunov, A.B., Elven, R., Brochmann, C. 2008. The seashore sedges of the Russian Kola Peninsula: how many species? *Flora* 203: 523-533.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M. et al. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23: 4407–14.

Waterway, M.J., Hoshino, T., Masaki, T. 2009. Phylogeny, species richness, and ecological specialization in Cyperaceae tribe Cariceae. *The Botanical Review* 75: 138-159.

Weinman, L.R., Solomon, J.W., Dustin, R. 2015. A comparison of single nucleotide polymorphism and microsatellite markers for analysis of parentage and kinship in a cooperatively breeding bird. *Molecular Ecology Resources* 15: 502-511.

Wieclaw, H. 2014. *Carex flava* agg. (section *Ceratocystis*, Cyperaceae) in Poland: distribution maps and locality lists. *Biodiversity Research and Conservation* 33:49-84.

Wieclaw, H., Koopman, J. 2013. Numerical analysis of morphology of natural hybrids between *Carex hostiana* and the members of *Carex flava* agg. (Cyperaceae). *Nordic Journal of Botany* 31: 464–472.

Więclaw, H., Wilhelm, M. 2014. Natural Hybridization within the *Carex flava* Complex (Cyperaceae) in Poland: Morphometric Studies. *Annales Botanici Fennici* 51(3): 129-147.

Wronska-Pilarek, D., Janyszek, M., Jagodzinski, A.M. 2010. Pollen morphology of selected Central european species from subgenera *Vignea* and *Carex* (*Carex*, Cyperaceae) and its relation to taxonomy. *Botanical Journal of the Linnean Society* 164: 422-439.

Xu, K.N., Deb, R., Mackill, D.J. 2004. A Microsatellite marker and a codominant PCR-based marker for marker-assisted selection of submergence tolerance in rice. *Crop Science* 44: 248-253.

Yakimovski, S.B., Rieseberg, L.H. 2014. The role of homoploid hybridization in evolution: A century of studies synthesizing genetics and ecology. *American Journal of Botany* 101(8): 000-000.

Yen, A.C., Olmstead, R.G. 2000. Molecular systematics of Cyperaceae tribe Cariceae based on two chloroplast DNA regions: *ndhF* and *trnL* intron-intergenic spacer. *Systematic Botany* 25(3): 479-494.

Yu, F., Schneller, J.J., Krüsi, B., Schütz, M., Tang, M., Wildi, O. 2006. Genetic variability within *Carex sempervirens* tussocks on contrasting vitality. *International Journal of Plant Sciences* 167(3): 513-518.

## I. Optimisation of AFLP for extremely large genomes over 70 Gb

Přijato: *Molecular Ecology Resources*



Received Date : 24-Jul-2014

Revised Date : 23-Jan-2016

Accepted Date : 23-Jan-2016

Article type : Resource Article

Title: Optimisation of AFLP for extremely large genomes over 70 Gb

Running title: Optimisation of AFLP for extremely large genomes over 70 Gb

Author names: Petra Veselá, Daniel Volařík, Jaroslav Mráček

Address: Department of Forest Botany, Dendrology and Geobiocenology, Faculty of Forestry and Wood Technology, Mendel University in Brno, Zemědělská 3, 613 00 Brno, Czech Republic;

Corresponding author: Jaroslav Mráček, Department of Forest Botany, Dendrology and Geobiocenology, Faculty of Forestry and Wood Technology, Mendel University in Brno, Zemědělská 3, 613 00 Brno, Czech Republic; Fax number: +420545211128; E-mail: mracek@mendelu.cz.

Keywords: AFLP, large genome, size homoplasmy, octo-cutter restriction enzyme, reproducibility, in silico AFLP

#### **Abstract**

Here, we present an improved amplified fragment length polymorphism (AFLP) protocol using restriction enzymes (*Ascl* and *SbfI*) that recognise 8-base pair sequences to provide alternative optimisation suitable for species with a genome size over 70 Gb. This cost-effective optimisation massively reduces the number of amplified fragments by using only +3 selective bases per primer

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process, which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as doi: 10.1111/1755-0998.12506

This article is protected by copyright. All rights reserved.

Accepted Article

during selective amplification. We demonstrate the effects of the number of fragments and genome size on the appearance of non-identical co-migrating fragments (size homoplasy), which has a negative impact on the informative value of AFLP genotypes. We also present various reaction conditions and their effects on reproducibility and the band intensity of the extremely large genome of *Viscum album*. The reproducibility of this octo-cutter protocol was calculated using several species with genome sizes ranging from 1 Gb (*Carex panicea*) to 76 Gb (*Viscum album*). The improved protocol also succeeded in detecting high intraspecific variability in species with large genomes (*Viscum album*, *Galanthus nivalis* and *Pinus pumila*).

### Introduction

Amplified fragment length polymorphism (AFLP) is a DNA fingerprinting technique that was first published by Vos et al. in 1995. AFLP has since been widely applied, such as in genetic diversity (Lu et al. 1996; Hazen et al. 2002; Shoaib & Arabi 2006; Guillot & Santos 2010) and taxonomic (Huys et al. 1996; Nakamatte & Lye 2007; Koopman et al. 2008) studies, in population analysis (Paul et al. 1997; Vieira et al. 2007; Mott & Wang 2012), for the classification and identification of genotypes (Ellis et al. 1997; Shoaib & Arabi 2006; Lasso 2008; Boscary et al. 2014), in the construction of genetic/integrated maps (Redoña & Mackill 1996; Qi & Lindhout 1997; Khrustaleva et al. 2005) and for monitoring the inheritance of traits (Jin et al. 1998; Lerceteanu & Szmidski 1999).

The technique has several advantages, particularly the ability to test any DNA sample, regardless of the origin and complexity, without prior knowledge of the genome. Furthermore, AFLP is distinguished by the ability to analyse a large number of markers simultaneously across the entire genome and also by its good reproducibility (Vos et al. 1995; Qi & Lindhout 1997). However, one of the main disadvantages of AFLP is its association with the dominant nature of the markers, which causes difficulty in the identification of homologous fragments (Mueller & Wolfenbarger 1999).

AFLP was originally designed for organisms with small to mid-sized genomes (<6.12pg DNA/1 C; Guan & Shiraishi 2011), and the technique commonly uses one pre-amplification step with *EcoRI*+1/*MseI*+1 or *PstI*+1/*MseI*+1 to reduce background smearing (Vos et al. 1995; Qi & Lindhout 1997; Montemurro et al. 2007). Species with large genomes tend to create profiles with weak amplification and a tendency towards fragment co-migration, and only a small portion of bands can be scored reliably. However, this amplification issue tends to be common in most, if not all, individuals of species with large genomes (Fay et al. 2005).

Several optimisation attempts have been made to produce a clear and reproducible AFLP pattern for organisms with large genomes. Such modifications were based on increasing the number of selective nucleotides (Vos et al. 1995; Han et al. 1999; Lerceteau & Szmidt 1999; Remington et al. 1999; Costa et al. 2000), optimisation of the pre-amplification steps (Han et al. 1999; Remington et al. 1999; Costa et al. 2000), and the use of alternative tetra- or hexa-cutter restriction endonucleases based on their recognition sequence and methylation sensitivity (Vos et al. 1995; Paglia & Morgante 1998; Díaz et al. 2001; Guan & Shiraishi 2011).

Increasing the number of selective bases in one or both primers is one option for reducing the number of amplified fragments, which enhances the quality of the fingerprints of larger genomes (Fay et al. 2005). Using primers with 4-base extensions resulted in a greater tolerance for mismatches (Vos et al. 1995), but later studies that applied a more stringent amplification condition reported cleaner and more reproducible fingerprints, with an approximate 50 % reduction in fragments detected with 1 extra selective base compared with the *EcoRI*+3/*MseI*+3 combination (Han et al. 1999; Lerceteau & Szmidt 1999).

Optimisation of the pre-amplification protocol revealed that a single pre-amplification step is necessary to reduce background (Vos et al. 1995, Han et al. 1999), but additional pre-amplification reactions result in the loss of large fragments and increases labour (Han et al. 1999). Additionally, a 6-nucleotide increase (3 selective bases per primer) in the number of selective bases between reactions produces a pattern with extra bands and enhanced smearing (Han et al. 1999).

Another important and often overlooked phenomenon is the issue of non-identical co-migrating fragments (both within and across genotypes), which is known as size homoplasy (Vekemans et al. 2002). Size homoplasy correlates with an increase in detected bands, as a higher number of detected bands implies the higher probability of occurrence of non-identical co-migrating fragments (Koopman & Gort 2004). Also, size homoplasy can be influenced by the presence of repetitive DNA and the polyploid origin of an organism (Fay et al. 2005). Size homoplasy is affected by genome size, where it can rapidly increase with a bigger genome size (Koopman & Gort 2004, Gort et al. 2006, Althoff et al. 2007, Caballero & Quesada 2010). The size homoplasy can cause difficulties in data interpretation, such as the underestimation of genetic diversity between samples, the loss of resolution in analyses, and improper tree-building using dissimilarity measures (O'Hanlon & Peakall 2000, Meudt & Clarke 2007), but it is rarely investigated due to high technical demands and time requirements (O'Hanlon & Peakall 2000, Vekemans et al. 2002). Regarding uneven fragment distribution with a higher abundance of short fragments, it was proposed that shorter fragments show a higher risk of size homoplasy, but even if the distribution of the fragments is flat, the problem of size homoplasy could not be resolved completely (O'Hanlon & Peakall 2000, Vekemans et al. 2002, Caballero et al. 2008).

Size homoplasy was estimated to vary greatly in several experimental and theoretical studies. The work of Hansen et al. (1999) reported a size homoplasy of 13 % in the genus *Beta*, but the work of O'Hanlon & Peakall (2000) detected variability in size homoplasy, which ranged from 0 % to 5 % for congeners, and up to 100 % for the distant species from different subtribes within the *Carduinae* thistles. Vekemans et al. (2002) predicted very strong size homoplasy according to simulations that showed that 30 % of simulated fragments were not detected when considering the whole size range. Simulated *in silico* AFLPs with 20, 50, and 100 fragments per run show an expected size homoplasy of 4 %, 12 %, and 24 %, respectively, and only 19 bands are needed for the likely occurrence of a homoplasious band (Gort et al. 2006). Additionally, size homoplasy increases with increasing taxonomic rank (O'Hanlon & Peakall 2000, El-Rabey et al. 2002, Mechanda et al. 2004). The impact

of size homoplasy on analyses differs (described in detail in Caballero et al. 2008). For the estimation of neutral genetic differentiation, size homoplasy has a substantial impact when more than 200 bands per primer combination are scored, but for the estimation of expected heterozygosity, size homoplasy has a substantial impact even with 50 to 75 bands (Caballero et al. 2008).

In the present study, we present an alternative AFLP optimisation protocol that was for the first time used for species with very large genomes, that is, genomes over 70 GB. Our goals were the following: i) to optimise the AFLP protocol for species with genomes over 70 GB to obtain easily readable AFLP profiles with low background noise and with a reduced number of detected fragments, which is important for size homoplasy; and ii) to evaluate whether an optimised AFLP protocol is robust enough to be applied in species with a large range of genomes sizes, for which we chose 8 species with a genome size ranging from 1 Gb (*Carex panicea*) to 76 Gb (*Viscum album*); iii) to evaluate the performance of an optimised protocol with respect to reproducibility and size homoplasy; and iv) to examine the applicability of optimised AFLP fingerprints for genetic diversity and population structure studies in species with an extremely large genome (i.e., whether the optimised protocol is able to detect sufficient variation between samples and populations).

## Materials and methods

### *Plant material and DNA extraction*

For the AFLP analysis, we used samples that were collected in the field from 8 species, *Carex panicea* L. (*Cyperaceae*), *Gymnocalycium lukasikii* Halda et Kupcak, *Gymnocalycium nataliae* Neuhuber, *Gymnocalycium sanluisense* Sorma (*Cactaceae*), *Triticum aestivum* L. (*Poaceae*), *Galanthus nivalis* L. (*Amarylidaceae*), *Pinus pumila* (Pall.), Regel (*Pinaceae*) and *Viscum album* L. (*Santalaceae*) (Table 2).

The samples of *Viscum album* were collected from 4 populations, 2 from the Czech Republic for 11 and 12 samples and 2 populations from Spain for 2 and 3 samples. Eight *Galanthus nivalis* samples were collected from 2 populations that were both from the South-Moravian region in the Czech Republic (4 individuals from each population), and 8 *Pinus pumila* samples originated from 3

separate localities in Russia (Nakonechnaya et al. 2010). In *Triticum aestivum* we used 8 samples from 4 varieties, namely, Etela, Karolinum, Lidka and Nikol. *Carex panicea* (collected in Bulgaria) and species from the genus *Gymnocalycium* (seeds collected in Argentina and regrown in greenhouse, Řepka & Mráček 2012) were represented by one individual per species, and they were used as comparative species with small to medium-sized genomes. Detailed information about the origin of all of the samples are listed in Supplementary Table 1.

Total genomic DNA was isolated from young leaf tissue (except for *Gymnocalycium* samples, where the aboveground part of the seedlings was used) with a DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Venlo, The Netherlands).

#### **AFLP protocol**

The AFLP reactions were performed according to Vos et al. (1995), with several modifications.

Total genomic DNA (0.5 µg) was incubated for 3 h at 37 °C in a 20-µl reaction volume with 2.5 U of *Ascl/EcoRI/SbfI* (New England BioLabs, Ipswich, Massachusetts, USA), 2.5 U of *MseI* (New England BioLabs), 15 µg of BSA, 50 pmol of *MseI* adapter (Vos et al. 1995), 5 pmol of *Ascl/EcoRI/SbfI* adapter (Vos et al. (1995) and Table 1), 80 cohesive end U of T4 DNA ligase (New England BioLabs), 1x CutSmart™ Buffer (1x NEB2 Buffer for *EcoRI*), and 1 mM of ATP.

The reaction mixture was then diluted 20-fold in TE<sub>0.1</sub> buffer (10 mM of Tris-HCl, 1 mM of EDTA, pH 8.0).

The pre-amplification reaction was performed with primers that were extended by 1 or 2 selective nucleotides (*Ascl*+A; *SbfI*+A; *EcoRI*+A; *SbfI*+AC; *MseI*+C; *MseI*+CC; *MseI*+CT) using 4 µl of the diluted mixture from the first reaction, 0.5 U of *Taq* DNA polymerase (Qiagen), 2.5 pmol of each primer, 1x PCR Buffer (Qiagen), and 0.2 mM of dNTPs in a 20-µl reaction volume. The pre-amplification reaction was performed as follows: 2 min at 72 °C, followed by 20 cycles of 20 s at 94 °C, 30 s at 56 °C (stringent conditions 1 and 2 at 58 °C), and 2 min at 72 °C, with one 30-min cycle at 60 °C. The pre-amplification reaction was diluted 10-fold in TE<sub>0.1</sub> buffer.

The selective amplification was performed using 10 different *MseI* primers with 2, 3 or 4 selective nucleotides (*MseI*+CT/CC/CTA/CTT/CTC/CTG/CCA/CCT/CCC/CCG/CCAA/CCAC/CCAG/CCAT). The second primer (*Ascl*+ACG/*EcoRI*+ACG/*SbfI*+ACG) used in the selective amplification was fluorescently labelled at the 5'-end (with 6-FAM or NED). The reaction mixture contained 0.5 U of *Taq* DNA polymerase (Qiagen), 0.2-mM dNTPs, 2-pmol *Ascl/EcoRI/SbfI* primer, 5-pmol *MseI* primer, 4  $\mu$ l of the diluted mixture from the second reaction, and 1x PCR buffer (Qiagen) in a total volume of 20  $\mu$ l. The reaction profile was as follows: 2 min at 94 °C; 10 cycles of 20 s at 94 °C, 30 s at 66 °C, and 2 min at 72 °C, with the annealing temperature decreased by 1 °C (stringent condition 1 by 0.7 °C) in each cycle; 20 cycles of 20 s at 94 °C, 30 s at 56 °C (stringent condition 1 at 59 °C), and 2 min at 72 °C; followed by 30 min at 60 °C.

#### **Data analysis**

The AFLP fragments were separated electrophoretically using an ABI PRISM 3730XL automated sequencer (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) with the GeneScan-500 LIZ internal standard (Applied Biosystems). GeneMapper V4.1 (Applied Biosystems) was used to detect AFLP fragments.

The reproducibility was calculated from 5 independent reactions of the same sample.

To determine the informative value of the AFLP bands using an improved protocol, we calculated the percentage of polymorphic bands in samples of *Viscum album*, *Galanthus nivalis*, *Pinus pumila* and *Triticum aestivum*. Additionally, we calculated pairwise genetic distance as a dissimilarity measure for each pair of samples of the same species mentioned above to provide an overview of the intraspecific variability and to identify identical genotypes, or as a control to ensure that the percentage of polymorphic fragments is not affected by only a few polymorphic samples. Population structure was estimated in *Viscum album* using an analysis of molecular variance (AMOVA), calculating  $PHI_{pt}$  based on 999 permutations in GenAlEx 6.5 (Peakall & Smouse 2012), giving population genetic structure from the dominant AFLP data. Non-metric multidimensional scaling (NMDS) was used to visualise the genetic structure and separation of samples from different

populations. Two-dimensional NMDS was performed using function metaMDS in the 'vegan' package (Oksanen et al. 2015) within the R software environment (R Core Team 2013). Canberra index was used as a measure of dissimilarity.

Size homoplasmy was calculated for +5 (*Ascl*+ACG/*MseI*+CC, *Ascl*+ACG/*MseI*+CT, *Sbfl*+ACG/*MseI*+CC, *Sbfl*+ACG/*MseI*+CT) and +6 combinations by determining the percentage of scored fragments that appeared more than once with all corresponding primer combinations and an additional selective base (C, T, A, G) (Hansen et al. 1999, O'Hanlon & Peakall 2000).

We used a linear mixed effect models (LME) to evaluate how size homoplasmy was influenced by the genome size and by the number of +5 fragments and to determine the best predictor. Because the genome size and number of fragments in the +5 primer combinations were correlated, we used just one variable in a single model. We calculated separate models and compared them using the Akaike information criterion (AIC; Akaike 1974) and the Bayesian information criterion. Moreover, we assessed any additional effects of the specific selective bases in the *MseI* primers (CT/CC) and their interactions with the previously mentioned variables. Because the relationship between the genome size and number of fragments in the +5 reactions is not necessarily linear, we also evaluated models with the second-order polynomial of the variables. We used LME because of the hierarchical structure of our data, where 2 variants of the selective bases (CC/CT) were analysed within the same individual; therefore, we added the random effect of the individual into the model. When comparing nested models, p-values were obtained using the likelihood ratio test, always comparing the simpler model with its more complex variant. Statistical analyses were performed using the R software environment (R Core Team 2013) with the 'lme4' package for fitting and analysing the LME models (Bates et al. 2014).

We also calculated the theoretical size homoplasmy for *Viscum album* by simulating conditions corresponding to our analysis. First, we obtained a theoretical DNA sequence with a GC content of 30 % (Nagl et al. 1983). The length of the sequence was given by the genome size reduced by 1,024, which approximately corresponds to a reduction of +2/+3 selective bases used for AFLP analysis. We



then simulated DNA digestion using the restriction enzymes *SbfI*/*Ascl* and *MseI*. The theoretical size homoplasy was calculated as the number of fragments with the same length relative to the total number of fragments. Regarding AFLP detection limits, only fragments that ranged in length from 50 to 500 bp were used. The simulation was repeated 100 times to obtain relatively stable results, and the average values of theoretical size homoplasy were calculated and reported. The simulations were performed within the R environment using the package 'SimRAD' (Lepais & Weir 2014); the R script with all of the calculations is supplied as a link in the Data Accessibility section.

## Results

The analysis was performed using species with genome sizes that ranged from relatively small (*Carex panicea* L., *Gymnocalycium lukasikii* Halda et Kupcak), to medium-sized (*Gymnocalycium nataliae* Neuhuber, *Gymnocalycium sanluisense* Sorma), to large (*Triticum aestivum* L., *Pinus pumila* (Pall.) Regel, *Galanthus nivalis* L.) and to extremely large (*Viscum album* L.) (Table 2).

Testing of restriction enzymes and different numbers of selective nucleotides

We compared the AFLP profiles generated using the restriction enzyme *EcoRI* (recognition sites 5'-GAATTC-3') to those generated using the 8-base cutters *SbfI* and *Ascl*, which recognise the sequences 5'-CCTGCAGG-3' and 5'-GGCGGCC-3', respectively.

When using the widely used *EcoRI*+3/*MseI*+3 primer combination, the AFLP profiles for *Viscum album* contained many fragments with intensities close to the background noise and a minimal number of strong bands. The first optimisation using the *SbfI*+3/*MseI*+2 combination resulted in a significant improvement in the quality. We detected 136 fragments; the number of low-intensity peaks decreased; and stronger peaks appeared more often when compared to the previous primer combination. The *SbfI*+3/*MseI*+3 combination, which contains an additional selective base in the *MseI* primer, generated only 51 fragments (Table 3), most of which were medium to high intensity (Fig. 1). The second optimisation using the *Ascl*+3/*MseI*+2 enzymes demonstrated a similar intensity

and quantity of fragments (Table 3), but the *Sbf*I+3/*Mse*I+3 combination suffered from an unequal fragment distribution represented by fragment accumulation in the first half of the profile. The fingerprint generated by *Sbf*I+3/*Mse*I+4 showed a slight decrease in the number of bands accompanied by an improvement in the quality of the profile; however, there were extra peaks that were absent in the corresponding *Sbf*I+3/*Mse*I+3 combination. Although the presence of extra bands is common for primer combinations containing more than 3 selective bases per primer (Vos et al. 1995; Han et al. 1999, Lerceteanu & Szmidt 1999), these AFLP profiles are highly reproducible (Han et al. 1999; Lerceteanu & Szmidt 1999).

The AFLP profiles of *Pinus pumila* contained 125 and 45 detectable bands when using the *Sbf*I+3/*Mse*I+2 and *Sbf*I+3/*Mse*I+3 combinations, respectively. However, regarding the quality of the profiles, there were several fragments that assembled into clusters that were difficult to evaluate. Nevertheless, the quality of the electrophoretic profiles improved significantly when compared to the quality of the profiles created with the *Eco*RI+*Mse*I combination (Fig. 1).

For *Galanthus nivalis* and *Triticum aestivum*, we detected a lower number of bands compared to *Viscum album* and *Pinus pumila*, and the electrophoretic profiles were easily readable when using the *Sbf*I+3/*Asc*I+3-*Mse*I+3 primer combinations. For *Gymnocalycium* sp. we detected 36 to 50 bands with *Sbf*I+3/*Mse*I+2 and 10 to 14 with *Sbf*I+3/*Mse*I+3, and predominantly bands with high-signal intensities were distributed fairly equally across the profiles (Table 3).

We also tested the effect of using a 2-fold higher concentration of polymerase. The amount of polymerase had a positive impact on fragment strength, which aids in fragments identification in reactions with a high number of fragments, such as the *Sbf*I+3/*Mse*I+2 primer combination applied to *Triticum aestivum* (Fig. 2) and *Viscum album*.

#### AFLP reproducibility

The reproducibility of the technique was tested using both the *Asc*I/*Mse*I and *Sbf*I/*Mse*I combinations. *Carex* and *Triticum* species showed 100 % reproducibility, lower reproducibility—88.9 %, 92.5 %, and 94.5 %—were calculated for *Viscum album* (*Asc*I), *Pinus pumila* (*Asc*I), and

*Galanthus nivalis* (*SbfI*), respectively. Subsequent experiments using *Viscum album* DNA showed a positive effect when using an additional volume of enzymes in the first AFLP reaction, which increased the reproducibility to 91.4 %. However, other optimisation techniques, including more stringent pre-amplification and amplification conditions, more DNA or more polymerase, did not provide any significant improvements (Fig. 3). In general, studies of this type have a reported error level below 2 % (reviewed in Mueller & Wolfenbarger 1999); however, Perrie & Shepherd (2009) presented an error rate between 0.9-5.7 %. The reproducibility for *Viscum album* and *Pinus pumila* is comparable to the optimisation based on dual-suppression PCR published by Guan & Shiraishi (2011).

#### Size homoplasy

When comparing *MseI*+CT/+CC profiles with the corresponding +6 combinations, we detected multiple fragments in several cases (Table 4). The observed size homoplasy calculated for a whole range of fragment sizes (50-500 bp) varied from 8 % for *Gymnocalycium lukasikii* (*SbfI/MseI*) with 36 fragments detected in +5 combinations to 40 % for *Viscum album* (*SbfI/MseI*) with 136 fragments in +5 combinations. When increasing the minimal fragment size, the size homoplasy decreased only slightly to 4.1 % for *Gymnocalycium lukasikii* and to 33.6 % for *Viscum album* for the range of fragment sizes from 125 to 500 bp (Table 4). The impact of the minimal fragment size on size homoplasy is shown on Fig. 4. When increasing minimal fragment size from 50 to 125 bp, the decrease in size homoplasy was approximately 6 % for *Viscum album* (*SbfI/MseI*), *Pinus pumila*, and *Triticum aestivum*. The decrease was even lower, less than 3 %, for *Gymnocalycium* sp., *Galanthus nivalis*, and *Viscum album* (*Ascl/MseI*) (Table 4). The theoretical size homoplasy simulated for *Viscum album* was lower than the one observed; it was 29.7 % and 7.5 % for *SbfI* and *Ascl* primer combinations with +5 selective bases, respectively (fragment size range 50-500 bp).

We found that size homoplasy was strongly influenced by both the genome size and the number of fragments in the +5 reactions ( $p$ -values  $<0.001$ , Table 4 and Supplementary Table 2). The increase in size homoplasy that corresponded to the increases in the number of fragments was nearly linear, whereas an increase relative to the genome size was much lower for the larger genomes, resulting in a significant effect of the quadratic term in our analysis. The additive effect of specific selective bases was not significant for either the genome size or the number of fragments in the +5 reaction. However, the interaction of the two variables was significant, showing a somewhat different trend for CC and CT for both the genome size and the number of fragments in the +5 reactions (Fig. 5 and Fig. 6). According to both AIC and BIC, the model based on the number of fragments performed slightly better than the model based on the genome size (Supplementary Table 2). Thus, the number of fragments appears to be a better predictor of size homoplasy.

#### Genetic diversity and population structure

Our data revealed a high level of polymorphism in *Viscum album*, *Galanthus nivalis* and *Pinus pumila* but a rather low level of polymorphism between varieties of *Triticum aestivum*, where the average of the percentage of polymorphic bands was 32.7 % (Table 5). The pairwise genetic distance between samples of the *Triticum aestivum* variety Karolinum was equal to 0, however, for 3 other *Triticum aestivum* varieties, the pairwise genetic distance from 2 primer combinations was 2.9 % in the variety Nikol, 3.9 % in Etela and 6.6 % in Lidka. In *Viscum album* and *Pinus pumila*, our data showed that most bands had great information value because 97 % in *Viscum album* and 98 % in *Pinus* were polymorphic. In *Galanthus nivalis*, the polymorphism value of the datasets varied noticeably between particular primer combinations, i.e., 65 % for *MseI*+CTG and 84.2 % for *MseI*+CCA (see Table 5).

Additionally, the pairwise genetic distance differed markedly between individual sample pairs in each population in the *Viscum album* samples and reached values from 42.3 to 72.1 %, from 41.7 to 71.0 %, and from 55.6 to 73.8 % for Lednice, Bulhary, and Spain samples, respectively.

For 29 samples of *Viscum album* from different Czech and Spain localities, we also estimated AMOVA  $PHI_{pt}$ , which detected significant differentiation between *Viscum* populations. Variation between populations from the Czech Republic and Spain was higher than that among the Czech populations (Lednice x Bulhary 0.023, p 0.035; Lednice x Spain 0.162, p 0.001; Bulhary x Spain 0.152, p 0.001). The percentage of molecular variance among the populations was at 10 % and at 90 % within populations. Non-metric multidimensional scaling markedly separated the Spain samples from both of the Czech populations. In contrast, the Czech populations showed overlap based on geographical location (Fig. 7).

## Discussion

Restriction enzymes recognising 8-nucleotide sequences were used successfully as an alternative optimisation method for AFLP in species with large genomes (genome sizes >70 Gb). A restriction enzyme recognising an 8-nucleotide sequence provides two extra bases, which should reduce the total number of fragments by 16-fold when compared to a standard hexa-cutter variant. The combination of *SbfI* or *Ascl* with a 4-base cutter (*MseI*) ensures that the size of the fragments will be optimal for detection because a more frequent cutter ensures better fragment distribution (Vos. et al. 1995; Guan & Shiraishi 2011).

The AFLP profiles of the tested species showed significant variation in the distribution of fragments. Some of the species showed an even fragment distribution (*Gymnocalycium*, *Viscum album* with *Ascl*+3/*MseI*+3), whereas others showed accumulation in the lower size range (*Pinus pumila*, *Viscum album* with *SbfI*+3/*MseI*+3). AFLP markers tend to exhibit a strong asymmetric distribution. Although this pattern is not affected by the GC content or the genome size (Fay et al. 2005), it can be altered

by the recognition sequence of the restriction enzymes (Vos et al. 1995; Guan & Shiraishi 2011) or by a specific combination of selective nucleotides (Qi & Lindhout 1997). A comparison of the number of fragments and the fragment strength, especially for the *Pinus pumila*, *Galanthus nivalis*, *Triticum aestivum* and *Viscum album* profiles, clearly demonstrates that the resulting profile image is not only influenced by the size of the genome but also by its complexity. However, although *Galanthus nivalis* has a larger genome than *Triticum aestivum*, fewer bands were detected in the corresponding AFLP profile (Tables 2 and 3). The effect of polyploidy was demonstrated in species belonging to the genus *Gymnocalycium*; the increase in genome size corresponded with the level of polyploidy, yet the number of detected bands increased only slightly (Tables 2 and 3). This result supports the conclusion of Fay et al. (2005) regarding the AFLP patterns for polyploids, where the quality of the AFLP patterns is more related to genome size (1n) than to the C-value, and the number of interpretable bands increases with the polyploidy level within a genus.

The size homoplasy is still an issue even with the presented protocol. The similar works of Koopman & Gort (2004), Gort et al. (2006), and Caballero & Quesada (2010) and our data provide evidence that the probability of size homoplasy is closely related to the number of detected bands (Supplementary Table 2 and Fig. 6). Several recommendations were published to address size homoplasy. Often mentioned is the avoidance of small fragments that are less polymorphic and more homoplasmic (Vekemans et al. 2002), but the proper minimal fragment size is difficult to estimate. Papa et al. (2005) considered AFLP fragments larger than 75 - 80 bp as informative, whereas Caballero et al. (2008) suggested that exclusion of fragments <125 bp could reduce the level of size homoplasy by one-third. The difficulty of exact estimations is supported by our data presented in Table 4 and Fig. 4, where minimal fragment size has a higher impact on some species (*Viscum album*, *Pinus pumila*, and *Triticum aestivum*) but a minimal one for other species (*Galanthus nivalis*, *Gymnocalycium* sp.). It is difficult to suggest an appropriate minimal fragment size even for particular species, as we demonstrated for *Viscum album*. For *Sbfl*, the minimal fragment size of 125

bp appears to be reasonable, whereas for *Ascl*, there is no reason to increase the minimal fragment size over 100 bp.

In our case, it seems that AFLP reactions with more than 90 bands have a higher sensitivity to the minimal fragment size with respect to size homoplasy, and it is efficient to remove fragments shorter than 100 bp from the dataset. In contrast, for primer combinations that resulted in the number of bands being lower than 50 and with a good fragment distribution, the loss of valuable information is higher than the gain of decreasing size homoplasy when increasing the minimal fragment size.

In addition to avoiding small fragments, there are other suggested approaches to reduce size homoplasy that use fragments of a known map position that show Mendelian inheritance, at least in a population used in mapping purposes (Vekemans et al. 2002). Another approach involves increasing the number of selective nucleotides in the primers to reduce the number of fragments per run and thus the probability of fragment co-migration (Caballero et al. 2008). Our optimisation represents a much more efficient approach to reduce the number of fragments than the aforementioned increase in the number of selective bases; therefore, it should also be more efficient in reducing size homoplasy.

Caballero and Quesada (2010) advised that if the DNA sequence data of an organism are available, *in silico* analysis is an indispensable tool to setup the appropriate design of AFLP analyses due to the possibility of unequal fragment coverage for specific enzyme combinations over a studied genome.

Another recommendation based on an increase of size homoplasy with taxonomic range is that studies of phylogeny using AFLP data are suited for closely related taxa (O'Hanlon & Peakall 2000), while Meudt & Clarke (2007) recommended that, instead of avoiding tree-building, the splits graph methods should be applied (NeighbourNet, split decomposition, and consensus and super networks). Meudt & Clarke (2007) also suggest that AFLP data in combination with DNA sequences can result in more robust phylogenies.

The theoretical size homoplasy for *Viscum album* revealed an effect similar to the experimental values (Table 4); higher size homoplasy was found with *SbfI* combinations compared to *Ascl* combinations, but the difference between *SbfI* and *Ascl* was smaller for the experimental data. The differences in fragment distribution accompanied by the impact on size homoplasy were reported several times for theoretical, *in silico* and experimental AFLP data (Koopman & Gort 2004, Caballero & Quesada 2010). Particularly, the random DNA sequence of a specific GC content does not reflect the genome complexity of a living organisms, including intragenomic variability in GC content, coding versus noncoding sequences, mobile insertions, methylation patterns, recombinatorial hot spots, or hierarchies of repeats (Karlin et al. 1997, Caballero & Quesada 2010), which occupy approximately 65 % of the *Viscum album* genome (Nagl et al. 1983). The experimental data could exhibit higher size homoplasy due to incorrect scoring or insufficient mobility resolution, or not all *in silico* fragments can be amplified, therefore these fragments will not have experimental profiles, resulting in a lower level of size homoplasy in the experimental datasets (Pompanon et al. 2005, Meudt & Clarke 2007, Caballero & Quesada 2010).

Compared with a standard protocol (*EcoRI/MseI*), our optimised protocol generates data with great informational value when applied to species with large genomes due to the detection of high intraspecific variability and high levels of polymorphism between pairs of individuals (Table 5). As expected, the variability was affected by the origin of the plant material that was collected from different localities and, in the case of *Viscum album*, from different European countries. Despite high pairwise genetic distances of the investigated samples, it was still possible to recognise an affiliation of samples to particular populations. Significant differences between populations supported the closer affinity of both Czech localities with genetic overlapping due to their insufficient spatial separation and relatively long dispersal mode of spreading seeds by birds, while the Spanish population was distinctly separated. On the other hand, the *Triticum aestivum* varieties had a very small proportion of polymorphic bands, which is expected given the origin of the material.



Compared to Fay et al. (2005), who used the enzyme combination *EcoRI*+*MseI* with six selective nucleotides for species with genome size ranges up to 32 Gb, we detected only a limited number of common fragments for all individuals of the same species. Moreover, the bands were well amplified and distinguishable from background, even for the *Viscum album* samples (Fig. 1); not only did we detect a decrease in genetic variability for the species with large genomes but the variability reflected the heterogenic origin of the samples.

In comparison with previously published optimisations (Han et al. 1999; Remington et al. 1999; Costa et al. 2000; Guan & Shiraishi 2011), the application of restriction enzymes that recognise 8-base pair sequences followed by selective amplification with primers containing +6 selective bases (+3 per primer) generates better analysable AFLP profiles with low background and less numerous but stronger bands that are less affected by size homoplasy.

### **Acknowledgements**

We thank Roman Gebauer, Pavel Hanáček, Vladimír Janeček, Alexander Kohutka, Radomír Řepka, Tomáš Vyhnánek and the Limagrain Central Europe Cereals breeding station PLANT SELECT for providing the plant material, and Radomír Řepka and Petr Koutecký (University of South Bohemia in České Budějovice (CZ), Faculty of Science) for information regarding genome sizes in *Gymnocalycium*. We thank IGA LDF Mendel University in Brno for their financial support of this study via project no. 11/2013.

### **References**

- Akaike H (1974) A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control*, **19**, 716–723.
- Bates D, Maechler M, Bolker B and Walker S (2014). lme4: Linear mixed-effects models using Eigen and S4. R package version 1.1-6. <http://CRAN.R-project.org/package=lme4>

Bennett MD, Leitch IJ (1995) Nuclear DNA Amounts in Angiosperms. *Annals of Botany*, **76**, 113–176.

Bennett MD, Leitch IJ (2011) Nuclear DNA amounts in angiosperms: targets, trends and tomorrow. *Annals of Botany*, **107**, 467–590.

Bennett MD, Leitch IJ (2012) Plant DNA C-values Database (Release 6.0, Dec. 2012) <http://data.kew.org/cvalues/>.

Boscari E, Barmintseva A, Pujolar JM et al. (2014) Species and hybrid identification of sturgeon caviar: a new molecular approach to detect illegal trade. *Molecular Ecology Resources*, **14**, 489–98.

Costa P, Pot D, Dubos C et al. (2000) A genetic map of Maritime pine based on AFLP, RAPD and protein markers. *Theoretical and Applied Genetics*, **100**, 39–48.

Díaz V, Muñoz LM, Ferrer E (2001) Random amplified polymorphic DNA and amplified fragment length polymorphism assessment of genetic variation in Nicaraguan populations of *Pinus oocarpa*. *Molecular Ecology*, **10**, 2593–603.

Ellis R, McNichol J, Baird E et al. (1997) The use of AFLPs to examine genetic relatedness in barley. *Molecular Breeding*, **3**, 359–369.

Fay MF, Cowan RS, Leitch IJ (2005) The effects of nuclear DNA content (C-value) on the quality and utility of AFLP fingerprints. *Annals of Botany*, **95**, 237–46.

Grime JP, Shacklock JML, BandSR (1985) Nuclear DNA contents, shoot phenology and species co-existence in a limestone grassland community. *New Phytologist*, **100**, 435–445.

Guan L, Shiraishi S (2011) Improved AFLP protocol using dual-suppression PCR and its application to species with large genomes. *Molecular Ecology Resources*, **11**, 854–61.

Guillot G, Santos F (2010) Using AFLP markers and the Geneland program for the inference of population genetic structure. *Molecular Ecology Resources*, **10**, 1082–4.

Han TH, van Eck HJ, De Jeu MJ, Jacobsen E (1999) Optimization of AFLP fingerprinting of organisms with a large-sized genome: a study on *Alstroemeria* spp. *Theoretical and Applied Genetics*, **98**, 465–471.

Hazen SP, Leroy P, Ward RW (2002) AFLP in *Triticum aestivum* L.: Patterns of genetic diversity and genome distribution. *Euphytica*, **125**, 89–102.

Huys G, Coopman R, Janssen P, Kersters K (1996) High-resolution genotypic analysis of the genus *Aeromonas* by AFLP fingerprinting. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **46**, 572–580.

Jin H, Domier LL, Kolb FL, Brown CM (1998) Identification of quantitative Loci for tolerance to barley yellow dwarf virus in oat. *Phytopathology*, **88**, 410–5.

Joyner KL, Wang X-R, Johnston JS, Price HJ, Williams CG (2001) DNA content for Asian pines parallels New World relatives. *Canadian Journal of Botany*, **79**, 192–196.

Khrustaleva LI, de Melo PE, van Heusden AW, Kik C (2005) The integration of recombination and physical maps in a large-genome monocot using haploid genome analysis in a trihybrid *Allium* population. *Genetics*, **169**, 1673–1685.

Koopman WJM, Gort G (2004) Significance tests and weighted values for AFLP similarities, based on *Arabidopsis* in silico AFLP fragment length distributions. *Genetics*, **167**, 1915–1928.

Koopman WJM, Wissemann V, De Cock K et al. (2008) AFLP markers as a tool to reconstruct complex relationships: A case study in *Rosa* (*Rosaceae*). *American Journal of Botany*, **95**, 353–366.

Lepais O, Weir J (2014) SimRAD: Simulations to predict the number of loci expected in RAD and GBS approaches. R package version 0.95. <http://CRAN.R-project.org/package=SimRAD>

Lasso E (2008) The importance of setting the right genetic distance threshold for identification of clones using amplified fragment length polymorphism: a case study with five species in the tropical plant genus *Piper*. *Molecular Ecology Resources*, **8**, 74–82.

Lerceteau E, Szmidt AE (1999) Properties of AFLP markers in inheritance and genetic diversity studies of *Pinus sylvestris* L. *Heredity*, **82**, 252–260.

Lu J, Knox MR, Ambrose MJ, Brown JK, Ellis TH (1996) Comparative analysis of genetic diversity in pea assessed by RFLP- and PCR-based methods. *Theoretical and Applied Genetics*, **93**, 1103–11.

Marie D, Brown SC (1993) A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species. *Biology of the Cell*, **78**, 41–51.

Mott IW, Wang RR-C (2012) Genetic variation among laboratory accessions of Chinese Spring wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Genetic Resources*, **10**, 97–100.

Mueller UG, Wolfenbarger LL (1999) AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends in Ecology & Evolution*, **14**, 389–394.

Nagl W, Jeanjour M, Kling H, Kühner S, Michels I, Müller T, Stein B (1983) Genome and chromatin organization in higher plants. *Biologisches Zentralblatt*, **102**, 129–148.

Nakamatte E, Lye KA (2007) AFLP-based differentiation in north Atlantic species of *Carex* sect. *Phacocystis*. *Nordic Journal of Botany*, **25**, 318–328.

Paglia G, Morgante M (1998) PCR-based multiplex DNA fingerprinting techniques for the analysis of conifer genomes. *Molecular Breeding*, **4**, 173–177.

Paul S, Wachira FN, Powell W, Waugh R (1997) Diversity and genetic differentiation among populations of Indian and Kenyan tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) revealed by AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics*, **94**, 255–263.

Peakall R, Smouse PE (2012) GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics*, **28**, 2537-2539.

Perrie LR, Shepherd LD (2009) Reconstructing the species phylogeny of *Pseudopanax* (*Araliaceae*), a genus of hybridising trees. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **52**, 774–83.

Qi X, Lindhout P (1997) Development of AFLP markers in barley. *Molecular & General Genetics MGG*, **254**, 330–336.

R Core Team (2013) R: A language and environment for statistical computing. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>. *R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria*.

Redoña ED, Mackill DJ (1996) Molecular mapping of quantitative trait loci in japonica rice. *Genome*, **39**, 395–403.

Remington DL, Whetten RW, Liu BH, O'Malley DM (1999) Construction of an AFLP genetic map with nearly complete genome coverage in *Pinus taeda*. *Theoretical and Applied Genetics*, **98**, 1279–1292.

Shoaib A, Arabi MIE (2006) Genetic Diversity among Syrian Cultivated and Landraces Wheat Revealed by AFLP Markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **53**, 901–906.

Vekemans X, Beauwens T, Lemaire M, Roldán-Ruiz I (2002) Data from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers show indication of size homoplasy and of a relationship between degree of homoplasy and fragment size. *Molecular Ecology*, **11**, 139–151.

Vieira EA, Carvalho FIF de, Bertan I et al. (2007) Association between genetic distances in wheat (*Triticum aestivum* L.) as estimated by AFLP and morphological markers. *Genetics and Molecular Biology*, **30**.

Vos P, Hogers R, Bleeker M et al. (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, **23**, 4407–14.

#### **Data Accessibility**

Examples of AFLP profiles in .fsa files and R script with all calculations: DRYAD entry

doi:10.5061/dryad.mf278

#### **Author contributions**

Petra Veselá performed the experiments, analysed the data, generated the figures, and wrote the paper.

Daniel Volařík performed and described the statistical analyses and simulations.

Jaroslav Mráček designed the experiments and wrote the paper.

**Table 1.** Primers and adapters

<i>Sbf</i> I-adapter1	5'-CTCGTAGACTGCGTAGGTGCA-3'
<i>Sbf</i> I-adapter2	5'-CCTACGCAGTCTAC-3'
<i>Asc</i> I-adapter1	5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'
<i>Asc</i> I-adapter2	5'-CGCGGGTACGCAGTCTAC-3'
<i>Asc</i> I+0	5'-GACTGCGTACCCGCGCC-3'
<i>Eco</i> RI+0	5'-GACTGCGTACCAATTC-3'
<i>Sbf</i> I+0	5'-GACTGCGTAGGTGCAGG-3'
<i>Mse</i> I+0	5'-GATGAGTCCTGAGTAA-3'

**Table 2.** Genome sizes and ploidy levels of the analysed organisms (according to Bennett & Leitch (2012) and Řepka R. & Koutecký P. (unpublished data))

Species	Ploidy level	Genome size 1C (Gb)	Original data source
<i>Viscum album</i>	2n	74.3	Marie and Brown 1993
<i>Galanthus nivalis</i>	2n	35.3	Bennett and Leitch 2011
<i>Pinus pumila</i>	2n	27.4	Joyner et al. 2001
<i>Triticum aestivum</i>	6n	17.4	Bennett and Leitch 1995
<i>Gymnocalycium sanluisense</i>	6n	6	Řepka & Koutecký, unpublished data
<i>Gymnocalycium nataliae</i>	4n	4.1	Řepka & Koutecký, unpublished data
<i>Gymnocalycium lukasikii</i>	2n	2	Řepka & Koutecký, unpublished data
<i>Carex panicea</i>	2n	1	Grime et al. 1985

**Table 3.** The average number of amplified fragments. Data were calculated using the primer combinations of *Sbf*I+3/*Mse*I+2 and *Asc*I+3/*Mse*I+2, *Sbf*I+3/*Mse*I+3 and *Asc*I+3/*Mse*I+3, and *Sbf*I+3/*Mse*I+4 and *Asc*I+3/*Mse*I+4 for columns +5, +6, and +7.

Species	Number of detected fragments			Fragment reduction between +5 and +6
	+5	+6	+7	
<i>Viscum album Asc</i> I	129	44	-	34.11 %
<i>Viscum album Sbf</i> I	136	51	49	37.50 %
<i>Galanthus nivalis Sbf</i> I	59	19	-	31.20 %
<i>Pinus pumila Sbf</i> I	125	45	43	36.00 %
<i>Triticum aestivum Sbf</i> I	94	29	-	30.85 %
<i>Gymnocalycium sanluisense Sbf</i> I	50	14	-	28.00 %
<i>Gymnocalycium nataliae Sbf</i> I	46	13	-	28.26 %
<i>Gymnocalycium lukasikii Sbf</i> I	36	10	-	27.78 %



**Table 4.** The observed size homoplasmy, as calculated for *Sbf*I+3/*Mse*I+2 and *Asc*I+3/*Mse*I+2 by comparisons with combinations containing one additional selective base (A, T, C, or G) in the *Mse*I primer. The +6 columns (primers *Sbf*I+3/*Mse*I+3 and *Asc*I+3/*Mse*I+3) indicate the number of fragments that were detected in 1, 2, 3 or all 4+6 primer combinations.

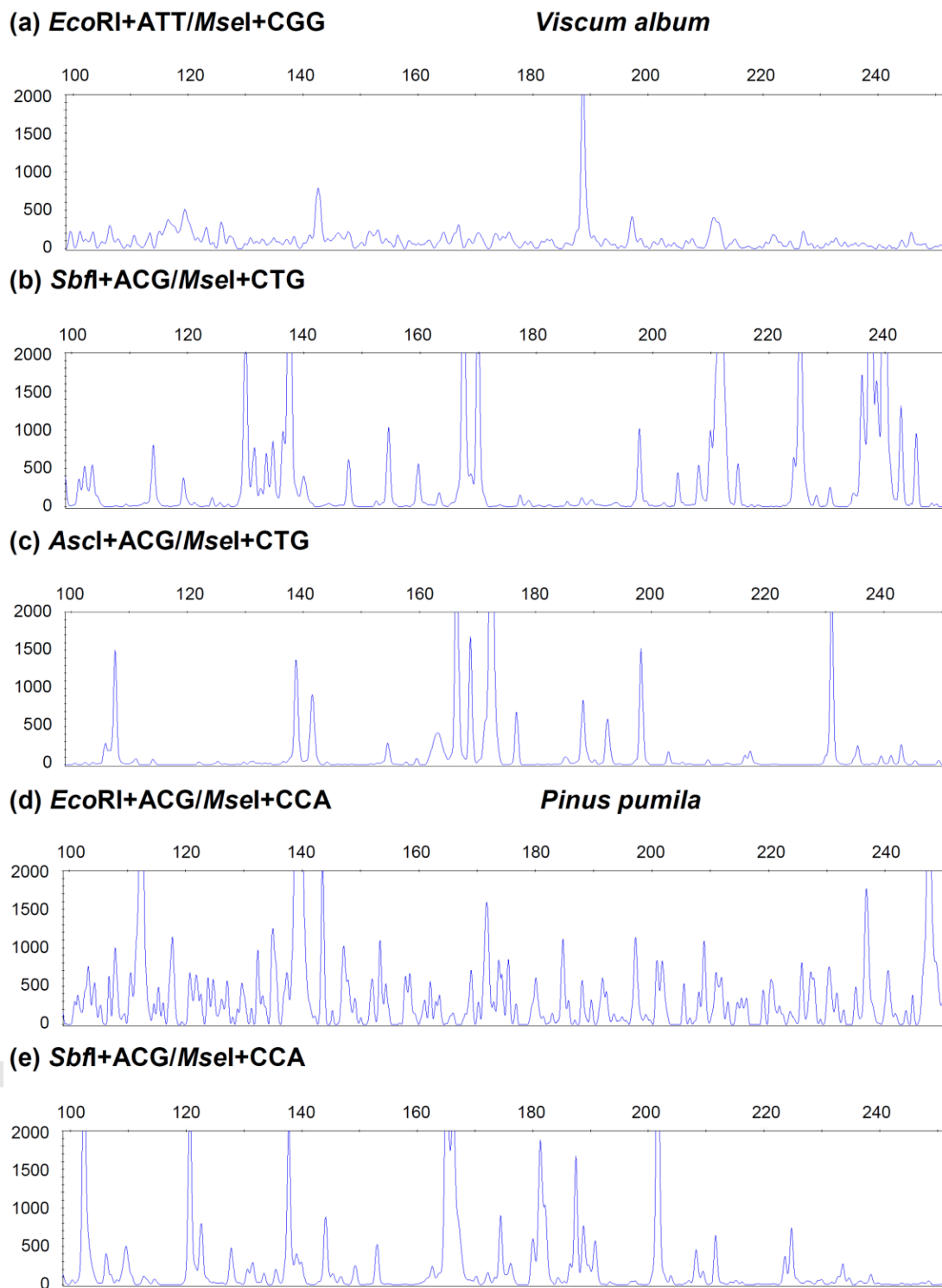
Species	Number of detected fragments					Size homoplasmy			
	+5	+6				Minimal fragment size (bp)			
		1x	2x	3x	4x	50	80	100	125
<i>Viscum album Sbf</i> I	136	82	42	9	3	39.9 %	37.1 %	35.5 %	33.6 %
<i>Viscum album Asc</i> I	129	94	28	5	3	27.4 %	26.3 %	24.2 %	24.6 %
<i>Galanthus nivalis Sbf</i> I	59	43	14	2	0	26.5 %	26.3 %	25.0 %	25.3 %
<i>Pinus pumila Sbf</i> I	125	83	31	7	4	33.7 %	30.7 %	29.5 %	27.1 %
<i>Triticum aestivum Sbf</i> I	94	76	17	2	1	19.7 %	17.8 %	14.5 %	13.5 %
<i>Gymnocalycium sanluisense Sbf</i> I	50	45	4	1	1	9.2 %	7.8 %	7.1 %	7.8 %
<i>Gymnocalycium nataliae Sbf</i> I	46	36	5	0	0	9.9 %	8.9 %	6.9 %	8.2 %
<i>Gymnocalycium lukasikii Sbf</i> I	36	33	2	1	0	8.5 %	7.9 %	7.1 %	4.1 %

**Table 5.** Intraspecific variability in several species with large genomes. AFLP was performed using the *Sbf*I+ACG primer with the *Mse*I primer listed in the table.

Species	No. of samples	<i>Mse</i> I primer	Percentage of polymorphic bands	Pairwise genetic distance
<i>Viscum album</i> <sup>1</sup>	29	<i>Mse</i> I+CCA	97.0 %	40.0 %-84.4 %
<i>Viscum album</i> <sup>1</sup>	29	<i>Mse</i> I+CCT	96.9 %	41.7 %-85.7 %
<i>Galanthus nivalis</i> <sup>1</sup>	8	<i>Mse</i> I+CTG	65.0 %	18.2 %-53.3 %
<i>Galanthus nivalis</i> <sup>1</sup>	8	<i>Mse</i> I+CCA	84.2 %	36.1 %-66.7 %
<i>Pinus pumila</i> <sup>1</sup>	8	<i>Mse</i> I+CTT	98.1 %	42.2 %-90.7 %
<i>Pinus pumila</i> <sup>1</sup>	8	<i>Mse</i> I+CCT	97.8 %	36.8 %-94.5 %
<i>Triticum aestivum</i>	8	<i>Mse</i> I+CTA	27.7 %	0.0 %-21.0 %
<i>Triticum aestivum</i>	8	<i>Mse</i> I+CCT	37.7 %	0.0 %-28.6 %

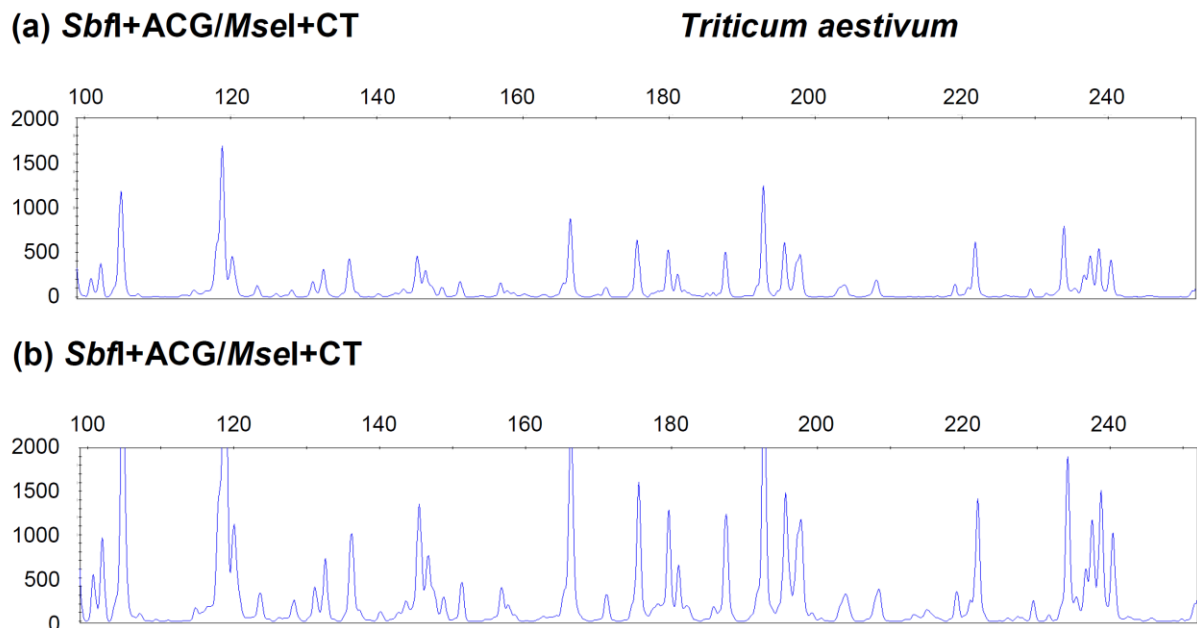
<sup>1</sup>To eliminate errors, data for each sample were generated from two independent experiments

**Fig. 1.** Effects of the restriction enzymes applied to *Viscum album* and *Pinus pumila*:



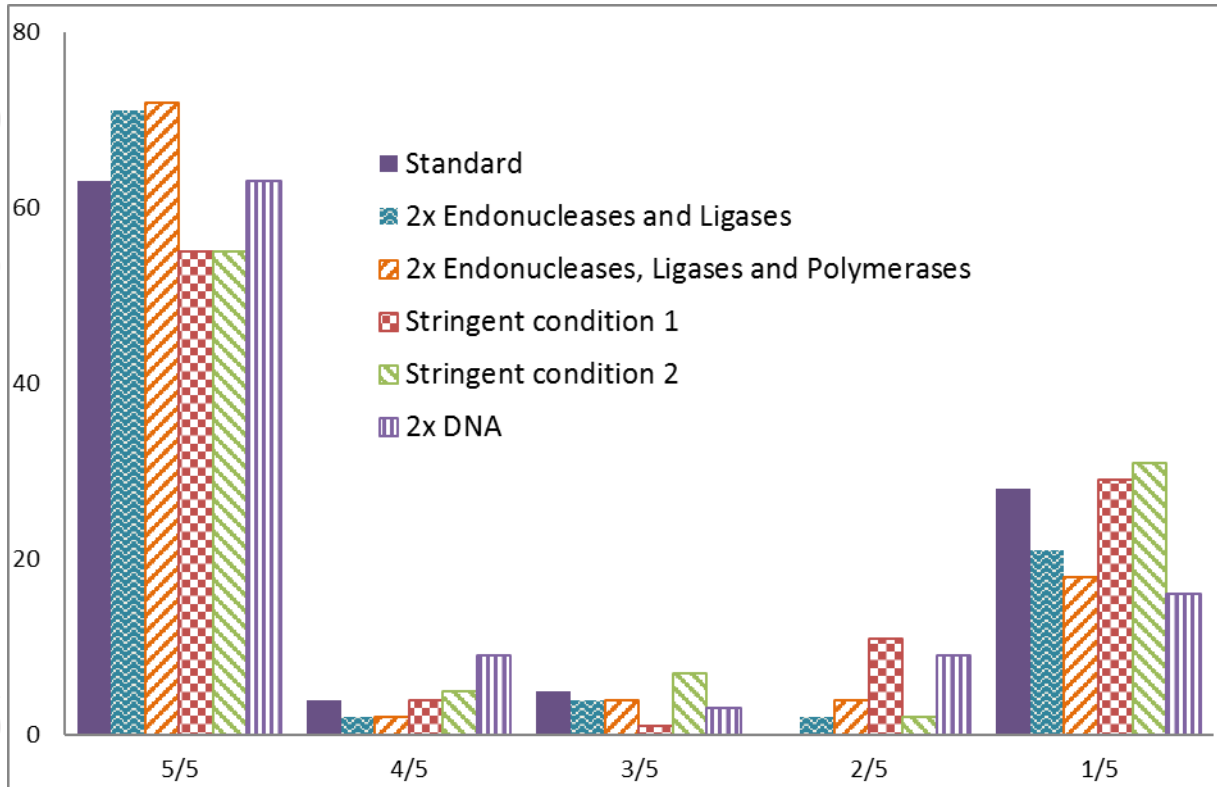
The electrophoretic profiles generated with different combinations of restriction endonucleases. a) *EcoRI+ATT/MseI+CGG*, b) *SbfI+ACG/MseI+CTG*, and c) *Ascl+ACG/MseI+CTG* show the profiles from *Viscum album*; d) *EcoRI+ACG/MseI+CCA* and e) *SbfI+ACG/MseI+CCA* show the profiles from *Pinus pumila*.

**Fig. 2.** The positive effect of adding a higher polymerase concentration



Electrophoretic profiles of *Triticum aestivum* were generated with *Sbf*I and *Mse*I. a) The profile after selective amplification with the *Sbf*I+ACG/*Mse*I+CT selective nucleotides; b) the profile produced using the *Sbf*I+ACG/*Mse*I+CT selective nucleotides and a 2-fold higher concentration of polymerase in the selective amplification.

**Fig. 3.** The effect of different conditions on reproducibility



The values 1/5, 2/5, 3/5, 4/5, and 5/5 represent the appearance of fragments in 5 independent replicates of a *Viscum album* sample using *Ascl*+A/*MseI*+C for the pre-amplification (in stringent variants *Ascl*+A/*MseI*+CT) and the *Ascl*+ACG/*MseI*+CTG primer combination for amplification. This figure is representative of the level of reproducibility of the different variants.

Fig. 4. The impact of minimal fragment size on size homoplasy

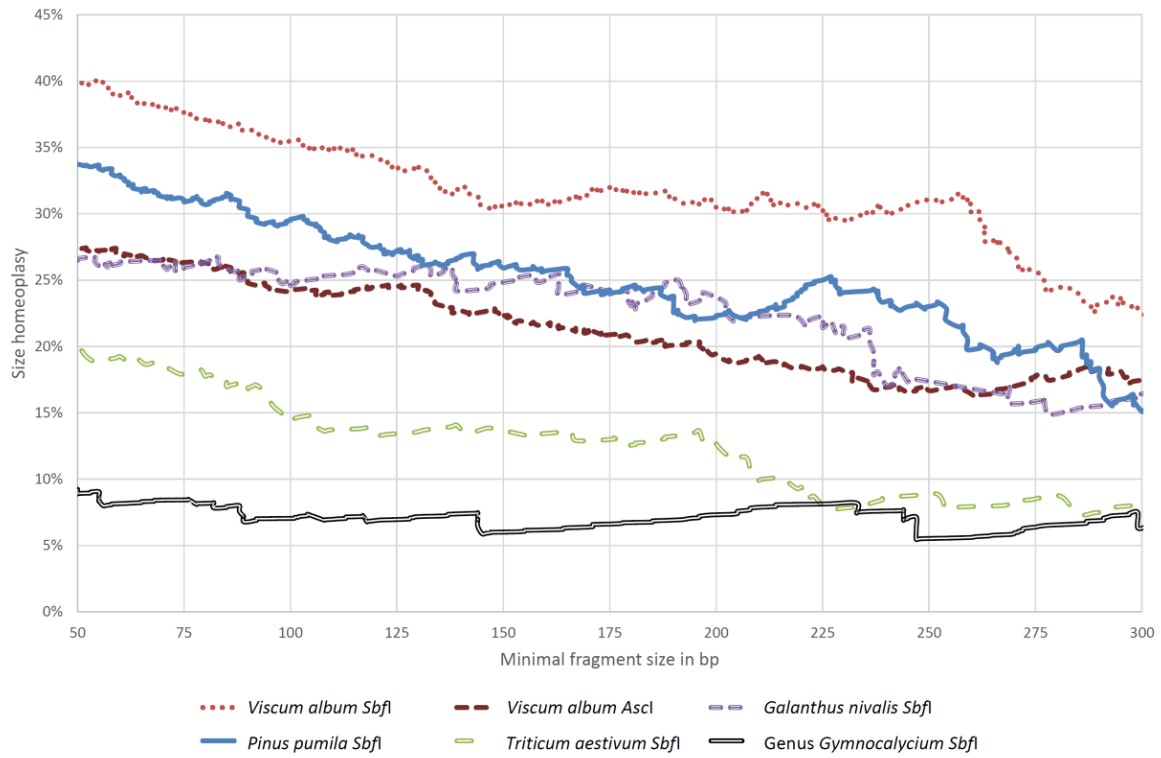
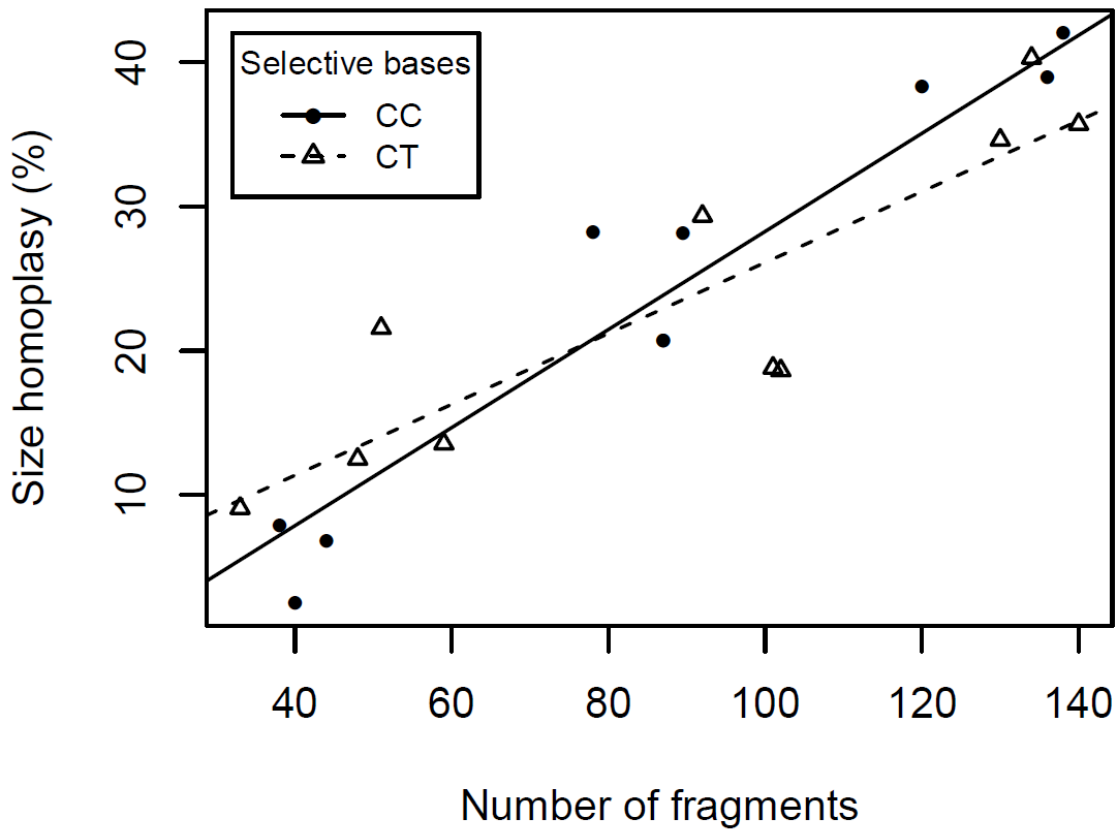
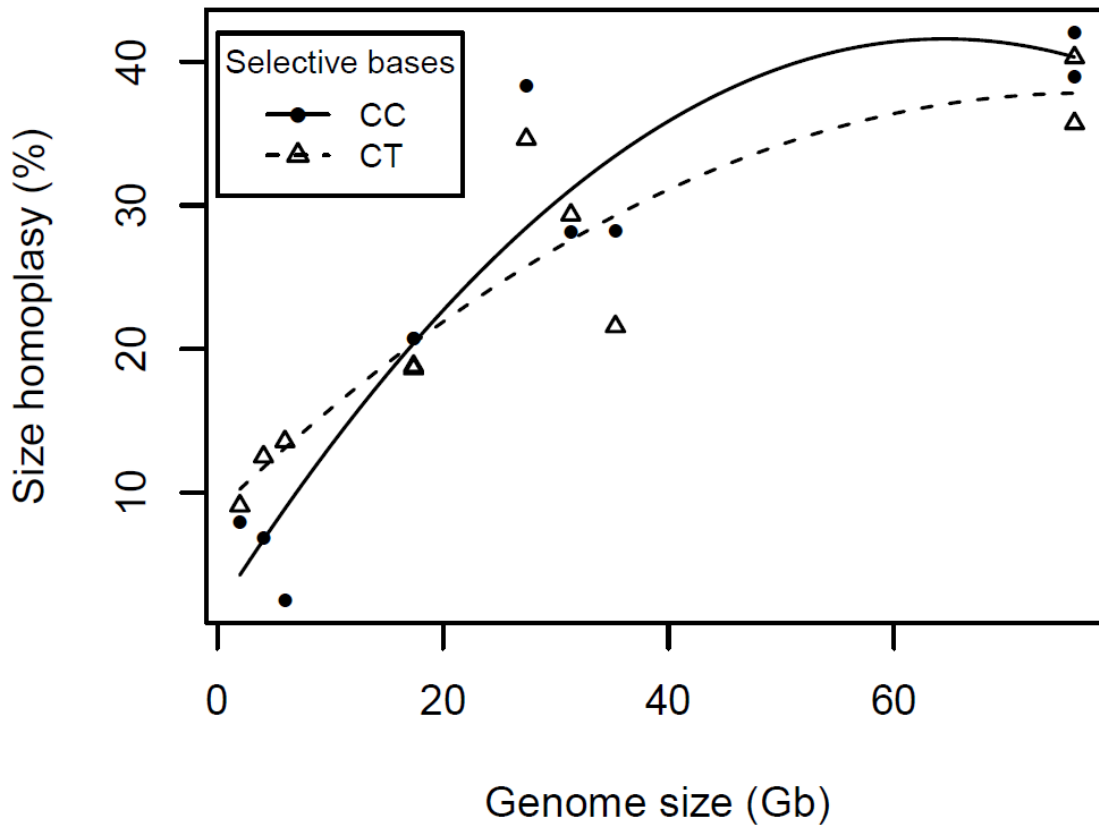


Fig. 5. The relationship between size homoplasmy and the number of fragments with *Sbf*I+ACG/*Mse*I+2 for two different *Mse*I primers with the selective bases CC and CT

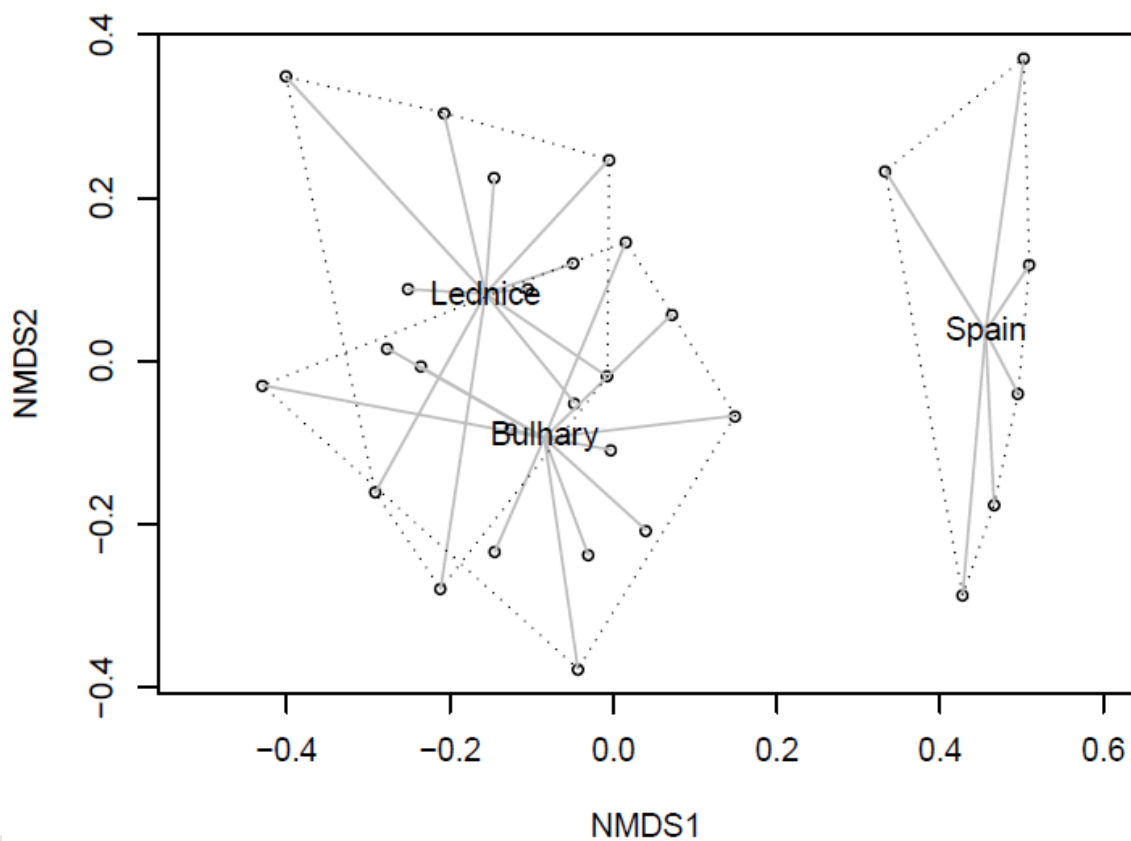


**Fig. 6.** The relationship between size homoplasy and genome size for 2 different *MseI* primers with the selective bases CC and CT





**Fig. 7.** Ordination plot using AFLP data for *Viscum album* samples showing the separation of samples from 3 different populations, specifically, 2 geographically very close regions (Lednice and Bulhary) and 1 geographically distant region (Spain). Points (small circles) represents samples, solid grey lines (spider plot) are connecting samples from the same population. AFLP data were obtained using the AFLP protocol optimised for large genomes.



II. Are there hybrids between *Carex flacca* and *C. tomentosa* in the Czech Republic and Slovakia?

Publikováno: *Preslia*

## Are there hybrids between *Carex flacca* and *C. tomentosa* in the Czech Republic and Slovakia?

Vyskytují se v České republice a na Slovensku kříženci mezi *Carex flacca* a *C. tomentosa*?

Radomír Řepka, Petra Veselá & Jaroslav Mráček

Department of Forest Botany, Dendrology and Geobiocenology, Faculty Forestry and Wood Technology, Mendel University, Zemědělská 3, CZ-613 00 Brno, Czech Republic; e-mail: repka@mendelu.cz; petra.vesela@mendelu.cz, mracek@mendelu.cz

Řepka R., Veselá P. & Mráček J. (2014): Are there hybrids between *Carex flacca* and *C. tomentosa* in the Czech Republic and Slovakia? – Preslia 86: 367–379.

At two sites in the Czech Republic and Slovakia we found plants morphologically intermediate between *Carex flacca* subsp. *flacca* and *C. tomentosa*. Here we present the results of morphological and molecular analyses conducted to test whether these plants are the putative hybrid *C. ×danielis* (*C. flacca* subsp. *flacca* × *C. tomentosa*). The results revealed a conflict between the morphological characters and molecular markers. Although morphological characters show combinations of characters of the supposed parents and some intermediate characters, molecular markers (ITS, AFLP, *trnL-F*) indicate that the putative hybrid clearly belongs to one of its presumed parents, *C. flacca* subsp. *flacca*. These results refute reports of this hybrid occurring in the Czech Republic and Slovakia.

**Key words:** AFLP, *Cyperaceae*, Czech Republic, *Carex ×danielis*, *Carex flacca* subsp. *flacca*, *Carex tomentosa*, ITS, Slovakia, *trnL-F*

### Introduction

The genus *Carex* is taxonomically quite difficult due to the morphological similarities of its representatives, with some taxa having wide intraspecific morphological variability and interspecific hybridization occurring relatively frequently (Stace 1986, Kukkonen & Toivonen 1988). From an historical perspective, there has been an increase in the recognition of *Carex* hybrids because of increased exploration of the genus (Cayouette & Catling 1992). Thus, for Europe, Focke (1881) cites 24 *Carex* hybrids and only ~20 years later, Ascherson & Graebner (1902) 96 hybrids. Kükenthal (1909), in the first world monograph on this genus, includes 141 hybrids, seven of which are newly described. The number of hybrids has continued to increase up to the present, with Koopman (2011) citing 300 *Carex* hybrids in Europe, of which 174 have binomial names and the other 126 are only represented by hybrid formulae. There are a significant number of *Carex* hybrids in the world's floras; however, most of them are concentrated in only a few sections of the genus, primarily sections *Ceratocystis*, *Glareosae*, *Paludosae*, *Phacocystis* and *Vesicariae* (Cayouette & Catling 1992). In the Czech Republic, 29 hybrids are documented by herbarium specimens and another 66 only cited in the literature. The highest numbers of *Carex* hybrids in the Czech flora are found in sections *Ceratocystis* and *Phacocystis*. Some hybrids in these sections are the most frequent nothospecies in the Czech Republic (*C. ×alsatica* Zahn and *C. ×turfosa* Fr.; V. Grulich & R. Řepka, unpublished data).

In the present paper, we investigate whether plants that we collected in the Czech Republic and Slovakia that are morphologically intermediate between *C. flacca* and *C. tomentosa* are in fact hybrids of these two species. Only a few publications mention the hybrid *C. flacca* Schreb. × *C. tomentosa* L. *Carex glauca* × *tomentosa* is presented with a question mark in Ascherson & Graebner (1902), who state that Brügger, Kneucker and Kükenthal found this hybrid near Zürich, Karlsruhe and Coburg. Kükenthal (1890) gave the hybrid *C. glauca* × *C. tomentosa* the binomial name *C. ×brückneri*. Subsequently, Kükenthal (1909) does not refer to *C. ×brückneri* and only states in an endnote to *C. glauca* that the hybrid with *C. tomentosa* is dubious; Koopman (2011), much later, considers *C. ×brückneri* to be synonymous with *C. tomentosa*. Lévêillé (1912) gave the combination *C. glauca* × *C. tomentosa* the binomial name *C. ×danielis*. The protologue for *C. ×danielis* H. Lév. is very short and provides only the following information: “vegetative parts like *C. glauca*; bluish perigynia, spikelets and perigynium hairs like *C. tomentosa*; locus classicus Mayenne: Saulges, road to Cossé” (Lévêillé 1912). Despite the conciseness of the protologue it appears that the plant described had vegetative organs resembling those of *C. flacca*, but with perigynia and spikelets resembling those of the other parental species, *C. tomentosa*.

More recent European floras or keys either do not mention this hybrid (e.g. Luceño 1994, Egorova 1999, Ciocârlan 2000, Jermy et al. 2007, Fischer et al. 2008, Király 2009) or only repeat Lévêillé’s description of the hybrid in France. Finally, Koopman (2011) lists *C. ×danielis* among accepted nothospecies and presents a distribution map that indicates it occurs in four European countries: France and Belgium (based on Lambignon et al. 1992, 1998), Czech Republic (based on R. Řepka, pers. comm.) and Estonia (based on Kuusk et al. 2003). The existence of the hybrid *C. ×danielis* is also mentioned in the manuscript of Vol. 9 of the Flora of the Czech Republic (V. Grulich & R. Řepka, unpublished) and Danihelka et al. (2012) include it in the checklist of the Czech flora.

Classification based only on morphology cannot represent all genetic relationships and similarities (Schmid 1983). Moreover, in the case of *Carex*, morphological studies of the *C. flava* group have revealed variation in morphological characters that cannot be explained exclusively in terms of genetic variation or hybridogenous introgression (Blackstock & Ashton 2010). In addition, some of the characters traditionally used in genus *Carex* may also be environmentally induced (Schmid 1983, Hedrén 1998, Blackstock & Ashton 2010). More generally, in recent decades, the issues of intermediate phenotypes and high phenotypic variability have been subjects of extensive taxonomic discussion (Hedrén 1998, van Droogenbroeck et al. 2006, Lihová et al. 2007, Korpelainen et al. 2010, Jimenes-Mejías et al. 2011, 2014). Therefore, a combination of morphological studies and molecular techniques is a useful way of addressing taxonomic and phylogenetic questions, especially those related to hybridization (Blackstock & Ashton 2010). In vascular plants, molecular markers have proved to be reliable in determining hybrid status, with the AFLP (amplified fragment length polymorphism) technique successfully used to identify hybrid origins of populations in such genera as *Salix* (Beismann et al. 1997), *Aconitum* (Suh et al. 1997), *Magnifera* (Teo et al. 2002) and *Schoenus* (Scotti et al. 2002).

Combinations of different molecular markers, e.g. AFLP, ITS (internal transcribed spacer), cpDNA and mtDNA markers with morphometric or cytological data appear to be especially useful for identifying hybridization and interspecific gene flow (Scotti et al.

2002, Kaplan & Fehrer 2004, 2006, 2009, van Droogenbroeck et al. 2006, Lihová et al. 2007, Kaplan et al. 2009, Galbany-Casals et al. 2012).

In the genus *Carex* molecular markers have been used in some research on hybridization. Based on AFLP data for *Carex* sect. *Phacocystis* Nakamatte & Lye (2007) suggest that *C. bigelowii* subsp. *rigida* W. Schultze-Motel is either a separate species or potential hybrid. A combination of AFLP and restriction-site data revealed that genetic variation in *C. hirsutella* Mack. is relatively high and that it is possibly a consequence of gene flow between this species and one or more other species (Smith & Waterway 2008). In another publication, ITS sequences are used to support the idea that *C. paleacea* Wahlenb. × *C. recta* Boott includes genes from more species than the previously supposed parental species (Korpelainen et al. 2010). Notably, Jiménez-Mejías et al. (2011) reject interspecific hybridization and subsequent clonal reproduction as the source of the individuals they studied from *Carex* sect. *Phacocystis*. Indeed, it is suggested that dissimilarities in morphological and genetic variation e.g. in *Cardamine* polyploids (Lihová et al. 2007) or *Carex* sect. *Phacocystis* (Jiménez-Mejías et al. 2011) need to be reevaluated in the case of taxonomic assignments relying only upon morphological features.

In 2010, we identified a total of 11 plants from two localities that were morphologically intermediate between *C. flacca* and *C. tomentosa*. These plants were morphologically analysed, and showed several intermediate or aberrant (unique) characters. Here we test the hypothesis that plants in the Czech Republic and Slovakia morphologically intermediate between these two *Carex* taxa are the hybrid *C. flacca* × *C. tomentosa* (*C. cf.* × *danielis*). We do this by examining both the morphological evidence for the hybrid status of such specimens and conducting molecular studies to compare the presumed hybrid and parental taxa.

## Materials and methods

### Material

In total, we studied 12 populations (four *C. flacca*, four *C. tomentosa* and four *C. cf.* × *danielis*) at two localities in the Czech Republic and Slovakia at which we had collected putative hybrids. The presumed hybrid plants collected at the Czech locality (Nevojice) came from three micropopulations (polycormons). We only used 1–11 specimens from each population (see Table 1 and Electronic Appendix 1) as there was little material available. In addition, we incorporated the morphological data of the parental species used in species descriptions of 40–93 specimens collected from the whole of the country in a manuscript submitted to the Flora of the Czech Republic. All the vouchers studied were deposited in the BRNL herbarium unless specified otherwise.

Samples dried using silica gel were used for the molecular analyses (Table 1). To identify species-specific markers, the samples for molecular analyses were selected to detect maximum intraspecific variability; therefore, we used samples not only from the two locations in the Czech Republic and Slovakia but also from geographically independent areas (Bulgaria and Romania). We also successfully used 30-yr old *C. cf.* × *danielis* herbarium material in the ITS analyses (*C. cf.* × *danielis*4 – 1984 Sutorý, BRNM, see Table 1).

Table 1. – List of the specimens of *Carex* used in the morphological and molecular analyses. Samples were used for M – morphological analyses, C – chloroplast sequencing, I – ITS sequencing, A – AFLP genotyping.

Taxon	Analysis	Locality
<i>C. flacca</i> subsp. <i>flacca</i> (1a)	M C I A	CZ, southern Moravia, Nevojice, subxerophilous grassy slope at end of valley about 2.5 km N of the village, 294 m a.s.l.; GPS 49°08'54.2" N, 17°02'08.4" E
<i>C. flacca</i> subsp. <i>flacca</i> (1b)	M	CZ, southern Moravia, Nevojice, subxerophilous grassy slope at end of valley about 2.5 km N of the village, 294 m a.s.l.; GPS 49°08'54.8" N, 17°02'09.0" E
<i>C. flacca</i> subsp. <i>flacca</i> (1c)	M	CZ, southern Moravia, Nevojice, grassy slope at end of valley about 2.5 km N of the village, 300 m a.s.l. (1984 Sutorý, BRNM)
<i>C. flacca</i> subsp. <i>flacca</i> (2)	A	CZ, White Carpathians, Velká nad Veličkou, subxerophilous grassland in Zahrady pod Hájem Nature Reserve, E of the village, 356 m a.s.l. GPS 48°53'23.0" N, 17°31'84.0" E
<i>C. flacca</i> subsp. <i>flacca</i> (3)	M C I A	SK, White Carpathians, Chvojnica – Martišovci settlement, moist spring area directly above the uppermost house in the settlement, 440 m a.s.l., GPS 48°47'23.7" N, 17°24'23.7" E
<i>C. flacca</i> subsp. <i>flacca</i> (4)	A	CZ, southern Moravia, Brno-Líšeň, on bank of reservoir in Mariánské údolí valley, 2.3 km NE of the town hall (2006 Hralová & Bureš, BRNU), 250 m a.s.l., GPS 49° 13'14.8" N, 16° 42'49.4" E
<i>C. flacca</i> subsp. <i>erythrostachys</i>	A	BG, Varna, Emona (near Cape Emine), undergrowth of thermophilic oak forest above sandy beach, Irakli, 2.5 km N of the cape, 8 m a.s.l., GPS 42°44'60.8" N, 27°53'42.0" E
<i>C. tomentosa</i> (1a)	M C I A	CZ, southern Moravia, Nevojice, subxerophilous grassy slope at end of valley about 2.5 km N of the village, 294 m a.s.l., GPS 49°08'54.2" N, 17°02'08.4" E
<i>C. tomentosa</i> (1b)	M	CZ, southern Moravia, Nevojice, subxerophilous grassy slope at end of valley about 2.5 km N of the village, 294 m a.s.l., GPS 49°08'54.8" N, 17°02'09.0" E
<i>C. tomentosa</i> (1c)	M	CZ, South Moravia, Nevojice, grassy slope at end of valley about 2.5 km N of the village, 300 m a.s.l., (1984 Sutorý, BRNM)
<i>C. tomentosa</i> (2)	M C I A	SK, White Carpathians, Chvojnica – settlement named Martišovci, moist spring area directly above the upper house in the settlement, 440 m a.s.l., GPS 48°47'23.7" N, 17°24'23.7" E
<i>C. tomentosa</i> (3)	A	ROM, Banat, Sfanta Elena, <i>Quercus cerris</i> forest, 300 m from the village, 355 m a.s.l., GPS 44°40'89.0" N, 21°22'39.0" E
<i>C. cf. xdanielis</i> (1)	M C I A	CZ, southern Moravia, Nevojice, subxerophilous grassy slope at end of valley N of the village, first population, 298 m a.s.l., GPS 49°08'54.2" N, 17°02'08.4" E
<i>C. cf. xdanielis</i> (2)	M C I A	CZ, southern Moravia, Nevojice, subxerophilous grassy slope at end of valley N of the village, second population, 50 m from (1), 292 m a.s.l., GPS 49°08'54.8" N, 17°02'09.0" E
<i>C. cf. xdanielis</i> (3)	M C I A	SK, White Carpathians, Chvojnica – Martišovci settlement, damp spring area, directly above the uppermost house in the settlement, 440 m a.s.l., GPS 48°47'23.7" N, 17°24'23.7" E
<i>C. cf. xdanielis</i> (4)	M I	CZ, southern Moravia, Nevojice, grassy slope at end of valley about 2.5 km N of the village, 300 m a.s.l. (1984 Sutorý, BRNM)

### *Morphological study*

The herbarium specimens of the presumed hybrid and its parent species, *C. flacca* and *C. tomentosa*, were used to measure 12 quantitative features (stem height and diameter, length and width of leaves, length of inflorescence, length of lower bract, length and width of male spike, length and width of female spike, number of female spikes, length of peduncle of female spike, length of female glume, length and width of perigynium, and length of perigynium beak) and 10 qualitative features (type of rhizome, leaf colouring, male spike: shape and colour, female spike position, perigynium shape and colour, perigynium hairs, perigynium beak features, fertility). The plants from populations labelled as “presumed hybrid” were preliminarily identified as *C. cf. ×danielis* based on the following characters: shape and position of female spikes, length of female spike peduncle, size of perigynium, type of perigynium hairs and fertility. The material was studied using a ruler and binocular microscope.

### *Molecular analysis*

DNA was isolated using the DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. PCR was performed using MyTaq polymerase (Bioline) and primers ITS3i (5'-GCATCGATGAAGAACGTAGC-3') and ITS4i (5'-GGTAGTCCCCGCCTGACCTGG-3') (ITS2 region) with the following reaction conditions: 35 cycles of 94 °C for 30 s, 58 °C for 30 s, and 72 °C for 50 s. Subsequent sequencing on a ABI 3730xl DNA Analyser (Applied Biosystems, Forster City, USA) without PCR sub cloning was used to detect both genotypes of the parental species by presence of double or multiple signals at polymorphic bases in samples of the presumed hybrids. The *trnL-F* region was amplified using primers c and f (Taberlet et al. 1991). The modified PCR conditions are those previously described by Řepka & Mráček (2012). DNA sequence alignments were performed in Bioedit version 7.0.9.0 (Hall 1999).

The AFLP technique was performed according to Vos et al. (1995) with minor modifications. The first reaction, comprising restriction and ligation, was performed with 200 ng of DNA. The preselective amplification used the primers EcoRI-A/MseI-C. Selective amplification was performed using EcoRI-ACG-FAM/MseI-CGG, EcoRI-ACG-NED/MseI-CCA, EcoRI-ATT-FAM/MseI-CGA and EcoRI-ATT-FAM/MseI-CGG primer combinations. Fragments were separated on an ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyser and ABI 3730xl DNA Analyser using the GS-500 LIZ size standard. Fragments were analysed using GeneMapper v. 4.1 (Applied Biosystems, Forster City, USA). AFLP markers were scored in the range of 50–500 bp. A matrix (1 = present; 0 = absent) was created in which only well-separated fragments were scored. Reproducibility of AFLP data was determined using independently analysed redundant samples. Species-specific markers for both taxa were selected based on the following criteria: species-specific markers were fragments present in all samples of a respective parental species and absent in those of the other species. To analyse molecular variation in samples of *Carex*, principal component analyses (PCA) was applied to AFLP data, using the program PAST ver. 3.02a (Hammer et al. 2001).

## Results

### *Morphology*

The plant found at Chvojnica (*C. ×danielis*3) had characters indicating it was intermediate in its morphology between *C. flacca* subsp. *flacca* and *C. tomentosa*. The vegetative organs (slenderness of plant and gracility of these organs) and quantitative characteristics of the reproductive organs generally placed the plant between the assumed parent species, but some of them, e.g. short upright spikelets in short inflorescence, short peduncles and small perigynium, placed the potential hybrid plant at the edge of the variation of *C. flacca* subsp. *flacca* (hereinafter referred to as *C. flacca*) (Electronic Appendix 1). Moreover, the surfaces of the perigynia were covered with papillae, as is common in *C. flacca*. Achenes in the perigynia were fully developed.

Most of the presumed hybrid plants from Nevojice had vegetative characters resembling those of one of the parents (*C. flacca*), but differed from it mainly in terms of the characteristics of the reproductive organs. The herbarium material collected by K. Sutorý in 1984 (*C. ×danielis*4) includes plants that had narrow leaves, short inflorescences with short bracts, shortened spikelets on erect upright peduncles, short perigynia, obovate and more bloated with relatively dense covering of papillae, all suggestive of hybrid status, but in other characters matched the presumed parental species *C. flacca*. One of these plants was sterile and the surface of the perigynium was densely covered with wide-based hairs. In this character it resembled *C. tomentosa*, which has perigynia that are commonly very thickly covered with long whitish yellow hairs, which in some specimens are wider and flatter at the base; their tips are straight or turned upwards. In contrast, *C. flacca* plants have perigynia covered with separate white erect hairs or, in some specimens, much smaller dense papillae on the upper half. Also, perigynia of *C. flacca* commonly have papillae, both on the surface and at the edges; the surface is glossy or matt. However, some also have finger-shaped hairs without a wide base, only 0.1 mm long, and are minutely papillose or scabrid (as obvious from our extensive studies of Czech and Slovak herbarium material of this species).

One micropopulation at Nevojice (*C. cf. ×danielis*1) had rhizomes very similar to those of *C. tomentosa*, although the generative organs corresponded mainly to those of *C. flacca*. These plants also had much shorter, upright female spikelets on short peduncles, with maturing achenes. This micropopulation contained a single sterile plant; it also included a plant that had perigynium beaks resembling those of *C. tomentosa*. Another Nevojice micropopulation (*C. ×danielis*2) was intermediate in having a short inflorescence and short erect female spikelets on short peduncles and bracts shorter than the inflorescences. The hybrid origin of the material from this micropopulation was, however, also supported by a single sterile plant.

Besides other intermediate features and plant sterility, the type and density of the hairs on the perigynium were the most significant features suggesting that these plants were hybrids (see Electronic Appendix 1).

### *Molecular markers*

The results of the analysis of the *trnL*-F region (Fig. 1) clearly identified *C. flacca* as the maternal species, because in angiosperms the chloroplast genome is inherited maternally



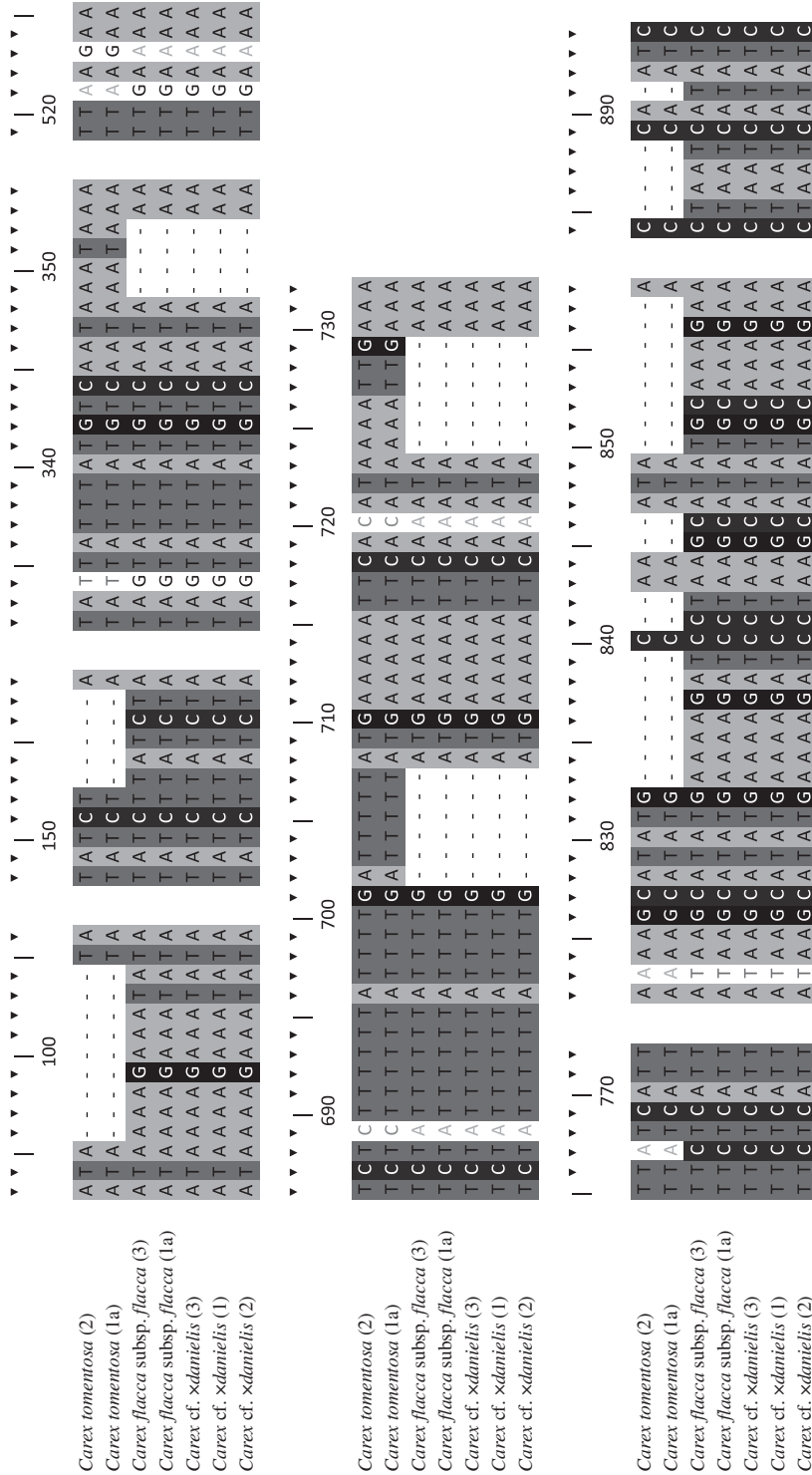


Fig. 1. — Polymorphic regions in the DNA alignment of the chloroplast encoded region *trnL-F* of the *Carex* taxa studied.

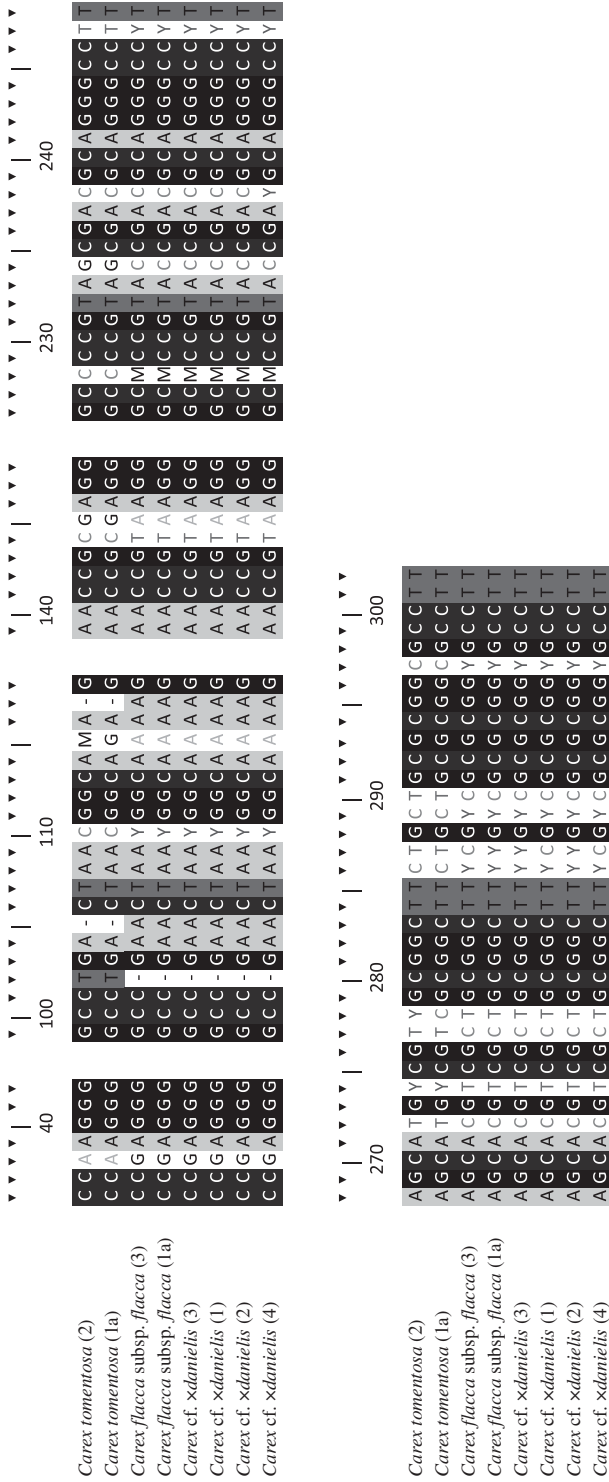


Fig. 2. – Polymorphic regions in the DNA alignment of the nuclear encoded ITS2 spacer in the *Carex* taxa studied.

<i>Carex tomentosa</i> (1a)	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1
<i>Carex tomentosa</i> (2)	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1
<i>Carex tomentosa</i> (3)	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1
<i>Carex flacca</i> subsp. <i>flacca</i> (1a)	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0
<i>Carex flacca</i> subsp. <i>flacca</i> (2)	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0
<i>Carex flacca</i> subsp. <i>flacca</i> (3)	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0
<i>Carex flacca</i> subsp. <i>flacca</i> (4)	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0
<i>Carex flacca</i> subsp. <i>erythrostachys</i>	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0
<i>Carex</i> cf. <i>xdanielis</i> (3)	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0
<i>Carex</i> cf. <i>xdanielis</i> (1)	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0
<i>Carex</i> cf. <i>xdanielis</i> (2)	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0

Fig. 3. – Species-specific AFLP markers for *Carex flacca* and *C. tomentosa* and their presumed hybrid.

(Rebound & Zeyl 1994). The ITS region is a nuclear multicopy region that is inherited biparentally. The alignment of the ITS2 region (Fig. 2) revealed only the genotype of *C. flacca* in samples of the presumed hybrid (*C. cf. xdanielis*).

The AFLP data were obtained using four primer combinations. The use of 33 redundant samples indicated the reproducibility was 99.3%. From 241 scored fragments we selected 30 species-specific loci, fragments of which were present in all samples of one of the parent species, but absent in the other. The same genotype as *C. flacca* was found at all loci of one sample of the presumed hybrid taxon (*C. cf. xdanielis*) and in 29 of 30 loci of another two samples (Fig. 3). The PCA plot includes the presumed hybrid in the group of *C. flacca* samples, with the samples of *C. tomentosa* placed in a distinct group (Fig. 4). The first and second coordinates of the PCA explain 39% and 13% of the variation in the AFLP dataset, respectively. We may conclude that the AFLP data do not support the hypothesis of a hybrid origin of the samples identified as the presumed hybrid (*C. cf. xdanielis*).

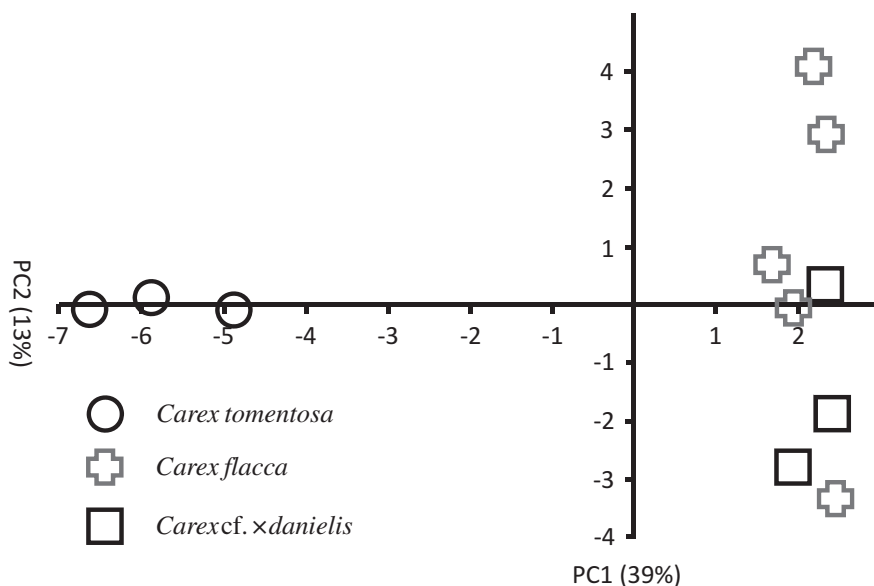


Fig. 4. – PCA plot of *Carex flacca* and *C. tomentosa* individuals and their presumed hybrid.

## Discussion

The morphological and molecular analyses provided very different answers regarding the status of the presumed hybrid *C. cf. ×danielis*. The morphological analysis indicated that samples of the assumed hybrid *C. cf. ×danielis* have combinations of characters of the supposed parents as well as some intermediate characters. Besides the previously mentioned sterility of some plants, the hairs on the perigynium of one plant from the Nevojice site (described above) showed an influence of *C. tomentosa*, even though the vegetative character of *C. flacca* predominated in these plants. Also the fertility of plants, as recorded for the material from Chvojnica, cannot be used as an argument to reject the hybrid origin of this plant material (Galbany-Casals et al. 2012), because in some *Carex* sections (e.g. *Phacocystis*) there are partially or completely fertile hybrids (Faulkner 1972, Jermy et al. 2007). However, contrary to the morphological analysis, the molecular evidence fully supports the conclusion that the material belongs to *C. flacca*. AFLP analyses provided 30 species-specific fragments, which indicated that the samples of *C. cf. ×danielis* have a pattern identical or in two samples nearly identical to *C. flacca* (Fig. 3). The variability is for one locus per sample, which can be explained as intraspecific variability previously undetected in *C. flacca* due to the limited number of samples and collection sites. Moreover, the PCA plot (Fig. 4) of AFLP genetic variation shows no differentiation between the *C. cf. ×danielis* and *C. flacca* samples.

Other studies of putative hybridization in the genus *Carex* have shown both agreement and disagreement between morphological and genetic-marker analyses. Thus, for one population of the *C. flava* group (Blackstock & Ashton 2010), the two approaches produced similar results, whereas in another two they were not similar or enigmatic. Our results, refuting hybridization and documenting higher morphological variation in *C. flacca*, are similar to those for *Carex* sect. *Phacocystis* (Jiménez-Mejías et al. 2011). Indeed, these authors suggest that the low contribution of hybridization to overall genetic variation means that the frequency of hybridization has been overestimated. They thus explain the previously reported putative hybrid zones of members of *Carex* sect. *Phacocystis* as representing wider than expected morphological variation rather than a result of hybridization (Jiménez-Mejías et al. 2011).

Based on our results, the reported occurrences of the hybrid *C. cf. ×danielis* in the Czech Republic (see Danihelka et al. 2012) and western Slovakia are refuted, as the plants originally identified as *C. cf. ×danielis* in fact belong to *C. flacca*. This is not to say, however, that it is impossible for the putative parental species *C. flacca* and *C. tomentosa* to have hybridized anywhere in Europe. In fact, both of these species occur in the same habitats, sub-Atlantic and sub-continental broad-leaved dry grasslands (alliances *Bromion erecti* and *Cirsio-Brachypodion*) growing on heavy calcareous tertiary sediments (Novák & Chytrý 2007), and the two taxa meet across a wide area from Great Britain to eastern and south-eastern Europe (see Meusel et al. 1965). They not only overlap broadly in terms of geographical distribution and habitat, but also phenologically, which creates opportunities for hybridization. Moreover, although *C. flacca* and *C. tomentosa* are phylogenetically rather distant, as shown by differences in chromosome numbers (76 and 48, respectively; Rotreklová et al. 2011) and genome size (1.06 and 0.44 pg, respectively; Lipnerová et al. 2013), hybridization in the subgenus *Carex* has occurred between sections recognized as quite distant based on both morphology (Egorova 1999) and molecular data

(Hendrichs et al. 2004). Importantly, we have not genetically analysed any putative *C. cf. x danielis* from sites outside the Czech Republic and Slovakia. Nevertheless, the results based on our samples raise the question of whether other putative specimens of this hybrid from elsewhere are indeed hybrids.

Our study reaffirms the importance of the conclusions of Lihová et al. (2007) that relying only on morphological characters can be misleading and insufficient for the identification of hybrids, for which it is necessary to use modern molecular methods (i.e. markers). Our results also demonstrate that the morphological variability of putative parents (in our case *C. flacca*) is often insufficiently studied and the variation of taxonomically important characters poorly described. This can lead to specimens being incorrectly designated as products of hybridization when characters of these plants fall outside the described variation. Our findings also suggest that the frequency of hybrids in *Carex* can be much smaller than is generally recognized, with further research needed to reveal how many of the ~300 European hybrids reported by Koopman (2011) are genuine hybrids. Verification of hybridization events and genetic introgressions using multiple approaches are important for a better explanation of the morphological and genetic variation in the genus *Carex*.

See [www.preslia.cz](http://www.preslia.cz) for Electronic Appendix 1

## Acknowledgements

We would like to thank GAČR project no. 206/09/1405 for financially supporting this study. We thank K. Sutorý (BRNM) for providing herbarium material of putative hybrids and their parental species and for help in the field. We also thank two anonymous reviewers for valuable comments on the first version of the manuscript. We are indebted to J. Rosenthal for his linguistic help and critical reading of the manuscript. Tony Dixon kindly improved English of the accepted manuscript.

## Souhrn

Na jedné lokalitě v České republice a na jedné na Slovensku byly nalezeny přechodné morfotypy mezi druhy *Carex flacca* a *C. tomentosa*. Po analýze morfologických znaků (12 kvantitativních a 10 kvalitativních) byly tyto rostliny určeny jako pravděpodobný hybrid *C. x danielis* Léveillé, takto publikovány v checklistu flóry ČR a uvedeny s popisem v rukopisu 9. dílu Květeny ČR. V tomto článku jsou prezentovány protichůdné výsledky z morfologické i molekulární analýzy tohoto rostlinného materiálu z obou lokalit. Ač některé morfologické znaky, především na generativních orgánech, ukazují na intermediaritu (nebo výjimečně i unikátnost znaku) mezi oběma druhy, použité molekulární markery (ITS, AFLP, *trnL-F*) jasně dosvědčují, že materiál z obou lokalit patří k jednomu z předpokládaných rodičovských druhů, *C. flacca*. Na základě našich výsledků musíme křížence *C. x danielis* z checklistu ČR odstranit a podobně vyloučit jeho existenci na dosud jediné známé lokalitě na Slovensku. Tyto výsledky mají dopad pouze na populace dvou lokalit v obou státech a neříkají zatím nic o tom, zda tento hybrid je vůbec v přírodě reálný a zda jsou údaje o jeho existenci na území některých evropských států relevantní.

## References

- Ascherson P. & Graebner P. (1902): Synopsis der mitteleuropäischen Flora. Vol. 2/2. – H. Stürtz, Leipzig.
- Beismann H., Barker J. H. A., Karp A. & Speck T. (1997): AFLP analysis sheds light on distribution of two *Salix* species and their hybrid along a natural gradient. – *Mol. Ecol.* 6: 989–993.
- Blackstock N. & Ashton P. A. (2010): Genetic markers and morphometric analysis reveal past hybridization and introgression in putative *Carex flava* L. s. str. (*Cyperaceae*) hybrid populations. – *Plant Syst. Evol.* 287: 37–47.
- Cayouette J. & Catling P. M. (1992): Hybridization in the genus *Carex* with special reference to North America. – *Bot. Rev.* 58: 351–438.

- Ciocârlan V. (2000): Flora ilustrată a României. *Pteridophyta* et *Spermatophyta* [Illustrated flora of Romania. *Pteridophyta* and *Spermatophyta*]. – Editura Ceres, Bucuresti.
- Danihelka J., Chrtek J. & Kaplan Z. (2012): Checklist of vascular plants of the Czech Republic. – *Preslia* 84: 647–811.
- Egorova T. V. (1999): Osoki (*Carex* L.) Rossii i sopredelnykh gosudarstv (v predelach byvšego SSSR) [The sedges (*Carex* L.) of Russia and adjacent states (within the limits of the former USSR)]. – Sankt-Peterburgskaja Gosudarstvennaja Chimiko-farmaceuticeskaja Akademija, Sankt-Peterburg & Missouri Botanical Garden Press, St. Louis.
- Faulkner J. S. (1972): Chromosome studies on *Carex* section *Acutae* in NW Europe. – *Bot. J. Linn. Soc.* 65: 271–301.
- Fischer M. A. (ed.) (2008): Exkursionsflora von Österreich. – Eugen Ulmer, Stuttgart & Wien.
- Focke W. O. (1881): Die Pflanzen-mischlinge. – G. Borntraeger, Berlin.
- Galbany-Casals M., Carnicero-Campmany P., Blanco-Moreno J. M. & Smissen R. D. (2012): Morphological and genetic evidence of contemporary intersectional hybridization in mediterranean *Helichrysum* (*Asteraceae*, *Gnaphalieae*). – *Plant Biol.* 14: 789–800.
- Hall T. A. (1999): BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. – *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95–98.
- Hammer Ø., Harper D. A. T. & Ryan P. D. (2001): PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. – *Palaeontol. Electron.* 4: 1–9.
- Hedrén M. (1998): Status of *Carex bergrothii* (*Cyperaceae*) on Gotland, SE Sweden. – *Nordic J. Bot.* 18: 41–49.
- Hendrichs M., Oberwinkler F., Begerow D. & Bauer R. (2004): *Carex*, subgenus *Carex* (*Cyperaceae*): a phylogenetic approach using ITS sequences. – *Plant Syst. Evol.* 246: 89–107.
- Jermy A. C., Simpson D. A., Foley M. J. Y. & Porter M. S. (2007): Sedges of the British Isles. Ed. 3. – Botanical Society of the British Isles, London.
- Jiménez-Mejías P., Escudero M., Guerra-Cárdenas S., Lye K. A. & Luceño M. (2011): Taxonomic delimitation and drivers of speciation in the Ibero-North African *Carex* sect. *Phacocystis* river-shore group (*Cyperaceae*). – *Am. J. Bot.* 98: 1855–1867.
- Jiménez-Mejías P., Luceño M. & Martín-Bravo S. (2014): Species boundaries within the Southwest Old World populations of the *Carex flava* group. – *Syst. Bot.* 39: 117–131.
- Kaplan Z. & Fehrer J. (2004): Evidence for the hybrid origin of *Potamogeton xcooperi* (*Potamogetonaceae*): traditional morphology-based taxonomy and molecular techniques in concert. – *Fol. Geobot.* 39: 431–453.
- Kaplan Z. & Fehrer J. (2006): Comparison of natural and artificial hybridization in *Potamogeton*. – *Preslia* 78: 303–316.
- Kaplan Z. & Fehrer J. (2009): An orphaned clone of *Potamogeton xschreberi* in the Czech Republic. – *Preslia* 81: 387–397.
- Kaplan Z., Fehrer J. & Hellquist C. B. (2009): New hybrid combinations revealed by molecular analysis: the unknown side of North American pondweed diversity (*Potamogeton*). – *Syst. Bot.* 34: 625–642.
- Király G. (ed.) (2009): Új magyar fűvészkönyv. Magyarország hajtásos növényei [New Hungarian herbal. Vascular plants of Hungary. Identification key]. – Aggteleki Nemzeti Park Igazgatóság, Jósavfő.
- Koopman J. (2011): *Carex* Europaea. The genus *Carex* L. (*Cyperaceae*) in Europe, 1. – Margraf Publishers, Weikersheim.
- Korpelainen H., Virtanen V., Kostamo K. & Väre H. (2010): Hybridization and introgression in *Carex aquatilis* and *C. paleacea*. – *Plant Syst. Evol.* 287: 141–151.
- Kükenthal G. (1890): *Carex glauca* × *tomentosa* n. hybr. = *C. Brückneri* m. – *Deutsche Bot. Monatsschr.* 8: 107–108.
- Kükenthal G. (1909): *Cyperaceae* – *Caricoideae*. – In: Engler A. (ed.), *Das Pflanzenreich* 38: 1–824, W. Engelmann, Leipzig.
- Kukkonen I. & Toivonen H. (1988): Taxonomy of wetland carices. – *Aquat. Bot.* 30: 5–22.
- Kuusik V., Tabaka L. & Jankevičienė R. (eds) (2003): Flora of the Baltic countries. Compendium of vascular plants. – Eesti Loodusfoto AS, Tartu.
- Lambignon J., De Langhe J.-E., Delvosalle L. & Duvigneaud J. (1992): Nouvelle flore de la Belgique, de Grand-Duché de Luxembourg, du nord de la France et des Régions Voisines. Ed. 4. – Patrimoine du Jardin botanique national de Belgique, Meise.
- Lambignon J., De Langhe J.-E., Delvosalle L. & Duvigneaud J. (1998): Nouvelle flore de la Belgique, de Grand-Duché de Luxembourg, du nord de la France et des Régions Voisines. Ed. 5. – Patrimoine du Jardin botanique national de Belgique, Meise.
- Léveillé A. A. H. (1912): *Carex xdanielis*. – *Bull. Geogr. Bot.* 22: 48.

- Lihová J., Kučera J., Perný M. & Marhold K. (2007): Hybridization between two polyploid *Cardamine* (*Brassicaceae*) species in North-western Spain: discordance between morphological and genetic variation patterns. – *Ann. Bot.* 99: 1083–1096.
- Lipnerová I., Bureš P., Horová L. & Šmarda P. (2013): Evolution of genome size in *Carex* (*Cyperaceae*) in relation to chromosome number and genomic base composition. – *Ann. Bot.* 111: 79–94.
- Luceño M. (1994): Monografía del género *Carex* en la Península Ibérica e Islas Baleares. – *Ruizía* 14: 5–139.
- Meusel H., Jäger E. & Weinert E. (1965): *Vergleichende Chorologie der Zentraleuropäischen Flora*, Vol. 1. – Gustav Fischer Verlag, Jena.
- Nakamata E. & Lye K. A. (2007): AFLP-based differentiation in north Atlantic species of *Carex* sect. *Phacocystis*. – *Nord. J. Bot.* 25: 318–328.
- Novák J. & Chytrý M. (2007): *Cirsio-Brachypodium pinnati*, *Bromion erecti*. – In: Chytrý M. (ed.), *Vegetation of the Czech Republic 1*: 425–449, Academia, Praha.
- Reboud X. & Zeyl C. (1994): Organelle inheritance in plants. – *Heredity* 72: 132–140.
- Řepka R. & Mráček J. (2012): *Gymnocalycium esperanzae*: a nothospecies? – *Haseltonia* 18: 105–115.
- Rotreklová O., Bureš P., Řepka R., Grulich V., Šmarda P., Hralová I., Zedek F. & Koutecký T. (2011): Chromosome numbers of *Carex*. – *Preslia* 83: 25–58.
- Schmid B. (1983): Notes on the nomenclature and taxonomy of the *Carex flava* group in Europe. – *Watsonia* 14: 309–319.
- Scotti I., Mariani A., Verona V., Candolini A., Cenci C. A. & Olivieri A. M. (2002): AFLP markers and cytotoxic analysis reveal hybridization in the genus *Schoenus* (*Cyperaceae*). – *Genome* 45: 222–228.
- Smith T. W. & Waterway M. J. (2008): Evaluating species limits and hybridization in the *Carex complanata* complex using morphology, amplified fragment length polymorphisms, and restriction fragment analysis. – *Botany* 86: 809–826.
- Stace C. A. (1986): Hybridization and plant taxonomy. – *Symb. Bot. Ups.* 27: 9–18.
- Suh Y., Kim S. & Park C. W. (1997): AFLP examination for putative hybrids between *Aconitum japonicum* ssp. *napiforme* and *A. jaluense* (*Ranunculaceae*). – *Korean J. Plant Taxon.* 27: 59–71.
- Taberlet P., Gielly L. & Bouvet J. (1991): Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. – *Plant Mol. Biol.* 17: 1105–1109.
- Teo L. L., Kiew R., Set O., Lee S. K. & Gan Y. Y. (2002): Hybrid status of kuwini, *Mangifera odorata* Griff. (*Anacardiaceae*) verified by amplified fragment length polymorphism. – *Mol. Ecol.* 11: 1465–1469.
- van Droogenbroeck B., Kyndt T., Romeijn-Peters E., van Thuyne W., Goetghebeur P., Romero-Motochi J. P. & Gheysen G. (2006): Evidence of natural hybridization and introgression between *Vasconcellea* species (*Caricaceae*) from southern Ecuador revealed by chloroplast, mitochondrial and nuclear DNA markers. – *Ann. Bot.* 97: 793–805.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M. & Zabeau M. (1995): AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. – *Nucleic Acids Res.* 23: 4407–4414.

Received 23 April 2014

Revision received 10 October 2014

Accepted 17 October 2014

### III. Morphological and genetic variation of several putative *Carex* hybrids

Manuskript v přípravě, bude doplněn o morfologická data a rozšířen: *Preslia*



1 1. Morphological and genetic variation of several putative *Carex* hybrids

2 2. Authors:

3 Petra Veselá, Department of Forest Botany, Dendrology and Geobiocenology, Faculty  
4 of Forestry and Wood technology, Mendel University in Brno, Brno, Czech Republic

5 Radomír Řepka, Botany, Dendrology and Geobiocenology, Faculty of Forestry and  
6 Wood technology, Mendel University in Brno, Brno, Czech Republic

7 Jaroslav Mráček, Botany, Dendrology and Geobiocenology, Faculty of Forestry and  
8 Wood technology, Mendel University in Brno, Brno, Czech Republic

9

10 3. Corresponding Author: Petra Veselá, Department of Forest Botany, Dendrology and  
11 Geobiocenology, Faculty of Forestry and Wood technology, Mendel University in Brno,  
12 Zemědělská 3, Brno 61300, Czech Republic, +420 724 037 970,  
13 vesela.petra@yahoo.com

14

15 4. Running title: Morphological and genetic variation of several putative *Carex* hybrids

16

17 Keywords: AFLP, *Carex*, hybridisation, microsatellite markers

18

19

## 20 **Abstract**

21 In this study we assessed relationships between several putative *Carex* hybrids and their  
22 parents. These genetic relationships were tested in combinations *C. acutiformis* and *C.*  
23 *nigra*, *C. paniculata* and *C. echinata*, *C. paniculata* and *C. appropinquata*, *C.*  
24 *caryophyllea* and *C. fritschii* using microsatellite and AFLP data. We have detected  
25 significant genetic differentiation between taxon pairs, except for *C. acutiformis*, *C.*  
26 *appropinquata* and the putative hybrids. In combination *C. paniculata* with *C.*  
27 *appropinquata*, we detected the lowest genetic distance, possibly due to the close  
28 relationship of these parental taxa. From the four tested combinations, only in *C.*  
29 *paniculata* × *echinata* was visible genetic intermediary. The samples *C. ×moravica* had  
30 unique microsatellite allelic composition in comparison with their putative parents and  
31 presumably employed another source of genetic material during their formation. Our  
32 data also demonstrate that molecular markers are essential for most of systematic  
33 studies especially for hybrid problematic.

34

## 35 **Introduction**

36 Hybridization is a common phenomenon in vascular plants (Mallet 2005) with great  
37 importance in plant speciation (Barton 2001). As stated Mallet (2005), at least 25% of  
38 plant species hybridize with other species. The frequency of interspecific hybrids is  
39 influenced by pre- and postzygotic isolation mechanisms (Yakimowski & Rieseberg  
40 2014) which can facilitate the accumulation of genetic differences between populations  
41 (Rieseberg & Willis 2007). It is supposed that hybridisation does not always lead to  
42 morphological intermediary of hybrids (Mallet 2005, Rieseberg & Ellstrand 1993  
43 reviewed in Rieseberg 1995). Hybrids can exhibit traits intermediate, parental, but also

44 extreme or new (Rieseberg 1995). They also can combine traits of both parent or show  
45 transgressive traits which allow them ecological distinctiveness (Paun et al. 2009).  
46 Natural hybridisation supports adaptation, speciation and play as an important source of  
47 genetic variability due to new combinations advantageous/favourable genes (Paun et al.  
48 2007).

49 There are two ways of hybrid speciation described as homoploid and polyploid  
50 hybrid speciation (Paun et al. 2007). According to Paun et al. (2009), if the divergence  
51 between pair of individuals is greater than three-quarters, then arise polyploids and vice  
52 versa. In homoploid hybrids may occur also introgression, which involves back-  
53 crossing of newly formed hybrid with one of the parental species (Rieseberg & Willis  
54 2007). Introgression further complicates hybrid identification and due to the  
55 backcrossing is the identification of homoploid hybrids underestimated, because the  
56 hybrids cannot be reveal easily in the nature (Naisbit et al. 2003).

57 Hybridisation presents a source of genetic variations and promotes plant  
58 diversification. Hybrids do not have to be morphologically intermediate, due not only to  
59 introgression or the changes in gene expression related to genome reorganisation  
60 (DeBodt et al. 2005, Paun et al. 2009). Not all loci flow with the same frequency  
61 between species. It depends on linkage strength of the loci, which can contribute to  
62 different phenotypic appearance (Mallet 2005). This could succour not only to  
63 adaptability but also to diversification. Another thing complicating hybrid identification  
64 is weak correlation between molecular markers and quantitative traits caused by  
65 different major selective forces (Reed & Frankham 2001).

66 Hybridisation also occurs in the genus *Carex* L. and this complicates the already  
67 complex taxonomic classification. The genus *Carex*, with approximately 2000 species,  
68 is the largest and most widespread genus of *Cyperaceae* (Reznicek 1990). Species of

69 this genus are ecologically important components of various habitats (Yen & Olmstead  
70 2000, Hipp et al. 2006, Waterway et al. 2009).

71 Evolutionary relationships in this species-rich genus are not fully understood, due  
72 to several characteristic features: slight differences in vegetative morphology of many  
73 species (Cattling et al. 1990, Reznicek 1990), reduced flowers (Reznicek 1990),  
74 intraspecific variability (Stenström et al. 2002, Košnar et al. 2012), presence of  
75 holocentric chromosomes associated with agmatoploidy and symploidy (Luceño &  
76 Guerra 1996), accompanied by chromosomal fission and fusion resulting in changes in  
77 chromosome number (Hipp et al. 2009) without substantial changes in DNA content  
78 (Rotreklová et al. 2011). The chromosomal changes can become stabilised through  
79 backcrossing or selfing (Escudero et al. 2010). As a consequence of all these events  
80 there are great differences of inter- and intraspecific chromosome numbers from  $n = 6$   
81 to  $n = 66$  (Tanaka 1949) and these changes could affect intraspecific variability (Hipp et  
82 al. 2009) or *Carex* speciation (Hipp et al. 2009, Escudero et al. 2010). Hybridisation is  
83 another important phenomenon in genus *Carex*, more frequently occurs within sections  
84 than among sections (Wronska-Pilarek et al. 2010). There are many described  
85 interspecific hybrids worldwide, e.g. Koopmen (2011) delineated 300 *Carex* hybrids in  
86 Europe. Most of hybridization events belong to only several sections: *Ceratocystis*,  
87 *Phacocystis*, *Vesicariae* within subgenus *Carex* and *Heleonastes*, *Vulpinae*,  
88 *Heleoglochin* in subgenus *Vignea* (Wieclaw & Wilhelm 2014).

89 The aim of this study is to uncover background of morphological variability that is  
90 often explained as a hybridisation event or as an intraspecific variances. The  
91 investigation of putative *Carex* hybrids can contribute to understand of complicate  
92 taxonomic relationships in this genus. We have investigated samples of *C. acutiformis*  
93 (*Paludosae*) and *C. nigra* (*Phacocystis*), *C. paniculata* (*Heleoglochin*) and *C.*

94 *appropinquata* (*Heleoglochin*), *C. paniculata* (*Heleoglochin*) and *C. echinata*  
95 (*Stellulatae*), *C. caryophyllea* (*Mitratae*) and *C. fritschii* (*Atratae*) and individuals that  
96 show morphological intermediary/parental traits between them using AFLP and  
97 microsatellite data.

98

## 99 **Material and methods**

### 100 ***Plant material and DNA extraction***

101 For analysis it was used plant material from species *C. acutiformis*, *C. appropinquata*,  
102 *C. caryophyllea*, *C. echinata*, *C. fritschii*, *C. nigra*, *C. paniculata* and their putative  
103 hybrids. Each parental taxon is represented by four samples in this study. Detailed  
104 information about the origin of samples can be found in Supplementary table 1.

105 Total genomic DNA was isolated from the young leaf tissue using the DNeasy  
106 Plant Mini Kit (Qiagen, Netherlands, Venlo).

107

### 108 ***Molecular markers***

#### 109 *a) AFLP protocol*

110 The AFLP reactions were performed according to Vos et al. (1995). Restriction and  
111 ligation were performed simultaneously, 0.5 µg genomic DNA was incubated 3h at  
112 37°C in 20-µl reaction volume with 2.5 *EcoRI* (New England Biolabs, USA,  
113 Massachusetts, Ipswich), 2.5 U *MseI* (New England Biolabs), 15 µg of BSA, 50 pmol  
114 *MseI* adapter (Vos et al. 1995), 5 pmol *EcoRI* adapter (Vos et al. 1995), 80 NEB U of  
115 T4 DNA ligase (New England Biolabs), 1x CutSmart™ Buffer (1x NEB2 Buffer for  
116 *EcoRI*), and 1 mM ATP. The reaction mixture was then diluted 20-fold in TE<sub>0.1</sub> buffer  
117 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0).

118 The preamplification reaction mixture was composed of 0.5 U *Taq* DNA  
119 polymerase (Qiagen), 2.5 pmol of each primer (*EcoRI*+A; *MseI*+C), 1x PCR Buffer  
120 (Qiagen), 0.2 mM dNTPs and 4 µl of the diluted mixture from the first reaction in a 20-  
121 µl reaction volume. The reaction profile is follows: 2 min at 72 °C followed by 20  
122 cycles of 20 s at 94 °C, 30 s at 56 °C, 2 min at 72 °C, and finished with one 30-min  
123 cycle at 60 °C. The preamplification reaction was diluted 10-fold in TE<sub>0.1</sub> buffer.

124 The selective amplification was performed using 3 different *MseI* primers with three  
125 selective nucleotides (*MseI*+CGG/CCA/CCC). The second primer (*EcoRI*+ACG) used  
126 in the selective amplification was fluorescently labelled at the 5'-end (6-FAM, NED,  
127 PET). The reaction mixture was in a total volume of 20 µl and contained 0.5 U *Taq*  
128 DNA polymerase (Qiagen), 0.2 mM dNTPs, 2 pmol *AscI/EcoRI/SbfI* primer, 5 pmol  
129 *MseI* primer, 4 µl of the diluted mixture from the second reaction, and 1x PCR buffer  
130 (Qiagen). The reaction profile was as follows: 2 min at 94 °C, followed by 10 cycles of  
131 20 s at 94 °C, 30 s at 66 °C, 2 min at 72 °C, with the annealing temperature decreased  
132 by 1 °C (Stringent condition 1 by 0.7 °C) in each cycle, followed by 20 cycles of 20 s at  
133 94 °C, 30 s at 56 °C (Stringent condition 1 at 59 °C), 2 min at 72 °C; and finally 30 min  
134 at 60 °C.

135

#### 136 *b) SSR protocol*

137 For microsatellite analysis, seven microsatellite loci were used. Cko1-9, Cko1-11,  
138 Cko1-47, Cko2-112, Cko2-139 according to the original paper from Ohsako & Yamane  
139 (2007) and CM01, CM35 from paper of King & Roalson (2009) with forward primers  
140 fluorescently labelled (6-FAM, NED, PET, VIC). PCR reaction was performed in 20-µl  
141 reaction mixture, containing 0.5 U MYTaq DNA Polymerase (Bioline, USA, Taunton),  
142 1x reaction buffer Bioline), 500nM of each primer and ~15 ng of DNA filled in with

143 dH<sub>2</sub>O to 20μl; amplification conditions: 94°C for 5 min, 30 cycles of 94°C for 15 s,  
144 52°C for 15 s, 72°C for 40 s and final extension of 72°C for 7 min; for microsatellite loci  
145 from Ohsako and Yamane (2007). For microsatellite loci from King and Roalson (2009)  
146 were reaction and amplification condition as follows: 20-μl reaction mixture contained  
147 1 U of MYTaq DNA Polymerase (Bioline), 1x reaction buffer (Bioline), 500 nM of  
148 each primer and ~15 ng of DNA filled in with dH<sub>2</sub>O to 20μl; amplification conditions:  
149 95 min for 3 min, 30 cycles of 95°C for 30 s, 51°C for 30 s, 72 s for 15 s and final  
150 extension 72°C for 30 min.

151

## 152 *Data analysis*

153 AFLP and microsatellite fragments were separated electrophoretically on an ABI  
154 PRISM 3730XL automated sequencer (Applied Biosystems, USA, California, Foster  
155 City) using the GeneScan-500 LIZ internal standard (Applied Biosystems).  
156 GeneMapper V4.1 (Applied Biosystems) was used to characterise the fragments.

157 The genetic diversity between taxon pairs was calculated as Nei Genetic distance  
158 and Analysis of molecular variance (AMOVA) calculating  $PHI_{pt}$  based on 999  
159 permutations were done using GenAlEx 6.5 (Peakall & Smouse 2012), for both data  
160 sets.

161 To express graphical representation of genetic differentiation of combinations of  
162 parental taxa and putative hybrids, it was used principal coordinate analysis (PCoA)  
163 using also GenAlEx 6.5. The analysis was made separately for AFLP and microsatellite  
164 datasets and individuals were ordered according to first two axes.

165

166

167

168 **Results**

169 In this study we examined four combinations of *Carex* samples (*C. acutiformis* × *C.*  
170 *nigra*, *C. paniculata* × *C. echinata*, *C. paniculata* × *C. appropinquata*, *C. caryophyllea*  
171 × *C. fritschii*) and putative hybrids between these parental species using AFLP and  
172 microsatellite markers.

173 In *C. acutiformis* × *C. nigra* and their putative hybrid, we detected in AFLP  
174 analysis 176 loci from which were 147 polymorphic; 1 locus was specific for the  
175 putative hybrid, 35 were shared with *C. acutoformis* and only 1 with *C. nigra*. The  
176 number of detected alleles from five analysed microsatellite loci ranged from seven to  
177 nine (Tab. 1) and all alleles detected in the putative hybrid were shared with *C.*  
178 *acutiformis*.

179 In *C. paniculata* and *C. echinata* we detected 163 AFLP loci, where 139 were  
180 polymorphic and 6 specific for the putative hybrid. The putative hybrid sample shared  
181 25 loci with *C. paniculata* and 42 with *C. echinata*. In microsatellite data we analysed 5  
182 loci where one to six alleles we detected (Tab. 1). There were no specific allele for the  
183 putative hybrid and in genotype pattern were present one allele from each parent.

184 In *C. paniculata* × *C. appropinquata* we detected 114 loci, where 77 were  
185 polymorphic. The putative hybrid shared 6 loci with *C. appropinquata* and 1 locus with  
186 *C. paniculata* and without any specific locus. In this parental species and their putative  
187 hybrid we analysed six microsatellite loci and we detected from one to five alleles and  
188 there were no specific for the putative hybrid. Overview of allelic composition of taxons  
189 is listed in Tab. 1.

190 In combination *C. caryophyllea* and *C. fritschii* we analysed two samples labelled  
191 as *C. ×moravica1* and *C. ×moravica2*. We detected 95 AFLP loci from which 75 were  
192 polymorphic. In case of *C. ×moravica1* 27 loci were shared with *C. caryophyllea* and



193 two were specific for this sample. There were no locus shared with *C. fritschii*. In *C.*  
194 *×moravica2* we detected 5 loci shared with *C. caryophyllea* and 7 with *C. fritschii*. One  
195 was specific for this putative hybrid. In microsatellites were analysed five loci and from  
196 two to nine alleles were detected. However, the results were ambiguous; in most  
197 microsatellite loci were alleles detected in hybrids specific for them (Tab. 1).

198

199 The results from Analysis of Molecular Variance (AMOVA) for all studied parental  
200 taxa and their putative hybrids are listed in Tab. 2. The percentages of molecular  
201 variance give the contribution of within- and between population variability for  
202 microsatellite and AFLP datasets. In most combinations, it was detected higher genetic  
203 diversity among populations than within them. On the other hand, the contribution of  
204 within population variability was also appreciable.

205 Nei's Genetic Distances between taxon pairs ranged considerable values (Tab. 3),  
206 except for *C. acutiformis* and the putative hybrid, where the value was 0,101 for AFLP  
207 data and in *C. caryophyllea* and *C. ×moravica1* where the distance detected was 0,133  
208 for AFLP data. Even the closer relationship was found between *C. appropinquata* and  
209 the putative hybrid, where the values were 0,064 for AFLP data and 0,028 for  
210 microsatellite data. With exception of combination of *C. appropinquata* and *C.*  
211 *paniculata* were Nei's Genetic Distance nearly always significantly higher for  
212 microsatellite data compared to AFLP data.

213 The graphical pattern of genetic relationships among all individuals from the four  
214 combinations is represented in PCoA plots separately for AFLP and microsatellite data  
215 (Fig. 1a-h). In the plots it is depicted position of these individuals in relation to each  
216 other on the bases of molecular data characterising their genotypes.

217

218 **Discussion**

219 In this study, we investigated genetic background of morphological variances of several  
220 putative *Carex* hybrids; whether plays a role hybridisation or intraspecific variability.

221 Hybridization is a common phenomenon in plant species, of course in *Carex* taxa.  
222 In this genus it was described many examples of interspecific hybridization (Ford et al.  
223 1993, Smith & Waterway 2008, Volkova et al. 2008, Korpelainen et al. 2010). On the  
224 other hand, because in many publications it was used only morphological markers  
225 (Catling 1993, Blackstock & Ashton 2010, Wieclaw & Koopman 2013, Bergeron &  
226 Pellerin 2014, Wieclaw & Wilhelm 2014), the rate of hybridization could be  
227 overestimated, as it was also demonstrated by our data, on examples of putative hybrids  
228 between *C. acutiformis* and *C. nigra* and *C. paniculata* and *C. appropinquata*, which  
229 were inseparable from one of the parental species according to genetic data. Possible  
230 overestimation of occurrence of hybridisation events is also described by Řepka et al.  
231 (2014) on putative hybrids between *C. flacca* and *C. tomentosa* or Escudero et al.  
232 (2014) on the example of section *Ovales*. The results from our study also refer that it is  
233 not always possible rely solely on morphological markers.

234 Difficult position of morphological markers can be described on example of  
235 samples *C. ×moravica* (*C. caryophyllea* × *fritschii*) described by Řepka et al. (2013). On  
236 the basis of genetic markers, *C. fritschii* was presumably rejected as a parent of one  
237 from these samples (*C. ×moravica*1). We also detected the presence of unique  
238 microsatellite alleles in these samples which could be a result of a cross with another  
239 taxon than have been not presumed. This result pointed out that not only usage of single  
240 genetic marker is advantageous, but their combination can also contribute to reveal  
241 other specific features of studied taxa. The importance of combination of morphological  
242 with molecular markers for determination of hybrid status is also demonstrated by

243 Korpelainen et al. (2010) where they deal with hybridisation between *C. aquatilis* and  
244 *C. palacea*, and confirmed these species as parents from *C. recta* based on  
245 microsatellites and ISSR markers. Additionally, they were also able to detect another  
246 source of genetic material in presumed hybrid sample between *C. palacea* and *C. recta*.

247 The genetic and morphological intermediary was found in only one studied sample  
248 *C. paniculata* × *echinata* in which was the hybrid status confirmed by both, AFLP and  
249 microsatellites markers. Also Volkova et al. (2008) or Smith & Waterway (2008) used  
250 genetic markers to confirmation of hybridisation between *Carex* taxa.

251 Hybrid samples have not to always show morphological intermediary, they also can  
252 show features extreme or unique or resembling one of the parents (Rieseberg 1995).  
253 Unique traits were also detected in hybrids between members of *C. flava* agg. by  
254 Wieclaw & Wilhelm (2014), but this study was not supported by molecular markers.  
255 Even morphological intermediary or combinations of parental traits cannot guarantee  
256 the hybrid origin as we described in two putative hybrids (*C. acutiformis* × *C. nigra* and  
257 *C. paniculata* × *C. appropinquata*) according to AFLP and SSR data. Hybrids between  
258 *C. paniculata* × *C. appropinquata* (*C. ×rotae*) were already reported from British Isles  
259 and France and it would be appropriate to subject these findings revision by molecular  
260 markers. We determined one of the lowest genetic distances between *C. paniculata* and  
261 *C. appropinquata*, what correspond to close relationship of these species (both from  
262 section *Heleoglochin*). The morphological similarity of close relative species could  
263 affect the resolution of putative hybrids, where often intraspecific variability could be  
264 incorrectly explain as a result of hybridisation event (Jiménez-Mejías et al. 2011). The  
265 similar observation was also demonstrated in Řepka et al. (2014), where they  
266 investigated four putative hybrid samples between *C. flacca* and *C. tomentosa*. They  
267 demonstrated morphologically intermediate, but on the basis of molecular data, samples

268 were inseparable from *C. flacca*. Such a findings can pointed to possibilities that we can  
269 consider greater intraspecific morphological variances, than it was taken into account up  
270 to date. This observed variances do not have to be consequences of interspecific  
271 hybridisation, but may also result from genotypic differentiation or phenotypic plasticity  
272 (Sultan 1993). As detected in many studies, plants are able to produce various,  
273 functionally appropriate phenotypes in different environments (Stenström et al. 2001,  
274 Stenström et al. 2002, Košnar et al. 2012, Bugg et al. 2013, Abudureheman et al. 2014).  
275 In sedges, these variances can arise due to changes in environmental conditions  
276 (Heathcote at al. 1987, Košnar et al. 2012, Abudureheman et al. 2014), geographic  
277 distribution or isolation of populations (Urbanek 1998, Stentröm et al. 2001, Stentröm et  
278 al. 2002) or the presence of another taxon, as detected Yu et al. (2006) on the example  
279 of tussocky *C. sempervirens* which tussocks penetrate together with another one to give  
280 rise genetically variable cluster. From this point of view, it could be in *Carex*  
281 intraspecific variances greater than presumed. Morphological and molecular data does  
282 not have to correlate, as it was demonstrate Reed & Frankham (2001) where only 4% of  
283 quantitative trait variability can be explained by molecular markers. The degree of  
284 population genetic variability may differ between molecular and morphological  
285 markers, because morphological characters, especially quantitative, can be affected by  
286 more loci that caused greater mutational input. Moreover, phenotype variability depends  
287 on environment, contrary to molecular markers.

288

289

290

291

292

293 **Conclusion**

294 On the basis of these results, it is not always easy to identify hybrid status or accurate  
295 assignment in *Carex*. We have shown that the set of morphological characters doesn't  
296 need to correlate with genetic markers, because morphological data are affected by  
297 environment.

298 Our results demonstrate the presence of interspecific hybridisation in genus *Carex*.  
299 On the other hand, morphological intermediary of characters between putative parental  
300 species doesn't have to be connected with hybridisation event, but also could refer to  
301 intraspecific variance, preceded from genotypic differences or phenotypic plasticity.

302

303

304 **Acknowledgments**

305 I would like to thank Petr Bureš for providing several *Carex* samples. I would also like  
306 to thank IGA LDF Mendel University in Brno for financial support for this study via  
307 project no. LDF\_VP\_2015024.

308

309 **References**

310 Barton N. H. (2001): The role of hybridization in evolution. *Molecular Ecology* 10:  
311 551-568.

312 Bergeron A., Pellerin S. (2014): *Carex* × *cayouettei* (Cyperaceae), a new intersectional  
313 sedge hybrid from southern Québec, Canada. *Phytoneuron* 52: 1–11.

314 Blackstock N., Ashton P. A. (2010): Genetic markers and morphometric analysis reveal  
315 past hybridization and introgression in putative *Carex flava* L. s.str. (Cyperaceae)  
316 hybrid populations. *Plant Systematics and Evolution* 287: 37–47.

317 Bugg, C., Smith, C., Blackstock, N., Simpson, D., Ashton, P. A. (2013) Consistent and  
318 variable leaf anatomical characters in *Carex* (Cyperaceae). *Botanical Journal of the*  
319 *Linnean Society* 172: 371-384.

320 Catling P. M. (1993): *Carex castanea* x *Carex debilis*, a new natural hybrid from  
321 Ontario. *Rhodora*, 95: 129-136.

322 Catling P. M., Reznicek A. A., Crins W. J. (1990): Introduction. *Canadian Journal of*  
323 *Botany* 68: 1405-1408.

324 DeBodt S., Maere S., Van de Peer Y. (2005): Genome duplication and the origin of  
325 angiosperms. *Trends in Ecology and Evolution* 20: 591-597.

326 Escudero M., Eaton D. A. R., Hahn M., Hipp A. L. (2014): Genotyping-by-sequencing  
327 as a tool to infer phylogeny and ancestral hybridization: A case study in *Carex*  
328 (Cyperaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 79: 359-367.

329 Escudero M., Hipp A. L., Luceño M. (2010): Karyotype stability and predictors of  
330 chromosome number variation in sedges: A study in *Carex* section *Spirostachyae*  
331 (Cyperaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 57: 353-363.

332 Frod B. A., Ball P. W., Ritland K. (1993): Genetic and macromorphologic evidence  
333 bearing on the evolution of members of *Carex* section *Vesicariae* (Cyperaceae) and their  
334 natural hybrids. *Canadian Journal of Botany* 71: 486-500.

335 Hendrichs M., Michalski S., Begerow D., Oberwinkler F., Hellwig F. H. (2004):  
336 Phylogenetic relationship in *Carex*, subgenus *Vignea* (Cyperaceae), based on ITS  
337 sequences. *Plant Systematics and evolution* 246: 109-125.

338 Hipp A. L., Reznicek A. A., Rothrock P., Weber J. A. (2006): Phylogeny and  
339 classification of *Carex* section *Ovales* (Cyperaceae). *International Journal of Plant*  
340 *Sciences* 167(5): 1029-1048.

341 Hipp A. L., Rothrock P. E., Roalson E. H. (2009): The evolution of chromosome  
342 arrangements in *Carex* (Cyperaceae). *Botanical Review* 75: 96-109.

343 Jiménez-Mejías P., Escudero M., Guerra-Cárdenas S., Lye K. A., Luceño M. (2011).  
344 Taxonomic delimitation and drivers of speciation in the Ibero-North African *Carex* sect.  
345 *Phacocystis* river-shore group (Cyperaceae). *American Journal of Botany* 98: 1855-  
346 1867.

347 King M. G., Roalson E. H. (2009). Isolation and characterisation of 11 microsatellite  
348 loci from *Carex macrocephalla* (Cyperaceae). *Conservation Genetics* 10: 531 – 533.

349 Koopman J. (2011): *Carex* Europaea. The genus *Carex* L. (Cyperaceae) in Europe, 1. –  
350 Margraf Publishers, Weikersheim.

351 Korpelainen H., Virtanen V., Kostamo K., Väre H. (2010): Hybridization and  
352 introgression in *Carex aquatilis* and *C. paleacea*. *Plant Systematics and Evolution*  
353 287:141–151.

354 Košnar J., Štech M., Koutecký P. (2012): Environmental control of clonal growth in  
355 *Carex nigra*: What can be masked under the name *Carex nigra* subsp. *juncella* in the  
356 Czech Republic? *Flora* 207: 294-302.

357 Luceño M., Guerra M. (1996): Numerical variations in species exhibiting holocentric  
358 chromosomes: a nomenclatural proposal. *Caryologia* 49: 301-309.

359 Mallet J. (2005): Hybridization as an invasion of the genome. *Trends in Ecology and*  
360 *Evolution* 20: 229-237.

361 Naisbit R. E., Jiggins C. D., Mallet J. (2003): Mimicry: developmental genes that  
362 contribute to speciation. *Evolution & Development* 5:3: 269–280.

363 Nei M. (1987): Molecular evolutionary genetics. Columbia university press.

364 Ohsako T., Yamane K. (2007): Isolation and characterization of polymorphic  
365 microsatellite  
366 loci in Asiatic sand sedge, *Carex kobomugi* Ohwi (Cyperaceae). *Molecular Ecology*  
367 *Notes* 7: 1023 – 1025.

368 Paun O., Fay M. F., Soltis D. E., Chase M. W. (2007): Genetic and epigenetic  
369 alterations after hybridization and genome doubling. *Taxon* 56(3): 649–656.

370 Paun O., Forest F., Fay M. F., Chase M. W. (2009): Hybrid speciation in angiosperms:  
371 parental divergence drives ploidy. *New Phytologist* 182: 507–518.

372 Peakall R., Smouse P. E. (2012): GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population  
373 genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 28: 2537-2539.

374 Reed D. H., Frankham R. (2001): How closely correlated are molecular and quantitative  
375 measures of genetic variation? A meta-analysis. *Evolution* 55(6): 1095–1103.

376 Reznicek A. A. (1990): Evolution in sedges (*Carex*, Cyperaceae). *Canadian Journal of*  
377 *Botany* 68: 1409-1432.

378 Rieseberg L. H. (1995): The role of hybridization in evolution: old wine in new skins.  
379 *American Journal of Botany* 82(7): 944-953.

380 Rieseberg L. H., Willis J. H. (2007): Plant speciation. *Science* 317(5840): 910–914.

381 Rotreklová O., Bureš P., Řepka R., Grulich V., Šmarda P., Hralová I., Zedek F.,  
382 koutecký T. (2011): Chromosome numbers of *Carex*. *Preslia* 83: 25–58.



383 Řepka R., Štěřba T., Roleček J. (2013): *C. x moravica* (*C. caryophyllea* x *C. fritschii*), a  
384 new nothospecies identified by morphological and anatomical characters. *Acta Musei*  
385 *Moraviae, Scientiae biologicae* 98: iii-iii.

386 Řepka R., Veselá P., Mráček J. (2014): Are there hybrids between *Carex flacca* and *C.*  
387 *tomentosa* in the Czech Republic and Slovakia? *Preslia* 86: 367-379.

388 Smith T. W., Waterway M. J. (2008): Evaluating species limits and hybridization in the  
389 *Carex complanata* complex using morphology, amplified fragment length  
390 polymorphisms, and restriction fragment analysis. *Botany* 86: 809-826.

391 Stenström A., Jónsdóttir I. S., Augner M. (2002): Genetic and environmental effects on  
392 morphology in clonal sedges in the Eurasian Arctic. *American Journal of Botany* 89(9):  
393 1410-1421.

394 Tanaka N. (1949): Chromosome studies in the genus *Carex* with special reference to  
395 aneuploidy and polyploidy. *Cytologia* 15:15–29.

396 Volkova P. A., Shipunov A. B., Elven R., Brochmann C. (2008): The seashore sedges  
397 of the Russian Kola Peninsula: how many species? *Flora* 203: 523-533.

398 Vos P., Hogers R., Bleeker M. et al. (1995): AFLP: a new technique for DNA  
399 fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23: 4407–4414.

400 Waterway M. J., Hoshino T., Masaki T. (2009): Phylogeny, species richness, and  
401 ecological specialization in Cyperaceae tribe Cariceae. *Botanical Review* 75:138–159.

402 Wieclaw H., Koopman J. (2013): Numerical analysis of morphology of natural hybrids  
403 between *Carex hostiana* and the members of *Carex flava* agg. (Cyperaceae). *Nordic*  
404 *Journal of Botany* 31: 464–472.

- 405 Więclaw H., Wilhelm M. (2014): Natural Hybridization within the *Carex flava*  
406 Complex (Cyperaceae) in Poland: Morphometric Studies. *Annales Botanici Fennici*  
407 51(3): 129-147.
- 408 Wronska-Pilarek D., Janyszek M., Jagodzinski A. M. (2010): Pollen morphology of  
409 selected Central European species from subgenera *Vignea* and *Carex* (*Carex*,  
410 Cyperaceae) and its relation to taxonomy. *Botanical Journal of the Linnean Society* 164:  
411 422–439.
- 412 Yakimovski S. B., Rieseberg L. H. (2014): The role of homoploid hybridization in  
413 evolution: A century of studies synthesizing genetics and ecology. *American Journal of*  
414 *Botany* 101(8): 000-000.
- 415 Yen A. C., Olmstead R. G. (2000): Molecular systematics of Cyperaceae tribe Cariceae  
416 based on two chloroplast DNA regions: *ndhF* and *trnL* intron-intergenic spacer.  
417 *Systematic Botany* 25(3): 479-494.

418

419

Tab. 1: Allelic composition of taxa and their putative hybrids

	CM01	Cko1-9	Cko2-139	Cko1-47	Cko1-11	Cko2-112	CM35
<i>C. acutiformis</i>	<b>261, 267, 274</b>	216, <b>217</b>	258, <b>259</b>	<b>143</b>	<b>216, 218, 223, 263</b>		
<i>C. nigra</i>	249, 259, 264, 282, 286	166, 205, 208, 209, 211, 212, 216, 223	209, 247, 249, 251, 253, 254, 258	141, 148, 150, 154, 156, 160	186, 190, 191, 194		
<i>C. acutiformis</i> × <i>nigra</i>	<b>261, 274</b>	<b>217</b>	<b>259</b>	<b>143</b>	<b>216, 218</b>		
<i>C. paniculata</i>	<b>217, 222, 224</b>	<b>213</b>	<b>255</b>			<b>206, 227</b>	<b>192</b>
<i>C. echinata</i>	231, <b>233</b>	168, 189, 215, 219, <b>221</b>	210, 231, 258, 261, <b>263</b>			<b>231</b>	<b>192</b>
<i>C. paniculata</i> × <i>echinata</i>	<b>217, 233</b>	<b>213, 221</b>	<b>255, 263</b>			<b>206, 231</b>	<b>192</b>
<i>C. paniculata</i>	217, 222, <b>224</b>	<b>213</b>	<b>255</b>		<b>188, 190, 207, 209, 215</b>	206, 227	<b>192</b>
<i>C. appropinquata</i>	<b>224</b>	211, <b>213</b>	253, <b>255</b>		<b>188</b>	<b>241</b>	<b>192</b>
<i>C. paniculata</i> × <i>appropinquata</i>	<b>224</b>	<b>213</b>	<b>255</b>		<b>188</b>	228, <b>241</b>	<b>192</b>
<i>C. caryophylla</i>	270, <b>273, 274, 276</b>	213, 221, 223	255, 263, 265			217, 225, 227, 239	<b>204</b>
<i>C. fritschii</i>	<b>273, 276, 279, 288</b>	203, 204, 210	245, 246, 251, 252			213, <b>216</b>	195
<i>C. ×moravica</i> 1	<b>273, 276</b>	<u>211</u>	<u>253</u>			<u>221, 222</u>	<b>204</b>
<i>C. ×moravica</i> 2	<u>255, 279</u>	<u>202</u>	<u>244</u>			<b>216, 218</b>	<b>204</b>

420

421

422 Tab. 2: Percentages of molecular variance within and among populations

	Percentages of molecular variance			
	within populations		among populations	
	AFLP	microsatellites	AFLP	microsatellites
pa, ec, pc × ec	19	49	81	51
ac, ni, ac × ni	36	53	64	47
ca, fr, moravica1,2	24	33	76	67
pa, ap, pa × ap	39	46	61	54

423 pa = *C. paniculata*, ec = *C. echinata*, pc × ec = *C. paniculata* × *echinata*, ac = *C.*  
 424 *acutiformis*, ni = *C. nigra*, ac × ni = *C. acutiformis* × *nigra*, ca = *C. caryophyllea*, fr =  
 425 *C. fritschii*, moravica1,2 = *C. ×moravica1*, *C. ×moravica2*, ap = *C. appropinquata*, pa ×  
 426 ap = *C. paniculata* × *appropinquata*

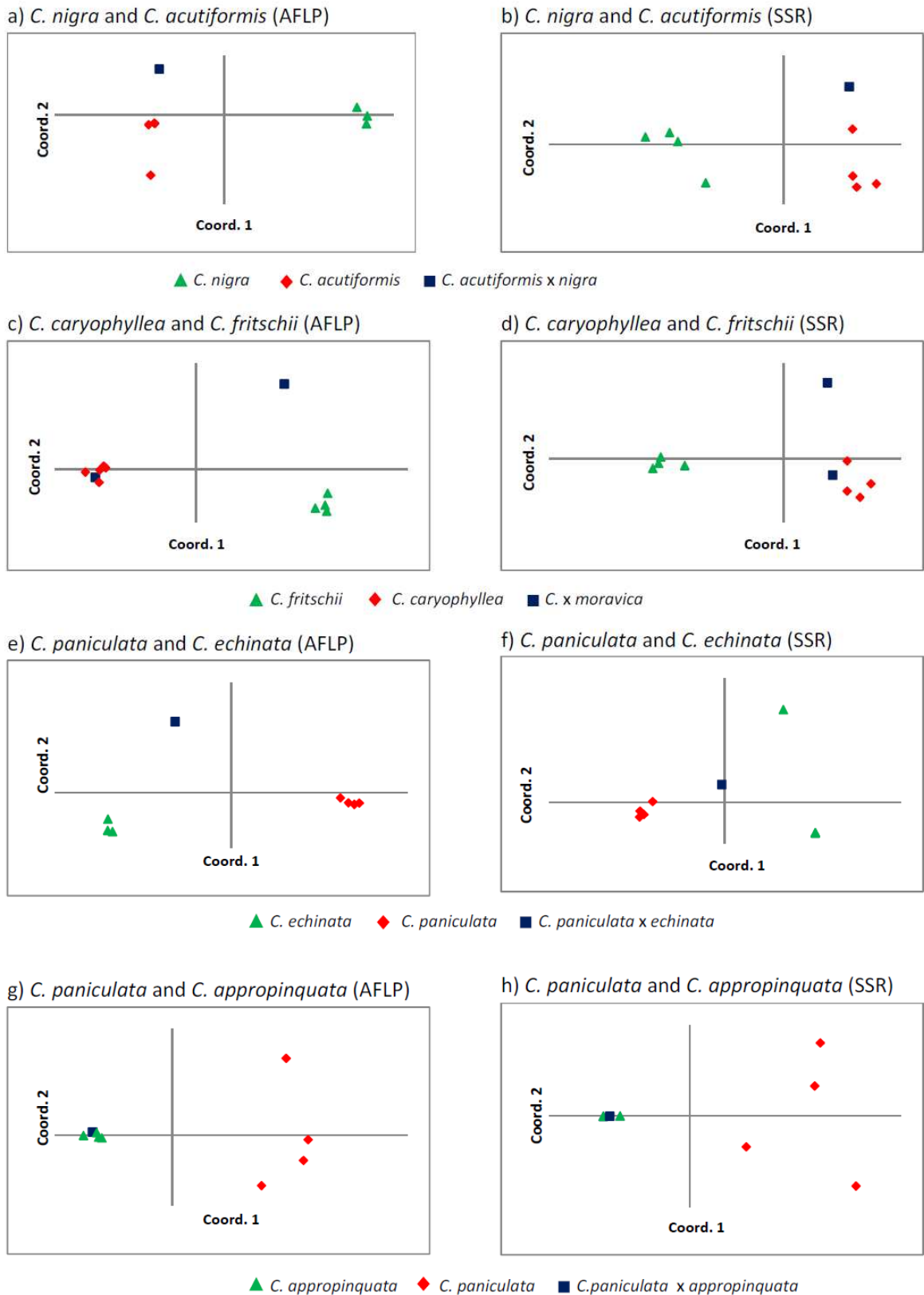
427

428

429 Tab. 3: Nei's Genetic Distances for taxon pairs

		Nei's Genetic Distances	
		AFLP	microsatellites
<i>C. paniculata</i>	<i>C. paniculata</i> × <i>echinata</i>	0,563	0,293
<i>C. paniculata</i>	<i>C. echinata</i>	0,754	1,268
<i>C. paniculata</i> × <i>echinata</i>	<i>C. echinata</i>	0,372	0,416
<i>C. acutiformis</i>	<i>C. acutiformis</i> × <i>nigra</i>	0,101	0,577
<i>C. acutiformis</i>	<i>C. nigra</i>	0,518	2,158
<i>C. acutiformis</i> × <i>nigra</i>	<i>C. nigra</i>	0,541	x
<i>C. fritschii</i>	<i>C. ×moravica2</i>	0,228	2,333
<i>C. fritschii</i>	<i>C. ×moravica1</i>	0,597	2,151
<i>C. ×moravica2</i>	<i>C. ×moravica1</i>	0,547	1,386
<i>C. fritschii</i>	<i>C. caryophyllea</i>	0,480	2,720
<i>C. ×moravica2</i>	<i>C. caryophyllea</i>	0,440	1,176
<i>C. ×moravica1</i>	<i>C. caryophyllea</i>	0,133	1,004
<i>C. paniculata</i>	<i>C. paniculata</i> × <i>appropin.</i>	0,407	0,381
<i>C. paniculata</i>	<i>C. appropinquata</i>	0,362	0,373
<i>C. paniculata</i> × <i>appropin.</i>	<i>C. appropinquata</i>	0,064	0,028

430



431

432 Fig. 1: PCoA plot depicting genotype differentiation among parental species and  
 433 putative hybrid samples; in left column for AFLP data, in right column for  
 434 microsatellite data

## 435 Supplementary table1:

sample nr.	species	locality	region (country)	note
1	<i>Carex acutiformis</i>	Grygov	Olomouc Region (CZ)	
2	<i>Carex acutiformis</i>			provided by Petr Bureš
3	<i>Carex acutiformis</i>	Studénka	Moravian-Silesian Region (CZ)	
4	<i>Carex acutiformis</i>	Vidnava	Olomouc Region (CZ)	
5	<i>Carex acutiformis</i> × <i>nigra</i>	Vidnava	Olomouc Region (CZ)	
6	<i>Carex appropinquata</i>	Vidnava	Olomouc Region (CZ)	
7	<i>Carex appropinquata</i>			provided by Petr Bureš
8	<i>Carex appropinquata</i>	Hluboká	Vysočina Region (CZ)	
9	<i>Carex appropinquata</i>	Lendak	Prešov Region (SK)	
10	<i>Carex caryophylla</i>	Chvojnica	Trenčín Region (SK)	
11	<i>Carex caryophylla</i>	Svatá Helena (Banát)	Cares-Severin Region (RO)	
12	<i>Carex caryophylla</i>	Svatá Helena (Banát)	Cares-Severin Region (RO)	
13	<i>Carex caryophylla</i>	Chvojnica	Trenčín Region (SK)	
14	<i>Carex echinata</i>	Prein an der Rax	Lower Austria (AT)	
15	<i>Carex echinata</i>	Hutě pod Třemšínem	Mid-Bohemian Region (CZ)	
16	<i>Carex echinata</i>	Bansko	Blagoevgrad Region (BG)	
17	<i>Carex echinata</i>	Campu lui Neag	Transilvania Region (RO)	
18	<i>Carex fritschii</i>	Hodonín	South Moravian Region (CZ)	
19	<i>Carex fritschii</i>			provided by Petr Bureš
20	<i>Carex fritschii</i>	Vedrovice	South Moravian Region (CZ)	
21	<i>Carex fritschii</i>	Valtice	South Moravian Region (CZ)	
22	<i>Carex nigra</i>	Berezovka	Altayskiy kray region (RU)	
23	<i>Carex nigra</i>	Nepomuk	Plzeň Region (CZ)	
24	<i>Carex nigra</i>	Petrosani	Hunedoara County region (RO)	
25	<i>Carex nigra</i>	Vidnava	Olomouc Region (CZ)	
26	<i>Carex paniculata</i>	Prein an der Rax	Lower Austria (AT)	
27	<i>Carex paniculata</i>	Lendak	Prešov Region (SK)	
28	<i>Carex paniculata</i>	Vidnava	Olomouc Region (CZ)	
29	<i>Carex paniculata</i>	Stankovany	Žilina Region (SK)	
30	<i>Carex paniculata</i> × <i>echinata</i>	Campu lui Neag	Transilvania Region (RO)	
31	<i>Carex</i> × <i>moravica</i> 1	Vedrovice	South Moravian Region (CZ)	
32	<i>Carex</i> × <i>moravica</i> 2		CZ	
33	<i>Carex</i> × <i>rotae</i>	Vidnava	Olomouc Region (CZ)	

436