Für Markus und Henriette



Rosa agrestis SAVI var. s*epium* THUILL (Zeichnung: Pierre-Joseph Redouté (1817-1824): Les Roses. Paris)

„Die Rosenarten sind schwierig zu unterscheiden, noch schwieriger zu bestimmen; mir scheint die Natur viele zu mischen oder im Spiel aus einer viele zu bilden; deshalb wird derjenige, der wenige Arten gesehen hat, dieselben leichter unterscheiden, als derjenige, der viele gesehen hat.“
(C. Linnaeus: Species Plantarum. Tom.1. Impensis Laurentii Salvii, Holmiae 1753, S. 492)

Evolution von Hundsrosen (*Rosa* L. sect. *Caninae* (DC.) SER.)

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller- Universität Jena

von Diplom-Biologin Christiane Ritz

geboren am 23. März 1978 in Karl-Marx-Stadt, jetzt Chemnitz

Inhaltsverzeichnis

1. **Einleitung** 5
1.1 Die Untersuchungsgruppe 5
1.2. Die Canina-Meiose 6
1.3. Die Reproduktion 8
1.4. Die Evolution der Gruppe 8
1.5. Morphologie und Klassifikation 10
1.6. Hybridisierung und Merkmalsvererbung 10
1.7. Rostpilze auf Rosen 11
1.8. Zielsetzung 11
2. **Übersicht zu den Manuskripten** 13
3. **Manuskript I:** 15
Ritz, C. M., Schmuths, H., Wissemann, V. (2005): Evolution by reticulation: European dogroses originated by multiple hybridization across the genus *Rosa*. *Journal of Heredity* 96 (1): 4-14.
4. **Manuskript II:** 27
Wissemann, V. & Ritz, C. M. (2005): The genus *Rosa* (Rosoideae, Rosaceae) revisited: molecular analysis of nrITS-1 and *atp*B-*rbc*L intergenic spacer (IGS) versus conventional taxonomy. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 147: 275-290.
5. **Manuskript III:** 44
Ritz, C. M. & Wissemann, V. (2003): Male correlated non-matroclinal character inheritance in reciprocal hybrids of *Rosa* section *Caninae* (DC) SER. (Rosaceae). *Plant Systematics and Evolution*. 241 (3-4): 213-221.
6. **Manuskript IV:** 54
Ritz, C. M., Maier, W. F. A., Oberwinkler, F. & Wissemann, V. (im Druck, akzeptiert am 03. März 2005): Different evolutionary histories of two *Phragmidium* species infecting the same dogrose hosts. *Mycological Research.*
7. **Gesamtdiskussion** 72
7.1. Diskussion der verwendeten Methoden 72
7.1.1. Nachweis des hybridogenen Ursprungs der *Caninae* mit nrITS-1 72
7.1.2. nrITS-1 und *atp*B-*rbc*L-IGS- Phylogenien 73
7.1.3. Morphologische Analyse der intrasektionellen Hybriden der *Caninae* 73
7.1.4. Phylogenetische und ökologische Untersuchungen der Rosenroste 74
7.2. Der hybridogene Ursprung der *Caninae* 74
7.3. Schwestergruppen der Ur-*Caninae* und intrasektionelle Gliederung 77
7.4. Intrasektionelle Hybridisierung der *Caninae* und Merkmalsvererbung 80
7.5. Rostpilze auf Hundsrosen 82
7.6. Hybridisierung als Evolutionsfaktor in der Sektion *Caninae* 83
8. **Zusammenfassung / Summary** 84
9. **Referenzen** 86

Anhang: Abbildungen 1 und 3 (vergrößert) aus Manuskript I

1. Einleitung

Rosen haben eine Jahrtausende alte Kulturgeschichte und gehören zu den ältesten Zierpflanzen der Welt. Ihre extreme phänotypische Plastizität hat Systematikern seit Generationen enorme Schwierigkeiten bereitet. Diesen „schlechten Ruf“ haben Rosen vor allem der Sektion *Caninae* (Hundsrosen) zu verdanken. Die Diversität der Hundsrosen hat besonders im 19. Jahrhundert eine Flut von Artbeschreibungen ausgelöst. Natürliche Einheiten innerhalb der *Caninae* sind aufgrund genereller Merkmalsarmut der Taxa einerseits und der Fähigkeit zur inter- als auch intrasektionellen Hybridisierung andererseits schwer zu erkennen (Gustafsson 1944; Feuerhahn & Spethmann 1995; Wissemann & Hellwig 1997). Entscheidend für die Rosenforschung war die Entdeckung der in der Natur einmaligen Canina-Meiose (Täckholm 1920; Blackburn & Harrison 1921; Täckholm 1922). Die *Caninae* befinden sich in einem Stadium permanenter Anorthoploidie (Grant 1971), bei der ein meist pentaploider somatischer Zustand durch die Befruchtung einer tetraploiden Eizelle mit einer haploiden Spermazelle aufrechterhalten wird. Diese Heterogamie resultiert in einer betont matroklinen Merkmalsvererbung, da 4/5 des Genoms mütterlich und nur 1/5 väterlich sind. Die Anorthoploidie der *Caninae* ließ viele Wissenschaftler vermuten, dass Hundsrosen allopolyploid durch Hybridisierung entstanden sind (Gustafsson & Håkansson 1942; Fagerlind 1948; Stebbins 1951; Zielinski 1985). Den ersten molekulargenetischen Hinweis auf allopolyploide Entstehung der *Caninae* konnte Wissemann (1999, 2000a, 2002) mit Analysen von nrITS-Sequenzdaten (nuclear ribosomal internal transcribed spacers) liefern.
Die Genese biologischer Diversität in den *Caninae* hat nicht nur Auswirkung auf die Radiation und Speziation in der Gruppe selbst, sondern kann auch die Evolution mit ihr obligat verbundener Parasiten beeinflussen. Rostpilze der Familie Phragmidiaceae sind stark durch koevolutive Prozesse an die Rosaceae gebunden (Savile 1979). Am Beispiel der Rosenroste der Gattung *Phragmidium* kann untersucht werden, ob die Radiation der *Caninae* eine Speziation ihrer Parasiten nach sich zieht.

1.1. Die Untersuchungsgruppe

Die Gattung *Rosa* L. umfasst weltweit etwa 200 Arten und ist in den temperaten Zonen der Nordhemisphäre verbreitet (holarktisches Florenelement). Sie ist in vier Untergattungen gegliedert: *Hulthemia* (DUMORT.) FOCKE, *Platyrhodon* (HURST) REHDER, *Hesperhodos* COCKERELL und *Rosa* (Rehder 1949; Wissemann 2003a). Die ersten drei Untergattungen sind entweder monotypisch oder beinhalten lediglich zwei Arten, während über 95 % aller Rosen in der Untergattung *Rosa* vereinigt sind. Innerhalb dieser Untergattung werden zehn Sektionen unterschieden: *Banksianae* LINDL. (2 Arten), *Bracteatae* THORY (1-2 Arten), *Caninae* (DC.) SER. (ca. 50 Arten), *Carolinae* CRÉP. (5 Arten), *Cinnamomeae* (DC.) SER. (ca. 80 Arten), *Indicae* THORY (3 Arten), *Laevigatae* THORY (1 Art), *Pimpinellifoliae* (DC.) SER. (ca. 15 Arten), *Rosa* (1 Art) und *Synstylae* DC. (ca. 25 Arten) (Rehder 1949; Wissemann 2003a). Als Typusart ist momentan *Rosa centifolia* L. gültig, aber umstritten (Wissemann 2003a).

Die Erstbeschreibung der *Caninae* wurde von De Candolle in (Seringe 1818) als ranglose *Rosa* K. *Caninae* veröffentlicht und von Seringe im Prodromus von (De Candolle 1825) als Sektion eingestuft.
Die aktuelle Gliederung der Hundsrosen in sechs Subsektionen (Henker 2000; Wissemann 2003a) beruht auf Christ (1873) und Crépin (1892).
Die Sektion *Caninae* ist aufgrund ihrer hybridogenen Entstehung nicht durch spezifische morphologische Merkmale, aber durch ihre einzigartige Meiose gut abzugrenzen (Zielinski 1985).

1.2. Die Canina-Meiose

Die Canina-Meiose wurde erstmals von Täckholm (1920, 1922) und Blackburn & Harrison (1921) bei Hundsrosen beobachtet. Nahezu simultan gelang es ihnen zu zeigen, dass die Basiszahl in *Rosa* x = 7 und nicht wie zuvor von Strasburger (1904) angenommen, x = 8 beträgt. Daraus ergibt sich die für die meisten *Caninae* zutreffende pentaploide somatische Zahl von 2n = 5x = 35. Die tetra- bis hexaploiden Arten der Sektion *Caninae* (2n = 4x, 5x, 6x = 28, 35, 42) verbindet ein anomales Syndeseverhalten, bei dem sowohl gepaarte Chromosomen (Bivalente) als auch ungepaarte Chromosomen (Univalente) vorliegen (Täckholm 1920, 1922). Eine pentaploide Art bildet in der Meiose 7 Bivalente und 21 Univalente (7 II +21 I). Die Anzahl der Bivalente ist auch in tetra- bzw. hexaploiden Arten gleich, es ändert sich lediglich die Zahl der Univalente (14 bzw. 28 Univalente). Die Meiose läuft in der Mikro- und Megasporogenese verschieden ab, da die Univalente in unterschiedlicher Weise auf die Tochterzellen aufgeteilt werden.
In einer pentaploiden Pollenmutterzelle liegen die 14 Bivalente in der Äquatorialebene und werden von den 21 Univalenten umgeben. Die Bivalente trennen sich und wandern zu den Polen. Die Univalente werden in Chromatiden gespalten, diese beginnen erst dann zu den Polen zu wandern, wenn die Chromosomen der Bivalente die Pole fast erreicht haben. Da die neue Kernmembran schon gebildet wird, gelangen nicht alle Chromatiden der Univalente in die Telophasenkerne. Die Univalente liegen frei im Plasma oder sind in Zwergkernen eingeschlossen. Die zweite meiotische Teilung führt zu einem weiteren Ausschluss von Univalenten aus den Mikrosporenkernen. Die Bivalente werden in Chromatiden gespalten und zu den Polen gezogen. Die Chromatiden der Univalente bleiben in der Äquatorialebene. Es entstehen Mikrosporen, die die sieben paarungsfähigen Chromosomen enthalten und Mikrosporen, die Zwergkerne mit einer unbestimmten Anzahl von Univalenten enthalten. Nur die Pollenkörner, die genau sieben Chromosomen besitzen, sind lebensfähig, alle anderen Pollenkörner mit abweichenden Chromosomenzahlen degenerieren.
In der Embryosackmutterzelle einer pentaploiden Art ordnen sich in der Metaphase I die Univalente oberhalb der Bivalente im mikropylaren Teil der Äquatorialebene an. Während der Anaphase trennen sich die Bivalente normal und wandern in Polrichtung, die Univalente hingegen bewegen sich ausschließlich zum mikropylaren Pol. Im weiteren Verlauf entwickelt sich nur der mikropylare Tochterkern weiter, so dass Eizellen mit 28 Chromosomen entstehen.

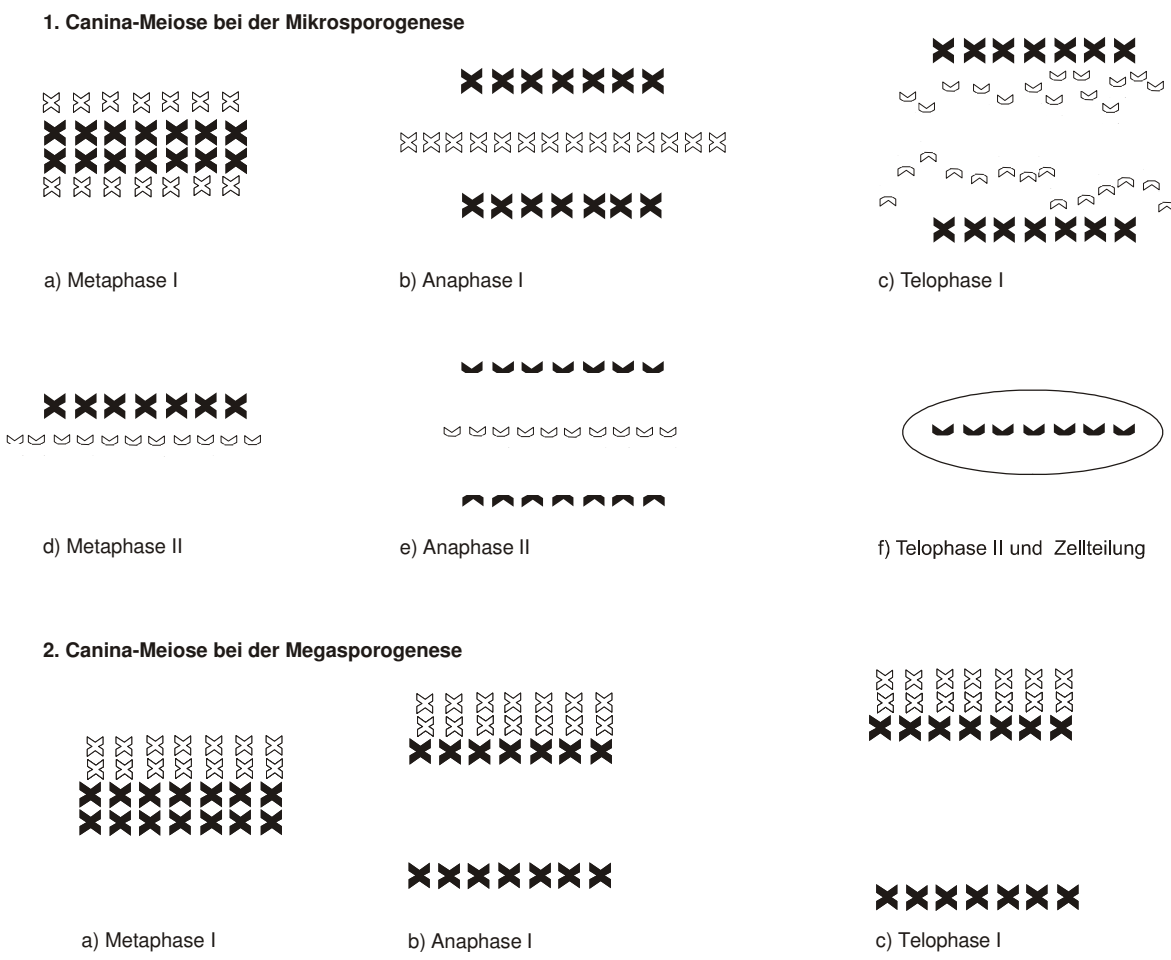


Abb.1: Schema zur Canina-Meiose während der Mikro- und Megasporogenese einer tetraploiden Hundsrose (2n = 4x = 28) nach Täckholm (1922). Die 14 Bivalente sind schwarz, die 14 Univalente weiß dargestellt. Es entstehen haploide Mikrosporen und triploide Megasporen.

1. Canina-Meiose bei der Mikrosporogenese: *a) Metaphase I*: Bivalente und Univalente liegen in der Äquatorialebene, die Bivalente paaren, *b) Anaphase I*: Die Bivalente werden zu den Polen gezogen, die Univalente bleiben noch in der Äquatorialebene und beginnen sich in Chromatiden zu teilen, *c) Telophase I*: Die Bivalente erreichen die Pole, die Chromatiden der Univalente werden zu den Polen gezogen, *d) Metaphase II*: Die Bivalente befinden sich in der Äquatorialebene, die Univalente, die in der Telophase I die Pole erreicht haben liegen ebenfalls in der Äquatorialebene, *e) Anaphase II:* die Chromatiden der Bivalente trennen sich, die Chromatiden der Univalente bleiben in der Äquatorialebene, *f) Telophase II und Zellteilung*: Nur die Kerne, die die Chromatiden der Bivalente enthalten, entwickeln sich zu fertilen Mikrosporen.

2. Canina-Meiose bei der Megasporogenese: *a) Metaphase I:* Die Bivalente liegen in der Äquatorialebene und paaren, die Univalente befinden sich ausschließlich im mikropylaren Teil der Äquatorialebene, *b) Anaphase I:* Die Bivalente werden zu den Polen gezogen, die Univalente wandern ausschließlich zum mikropylaren Pol, *c) Telophase II:* Die eine Hälfte der Bivalente erreicht den chalazalen Pol, die andere Hälfte der Bivalente und alle Univalente erreichen den mikropylaren Pol. Es entwickelt sich nur der mikropylare Telophasenkern weiter. Die zweite meiotische Teilung verläuft normal und ist nicht dargestellt.

1.3. Die Reproduktion

Täckholm (1920, 1922) nahm an, dass dieses heterogame System durch Apomixis aufrechterhalten wird. Blackburn & Harrison (1921) halten sporadische sexuelle Reproduktion für möglich. Fagerlind (1940) betrachtet die *Caninae* als voll sexuell und bestreitet jeden Hinweis auf Apomixis. Dingler (1908), Matsson (1912) und Schwertschlager (1915) nahmen an, dass Hundsrosen sich ursprünglich v. a. xenogam reproduzierten. Die Reproduktion der *Caninae* folgt ihrer Meinung nach einem Trend von der Xenogamie zur Autogamie hin zur Apomixis. Neuere Arbeiten von Wissemann & Hellwig (1997), Reichert (1998a) und Werlemark (2000) beweisen das Vorkommen von Apomixis in Hundsrosen. Wissemann & Hellwig (1997) konnten mit Kreuzungsexperimenten zeigen, dass die *Caninae* sich vorzugsweise xenogam reproduzieren. In ihrem Experiment wurde eine höhere Anzahl fertiler Samen bei xenogamen Kreuzungen als bei autogamen Kreuzungen gebildet. Die Anzahl der fertilen Samen, die durch Apomixis hervorgegangen sind, ist um ein Vielfaches geringer als die Anzahl der xenogam gebildeten Samen. Im Gegensatz dazu haben Fagerlind (1940) und Werlemark (2000) keinen Unterschied in der Anzahl der Samen nach sexueller Reproduktion und nach Apomixis feststellen können. In dieser Untersuchung wurde Apomixis allerdings nicht experimentell festgestellt, sondern nur aufgrund rein maternaler RAPD-Markervererbung vermutet.

1.4. Die Evolution der Gruppe

Die charakteristischen Asyndeseverhältnisse bei Hundsrosen führten zu verschiedenen Theorien über den vermutlichen Ursprung der Gruppe. Blackburn & Harrison (1921), Täckholm (1922) und Blackburn (1925) nahmen an, dass Hundsrosen Primärbastarde zwischen diploiden Rosen und polyploiden Ur-*Caninae* sind. Täckholm (1922) hielt eine polytope Entstehung für wahrscheinlich, da seiner Meinung nach die tetra- bis hexaploiden *Caninae* aus jeweils verschiedenen Hybridisierungsereignissen mit tetra, hexa- oder dekaploiden Ur-*Caninae* hervorgegangen sind. Hurst (1925) betrachtete einen hybridogenen Ursprung der *Caninae* als unwahrscheinlich. Er postulierte eine ausgestorbene dekaploide Stammart, deren Nachfahren in der Evolution ganze Chromosomensätze bis hin zur diploiden Stufe verloren haben. An rezenten diploiden Arten können die fünf Chromosomensätze (Septette), die in der hypothetischen dekaploiden Stammart zu finden waren, morphologisch genau charakterisiert werden (z.B. Septett A ist gekennzeichnet durch eine bogenförmige Wuchsform, zurückgeschlagene und früh abfallende Kelchblätter, Septett B zeichnet sich durch eine starr aufrechte Wuchsform und persistierende Kelchblätter aus, usw.). Die Betrachtungsweise, dass ausschließlich ganze Chromosomensätze ohne Rekombination vererbt werden, führt zu einem nahezu mathematischen Artkonzept. Jede heute existierende Rosenart ist durch eine Genomformel gekennzeichnet (z.B. *Rosa canina* AABDE) und verdankt ihre morphologischen Merkmale allein der Kombination der jeweiligen Chromosomensätze. Diese Septett-Theorie wurde aufgrund cytologischer Befunde und evolutionsbiologischer Gesichtspunkte vielfach

angegriffen (Erlanson 1929, 1938; Gustafsson & Håkansson 1942; Fagerlind 1944; Gustafsson 1944; Blackhurst 1948), außerdem wurde nie eine dekaploide Rosenart gefunden (Fagerlind 1944).

Gustafsson & Håkansson (1942) und Gustafsson (1944) modifizierten das Genomformelsystem von Hurst. Sie schlossen aus dem Syndeseverhalten und der Vererbung morphologischer Merkmale von Kreuzungen aus Hundsrosen mit *Rosa rugosa* THUNB. auf einen internen autotriploiden Zustand der *Caninae*. Ihrer Meinung nach sind die *Caninae* autoalloploid: in der Eizelle liegen zwei nicht paarungsfähige Genome und ein diploider Satz von paarungsfähigen Chromosomen vor, von denen sich einer mit dem Chromosomensatz aus dem Pollenkorn vereinigt. Demgegenüber ergaben die cytologischen Beobachtungen von Fagerlind (1948), dass sich alle Genome der Gattung *Rosa* mehr oder weniger homolog zueinander verhalten und das Syndeseverhalten keinen Rückschluss auf die interspezifisch polyploide Natur der *Caninae* zulässt. Fagerlind (1944, 1948) und Blackhurst (1948) nahmen an, dass die Canina-Meiose von einem spezifischen Genkomplex gesteuert wird und nicht aus den Homologieverhältnissen der beteiligten Genome resultiert.

Zielinski (1985) vermutete, dass nur zwei Genome aus den „Prä-*Caninae*“ für die Canina-Meiose verantwortlich sind. Diese diploiden, der *Rosa canina* L. sehr ähnlichen Stammformen entwickelten die Canina-Meiose und hybridisierten dann mit verschiedenen Vertretern anderer Rosengruppen im Spättertiär. Im Pleisto- und Holozän begannen die Hybriden sich rasant auszubreiten. Diese Hypothese wird durch Untersuchungen von Wissemann (1999, 2000a, 2002) gestützt, der den allopolyploiden Ursprung der *Caninae* erstmals molekulargenetisch nachgewiesen hat. Wissemann fand in pentaploiden Arten maximal vier verschiedene nrITS-Typen (A-, B-, C-, E-Typ). Diese Typen repräsentieren seiner Meinung nach die verschiedenen Genome der Hundsrosen, da Ma et al. (1997) nur jeweils eine NOR-Region (nucleolus organizer region) pro Chromosomensatz identifiziert hat. Der nrITS-C-Typ ist für die *Caninae* spezifisch, und sein Auftreten ist mit der Canina-Meiose korreliert (Wissemann 1999, 2000a, 2002). Eine Studie mit Mikrosatellitenmarkern von Nybom et al. (2004) weist ebenfalls darauf hin, dass pentaploide *Caninae* vier unterschiedliche, aber homologe Genome beinhalten, von denen eines diploid vorliegt und vorwiegend an der Bivalentenbildung beteiligt ist. Wulff (1954) beobachtete dagegen das spontane Auftreten einer canina-ähnlichen Meiose bei einer Nicht-Hundsrose *Rosa* x *ruga* LINDL. (*Rosa arvensis* HUDS. x *R. chinensis* JACQ.). Er folgerte, dass das Zusammenspiel einer endomitotischen Autopolyploidisierung und einer Mutation der die Meiose regulierenden Gene partielle Asyndese auslösen kann und die *Caninae* daher mehrfach autopolyploid entstanden sind.

Molekulargenetische Untersuchungen innerhalb der Gattung *Rosa* lieferten bisher keine eindeutigen Ergebnisse über die Verwandtschaftsbeziehungen der *Caninae* (Millan et al. 1996; Matsumoto et al. 1997; Matsumoto et al. 1998; Matsumoto et al. 2000). Es wurden nur wenige Arten untersucht und mit den verwendeten Markern (cpDNA- und nrITS-Sequenzen, RAPD) nur schlecht aufgelöste Stammbäume erstellt.

1.5. Morphologie und Klassifikation

In „Species Plantarum“ beschrieb Linnaeus (1753) zwölf Arten der Gattung *Rosa*. Bis zum Ende des 19. Jahrhunderts in der so genannten „analytischen Phase der Rosensystematik“ vermehrte sich die Anzahl der Rosenarten inflationär. Besonders innerhalb der *Caninae* wurden anhand unterschiedlicher Merkmalen (Hagebuttenform, Bestachelung, Bedrüsung der Blätter und Blütenstiele, Blättchenserratur) hunderte Arten in Europa beschrieben (Crépin 1869; Déséglise 1877). Das erste große monographische Werk „Die Rosen der Schweiz“ von Christ (1873) markiert einen Wendepunkt in der Rosensystematik. Christ kehrt sich von der analytischen Betrachtungsweise damaliger Rhodologen ab und reduziert durch sein synthetisches Modell die *Caninae* auf ca. 30 Arten. Er klassifiziert die Rosen anhand der Gesamtheit ihrer Merkmale, das heißt jede Rosenart ist durch eine Kombination verschiedener miteinander korrelierter Merkmale charakterisiert. Daraus ergeben sich innerhalb der *Caninae* mehreren Verwandtschaftsreihen, die ein annähernd natürliches System beschreiben. In späteren Arbeiten wie der Rosenmonographie von Keller (1931), und der „Flora Europaea“ von Klášterský (1968) wird die Einteilung nach Christ beibehalten. Sie ist auch heute noch aktuell (Henker 2000; Wissemann 2003a).
Großen Wert legte Christ (1873, 1844) auf die Korrelation morphologischer Merkmale mit der Ökologie der Arten. Als erstes erkannte Baker (1869) zwei morphologische Typen, bei denen Griffelbehaarung und das Verhalten der Kelchblätter nach dem Abblühen korreliert sind. Christ (1873, 1844) fügte zu diesen beiden Typen noch weitere morphologische Merkmale (Kronblattfarbe, Fruchtstiellänge, Durchmesser des Griffelkanales, Blattgröße und Zeitpunkt der Fruchtreife) hinzu und stellte einen Zusammenhang dieser Merkmale mit dem Vorkommen der Typen fest („Arten der Ebene und Arten der Berge“). Dingler (1907) schloss sich den Überlegungen Christs an und erwähnte als zusätzliches Merkmal der vikariierenden Typen die bogige bzw. gedrungene Wuchsform. Da die ökologische Trennung dieser beiden morphologischen Typen nicht absolut ist, hat Reichert (1998b) die Bezeichnung L-Typ und D-Typ und die Übergangsform L/D-Typ eingeführt. Pflanzen des L-Typs (laxus, loose, locker) sind durch eine bogige Wuchsform, abfallende Kelchblätter, einen engen Griffelkanaldurchmesser (<1mm) und späte Hagebuttenreife gekennzeichnet. Rosen des D-Typs (densus, dense, dicht) sind durch eine gedrungene Wuchsform, persistierende Kelchblätter und einen weiten Griffelkanaldurchmesser (>1mm) charakterisiert. Der L/D-Typ beinhaltet alle Phänotypen zwischen den beiden Typen und umfasst eine sehr heterogene Gruppe von Rosen, die sich nicht in die beiden eng umschriebenen Extreme einordnen lassen.

1.6. Hybridisierung und Merkmalsvererbung

Hybridisierung ist ein bedeutendes Phänomen in der Gattung *Rosa* (Keller 1931; Graham & Primavesi 1993; Wissemann & Hellwig 1997). Kreuzungen sind nach bisherigen Erkenntnissen zwischen allen Rosenarten sogar zwischen Vertretern verschiedener Sektionen und Untergattungen möglich. Hybriden innerhalb der *Caninae* sind in der Natur oft sehr schwierig bis überhaupt nicht zu erkennen, da die Pollenfertilität selbst zwischen

den Elternarten stark streut (Wissemann & Hellwig 1998) und die Kreuzungen nicht zwangsläufig steril sind (Gustafsson & Håkansson 1942; Fagerlind 1944; Gustafsson 1944; Fagerlind 1948, 1951; Stebbins 1951; Zielinski 1985; Eigner 1993; Wissemann & Hellwig 1997; Eigner & Wissemann 1999). Hybriden der *Caninae* sind zum einen durch den Mangel an spezifischen Merkmalen innerhalb der Sektion und zum anderen durch die matrokline Merkmalsvererbung infolge der Canina-Meiose morphologisch schwer zu charakterisieren. Beispielsweise gibt es keine Möglichkeit, die Hybride *Rosa canina* L. x *R. corymbifera* BORKH. anhand von morphologischen Merkmalen von Ihren Elternarten zu unterscheiden, da beide sich nur durch das einzige Merkmal „Behaarung der Blattunterseiten" unterscheiden. Untersuchungen an experimentell erzeugten Hybriden der *Caninae* wurden von einer Reihe von Wissenschaftlern durchgeführt (Gustafsson & Håkansson 1942; Gustafsson 1944; Fagerlind 1948; Stebbins 1951; Zielinski 1985; Feuerhahn & Spethmann 1995; Nybom et al. 1997; Werlemark et al. 1999; Werlemark et al. 2000; Wissemann 2000b; Werlemark & Nybom 2001; Nybom et al. 2004). Erwartungsgemäß wurde die Mehrzahl aller morphologischen Merkmale und auch der molekularen Marker ausschließlich maternal vererbt. Interessanterweise beobachtete Gustafsson (1944), dass das taxonomisch bedeutende Merkmal „Abfallen oder Perisistieren der Kelchblätter nach dem Abblühen" vom Pollenelter gesteuert wird.

1.7. Rostpilze auf Rosen

Rostpilze der Gattung *Phragmidium* gehören zu den bedeutendsten Parasiten auf Rosen. Alle Vertreter der Phragmidiaceae haben einen autözischen Lebenszyklus (ohne Wirtswechsel) und sind ausschließlich auf den Rosaceae verbreitet. Die Koevolution zwischen Rosten und ihren Wirten ist so eng, dass das Vorkommen von bestimmten Rostarten Rückschlüsse auf die phylogenetischen Beziehungen der Wirte erlaubt (Savile 1979). Gäumann (1959) beschreibt vier Arten der Gattung *Phragmidium* auf Hundsrosen, von denen *Phragmidium mucronatum* (PERS.)SCHLTDL. und *P. tuberculatum* J.MÜLLER die häufigsten sind. Ob die offensichtlich starke Radiation der *Caninae* auch eine Kospeziation ihrer Parasiten induziert oder ob diese Prozesse durch Hybridisierung innerhalb der Wirte verschleiert werden, ist bisher nicht untersucht (Floate & Whitham 1993).

1.8. Zielsetzung

Der Evolutionsfaktor Hybridisierung spielt in der Evolution der *Caninae* eine bedeutende Rolle. Die *Caninae* sind hybridogen entstanden und ich habe in dieser Arbeit versucht, anhand molekularer Methoden Rückschlüsse über die Herkunft und die verwandtschaftlichen Beziehungen der Hybridgenome zu ziehen. Eine morphologische Analyse von künstlichen Hybriden der *Caninae* hat gezeigt, dass wahrscheinlich auch innerhalb der Hundsrosen Hybridisierungsereignisse vorkamen oder auch gegenwärtig noch auftreten. Rostpilze der Gattung *Phragmidium* sollten Aufschluss darüber geben, ob

die Radiation der *Caninae* eine Kospeziation ihrer Parasiten induziert oder ob die retikulate Evolution der Wirte diese verhindert.

Der allopolyploide Ursprung der *Caninae* wurde anhand von nrITS-Sequenzen untersucht. Die Arbeiten von Wissemann (1999, 2000a, 2002) zeigten, dass vier verschiedene ITS-Typen die an der Entstehung der *Caninae* beteiligten Genome repräsentieren. Es stellte sich die Frage, ob diese ITS-Typen auch in anderen Sektionen der Gattung *Rosa* zu finden sind und Rückschlüsse darüber erlauben, welche Vorfahren rezenter Rosen an der hybridogenen Entstehung der Hundsrosen beteiligt waren. Weiterhin sollte geklärt werden, ob der ITS-C-Typ, wie von Wissemann postuliert (Wissemann 1999, 2000a, 2002), ausschließlich in Hundsrosen vorkommt und damit das Genom der Ur-*Caninae* repräsentiert oder ob er auch in anderen Rosensektionen zu finden ist **(Manuskript I)**.

Da der ITS-C-Typ auf die Ur-*Caninae* zurückweist, habe ich anhand von phylogenetischen Analysen innerhalb der Gattung *Rosa* die möglichen Schwestergruppen der Ur-*Caninae* identifiziert. Die Variation innerhalb des ITS-C-Typs und der Chloroplastenmarker *atp*B-*rbc*L intergenic spacer (IGS) sollten Aufschluss über die phylogenetischen Beziehungen innerhalb der *Caninae* geben **(Manuskript II)**.

Mit Hilfe von morphologischen Merkmalen habe ich künstliche Hybriden aus den Kreuzungsversuchen von Wissemann & Hellwig (1997) charakterisiert, um die Auswirkung der matroklinen Vererbung auf taxonomisch bedeutsame Merkmale zu bewerten. Hierbei standen die für die L/D-Typisierung relevanten Merkmale wie Durchmesser des Griffelkanales und das Verhalten der Kelchblätter nach dem Abblühen im Vordergrund. Ich habe geprüft, ob Hybriden rein morphologisch erkennbar und von den Elternarten zu unterscheiden sind und ob sich der Reproduktionserfolg von interspezifischen Hybriden signifikant von dem ihrer Elternarten unterscheidet. Diese Untersuchungen sollten erste Anhaltspunkte darüber geben, ob Hybriden innerhalb der *Caninae* in der Natur gebildet werden und sich etablieren können **(Manuskript III)**.

Rostpilze der Gattung *Phragmidium* dienten als Modell, die Auswirkungen der Radiation der *Caninae* auf ihre Parasiten zu untersuchen. Wie von Savile (1979) auf großsystematischer Ebene gezeigt, sollte innerhalb der *Caninae* geprüft werden, ob Speziationsprozesse des Wirtes Kospeziation ihrer Parasiten nach sich zieht. Hierfür habe ich Roste von drei ausgewählten Rosenarten (*Rosa canina*, *R. corymbifera* und *R. rubiginosa* L.) gesammelt und bestimmt, um nachzuprüfen, ob ein bestimmter Rost auf den Befall einer bestimmten Rosenart spezialisiert ist. Die nrLSU-Sequenzdaten (nuclear ribosomal large subunit) der gesammelten Roste flossen in eine phylogenetische Analyse der Gattung *Phragmdium* ein, um die Verwandtschaftsverhältnisse der beobachteten Roste zu charakterisieren **(Manuskript IV)**.

2. Übersicht zu den Manuskripten

1. **Ritz, C. M., Schmuths, H., Wissemann, V. (2005): Evolution by reticulation: European dogroses originated by multiple hybridization across the genus *Rosa. Journal of Heredity.* 96 (1): 4-14.**

   In dieser Publikation wird die hybridogene Entstehung der *Caninae* anhand von nrITS-1-Sequenzdaten untersucht. Eine Haplotypenanalyse der fünf nicht-konzertierten ITS-Typen in den *Caninae* zeigt, dass Hundsrosen mehrfache Allopolyploide aus den vermutlich ausgestorbenen Ur-*Caninae* und Rosen anderer Sektionen sind.

   Die gesamten Laborarbeiten und der Hauptteil der Auswertung zu dieser Publikation wurden von mir durchgeführt. Ich habe auch im Wesentlichen das Manuskript verfasst. Heike Schmuths hat mir beim Erstellen und Auswerten des Haplotypennetzwerkes geholfen. Volker Wissemann hat diese Publikation durch sein DFG-Projekt im Schwerpunktprogramm Radiationen - Genese biologischer Diversität: „Radiation, biological diversity and host-parasite interactions in wildroses, rust fungi and insects“ (Wi 2028/1) angeregt und das Manuskript korrigiert, ergänzt und verbessert.

2. **Wissemann, V. & Ritz, C. M. (2005): The genus *Rosa* (Rosoideae, Rosaceae) revisited: molecular analysis of nrITS-1 and *atp*B-*rbc*L intergenic spacer (IGS) versus conventional taxonomy. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 147: 275-290.**

   In dieser Publikation werden die molekulargenetische Ergebnisse zur Phylogenie der Gattung *Rosa* (nrITS-Sequenzen und *atp*B-*rbc*L IGS) mit der konventionellen Taxonomie, die auf morphologischen Daten beruht, verglichen. Der ITS-C-Typ (*canina*-ITS-Typ), der die Ur-*Caninae* repräsentiert, hat zu wenige Polymorphismen, um eine Gliederung innerhalb der *Caninae* zu erkennen. Die *atp*B-*rbc*L-Phylogenie unterscheidet innerhalb der *Caninae* zwei Gruppen: Hundsrosen mit duftenden Blattdrüsen und drüsenlose bzw. Hundsrosen mit duftlosen Drüsen. Beide Molekularphylogenien deuten darauf hin, dass die Sektionen *Indicae*, *Synstylae* und *Gallicanae* Schwestergruppen zu den Ur-*Caninae* sind.

   Die Laborarbeiten und die Rekonstruktion der molekularen Phylogenien wurden von mir durchgeführt. Volker Wissemann hat den Hauptteil des Manuskriptes verfasst und die morphologischen Merkmale diskutiert. Volker Wissemann hat diese Publikation durch sein DFG-Projekt im Schwerpunktprogramm Radiationen - Genese biologischer Diversität: (Wi 2028/1) angeregt.

3. **Ritz, C. M. & Wissemann, V. (2003): Male correlated non-matroclinal character inheritance in reciprocal hybrids of *Rosa* section *Caninae* (DC) SER. (Rosaceae). *Plant Systematics and Evolution*. 241 (3-4): 213-221.**

   Mit Hilfe von morphologischen Merkmalen wurden künstliche Hybriden der *Caninae* analysiert. Wie für die heterogamen Hundsrosen zu erwarten, wurden die Merkmale Behaarung und Bedrüsung der Blätter matroklin vererbt. Erstaunlicherweise wurden die taxonomisch bedeutenden Merkmale Durchmesser des Griffelkanales und das Verhalten der Kelchblätter nach dem Abblühen paternal vererbt. Aufgrund dieses Vererbungsmusters sind bestimmte intrasektionelle Hybriden der *Caninae* mit bereits beschriebenen Hundsrosenarten morphologisch identisch. Diese Ergebnisse deuten auf das Vorkommen von Hybridisierung innerhalb der *Caninae* hin.

   Die morphologischen Untersuchung der Hybriden und die statistische Auswertung habe ich durchgeführt. Ich habe auch den Hauptteil des Manuskriptes verfasst. Volker Wissemann hat diese Publikation durch sein DFG-Projekt im Schwerpunktprogramm Radiationen - Genese biologischer Diversität: (Wi 2028/1) angeregt und das Manuskript korrigiert, ergänzt und verbessert.

4. **Ritz, C. M., Maier, W. F. A., Oberwinkler, F. & Wissemann, V. (im Druck, akzeptiert am 03. März 2005): Different evolutionary histories of two *Phragmidium* species infecting the same dogrose hosts. *Mycological Research*.**

   Auf drei ausgewählten Hundsrosenarten wurden zwei Rosenroste *Phragmidium mucronatum* und *P. tuberculatum* gefunden. Die beiden Roste zeigten innerhalb der Rosenarten keine Nischendifferenzierung. Es ist anzunehmen, dass die hybridogene Entstehung der *Caninae* und intrasektionelle Hybridisierung Kospeziationsprozesse zwischen Rosten und Rosen behindert. Trotz der großen morphologischen Ähnlichkeit und dem überlappenden Wirtsspektrum der beiden Roste sind sie in einer phylogenetischen Rekonstruktion der Gattung *Phragmidium* keine Schwestergruppen. *Phragmidium mucronatum* befindet sich in einem Monophylum mit anderen Rosenrosten, während für *P. tuberculatum* ein Wirtswechsel von *Rubus* bzw. *Sanguisorba* zu *Rosa* angenommen werden muss.

   Die Aufsammlung der Roste und die statistische Auswertung zu ihrem Vorkommen habe ich ausgeführt. Die Bestimmung der Arten, die Laborarbeiten für die molekulargenetische Analyse, die Rekonstruktion der Phylogenien und das Anfertigen des Manuskriptes wurden zu gleichen Teilen von Wolfgang Maier und mir durchgeführt. F. Oberwinkler und V. Wissemann haben diese Publikation durch ihr gemeinsames DFG-Projekt im Schwerpunktprogramm Radiationen - Genese biologischer Diversität: (Wi 2028/1, Ob24/25) angeregt und das Manuskript korrigiert, ergänzt und verbessert.

3. Manuskript I:

Ritz, C. M., Schmuths, H., Wissemann, V. (2005): Evolution by reticulation: European dogroses originated by multiple hybridization across the genus *Rosa*.
Journal of Heredity 96 (1): 4-14

Die Abbildungen 2 und 3 des Manuskriptes sind im Anhang vergrößert dargestellt.

Journal of Heredity 2005:96(1):4–14
doi:10.1093/jhered/esi011
Advance Access publication December 23, 2004
© 2005 The American Genetic Association

Evolution by Reticulation: European Dogroses Originated by Multiple Hybridization Across the Genus *Rosa*

C. M. Ritz, H. Schmuths, and V. Wissemann

From the Institute of Systematic Botany, University of Jena, Philosophenweg 16, D-07743 Jena, Germany (Ritz, Wissemann); and the Department of Experimental Taxonomy, IPK Gatersleben, Correnssstr. 3, D-06466 Gatersleben, Germany (Schmuths)

Address correspondence to C. M. Ritz at the address above, or e-mail: christiane.ritz@uni-jena.de)

Abstract

The European dogroses (*Rosa* sect. *Caninae* (DC.) Ser.) are characterized by a unique meiosis system ("canina-meiosis"), which controls the heterogamous development of tetraploid egg cells and haploid pollen grains resulting in a pentaploid somatic status. This permanent anorthoploidy is supposed to have originated by a hybridization event in the postglacial period. In this study we present molecular evidence by an analysis of nuclear ribosomal DNA data that dogroses are complex allopolyploids resulting from multiple hybridization events. As previously described, the nrITS-1 region does not undergo concerted evolution in dogroses. Thus, different ITS-1 sequences persist within single individuals. Secondary structure predictions do not point to the existence of pseudogenes within these ITS-1 types. Our data suggest that the pentaploid *Caninae* genome originated from different members of nondogroses and the now extinct Protocaninae.

The genus *Rosa* (Rosaceae) is one of the most important genus of ornamental plants in terms of economy and cultural history of humankind with about 200 species distributed in the Northern Hemisphere (Rehder 1949; Wissemann 2003a). Conventional taxonomy (Wissemann 2003a) divides the genus into four subgenera, three of which are monotypic: *Hulthemia* (Dumort.) Focke, *Platyrhodon* (Hurst) Rehder, and *Hesperhodos* Cockerell. The fourth subgenus, *Rosa*, habors about 95% of all species and is subdived into 10 sections including *Caninae*, which is subject of this study. Phylogenetic investigations on the genus have been carried out, for example, by Wu et al. (2000, 2001) and Matsumoto et al. (1998, 2000). However, results of these studies remain contradictory. The natural distribution of the genus is separated into three major geographical areas: North America, East Asia, and Europe/West Asia. The European/West Asian region is dominated by members of section *Caninae* (DC.) Ser., the dogroses, which play an essential role in the production of root stocks for ornamental rose breeding. Dogroses have an exceptional position among plants due to their unique meiotic behaviour and breeding system (Grant 1971; Wissemann 2000).

Contrary to normal meiosis, by which gametes of equal chromosome numbers are produced, canina-meiosis is a heterogamous system with haploid pollen grains and tetraploid egg cells (Blackburn and Harrison 1921; Täckholm 1920, 1922). Outbreeding leads to permanent pentaploid organisms, which are matroclinal in characters due to the differential contribution of maternal (80%) and paternal genomes (20%) (Ritz and Wissemann 2003; Wissemann and Hellwig 1997). The evolutionary origin of this peculiar phenomenon in dogroses has been under intensive discussion since the beginning of the 20th century (Wissemann 2000). Grant (1971) assumed that the system originated by hybridization leading to an allopolyploid status that enabled subsequent postglacial radiation.

To investigate the hybridogenic origin of the dogroses, we analyzed nuclear ribosomal DNA sequence data. We sequenced the internal transcribed spacer, ITS-1, which does not undergo concerted evolution in dogroses (Wissemann 2000, 2003b) as is also described for a variety of other plant genera (reviewed in Alvarez and Wendel 2003; Bailey et al. 2003). The ITS region is located within the 18S-5,8S-26S rDNA at a single nucleolus organizer region (NOR) per haploid chromosome set in *Rosa* (Ma et al. 1997). Thus, up to five paralogous ITS sequences are expected to be found in the pentaploid dogroses under the assumption that ITS sequences are concerted within a NOR. Homogeneity within NORs was observed by Schlotterer and Tautz (1994), who showed that 35S rDNA repeats within the same NOR are

more similar than copies from different NORs. The potential of nrITS sequence data to prove historical hybridization and/or polyploidization events has been shown in Rosaceae for *Amelanchier* (Campbell et al. 1997) and in other plant taxa (Ainouche and Bayer 1997; Ritland et al. 1993; Sang et al. 1995, Soltis et al. 1995; Soltis and Soltis 1991; Suh et al. 1993; Vargas et al. 1999).

Additionally, we analyzed secondary structure predictions of the nonconcerted ITS-1 paralogs to detect the possible existence of pseudogenes, which may strongly bias phylogenetic hypotheses. The ITS region is subject to evolutionary constraints related to maintenance of secondary structures and functionality (reviewed in Alvarez and Wendel 2003; Baldwin et al. 1995). Secondary structure predictions and minimum free energy of the ITS region must be treated with caution, because ITS-1 does not exist as separate molecule but forms the 35S precursor rRNA together with ITS-2, parts of the IGS, 18S rDNA, 5.8S rDNA, and 28S rDNA (Volkov et al. 2004). However, although secondary structure predictions of ITS-1 cannot be considered true structure, they can help in the identification of pseudogenes (Bailey et al. 2003; Mayol and Rossello 2001) and can support phylogenetic hypotheses (Denduangboripant and Cronk 2001; Gottschling et al. 2001; Mayol and Rossello 2001).

Here we present molecular evidence for the multiple allopolyploid origin of dogroses. Dogroses contain a mixed set of different ITS sequence types. Several of these types are also found in nondogrose sections, but one ITS type, the *canina* type, is exclusively restricted to dogroses and thus might trace the former existence of extinct ancestors of the *Caninae*, which we call Protocaninae roses.

Materials and Methods

Plant Material

The plant material was collected from the field and from botanical gardens and rose nurseries. Voucher specimens were deposited in the author's herbarium (wis). Nomenclature of the taxa is according to Wissemann (2003a) and for members of sect. *Caninae* to Klásterský (1969) as well as Henker and Schulze (1993). The list of plant samples analyzed in the study, including classification, localities, and EMBL accession numbers, is shown in Table 1.

DNA Extraction

Total DNA was extracted from silica gel–dried material of living plants or herbarium specimens using E.Z.N.A. Plant DNA Mini Kit (Peqlab Biotechnologie GmbH) following the manufacturer's instructions.

Amplification

Amplification of double-stranded DNA was performed in 25 μl containing 2.5 μl 10-fold polymerase buffer, 2.5 μl 2 mM dNTP, 10 pmol/μl of each primer, 1 U of Taq polymerase (QBiogene), 1 μl DNA template, and 1 μl DMSO to avoid the amplification of pseudogenes (Buckler and Holtsford 1996; Buckler et al. 1997).

Primers for ITS-1 regions were taken from White et al. (1990): "ITS5" 5′-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3′ and from Ochsmann (2000): "P2" 5′-CTCGATGGAA-CACGGGATTCTGC-3′. The standard polymerase chain reaction (PCR) conditions consist in a initial denaturation of 180 s at 95°C, 28 cycles of 30 s at 95°C, 1 min at 48°C, and 120 s at 72°C, with a final extension of 180 s at 72°C.

PCR products of nondogroses were directly sequenced in both directions with the same primers as for amplification with Amersham Bioscience Thermo Sequenase labeled Primer Cycle Sequencing kit with 7-deaza-dGTP. Samples of sect. *Caninae* and *Rosa* were subcloned before sequencing. PCR products were purified using Qiaquick PCR purification kit according to the manufacturer's instructions and subcloned with a *t*-tailed pBluescript II SK (+) cloning vector into the *Escherichia coli* strain JM13 via electroporation. Transformed *E. coli* cells were plated on LB agar with ampicillin (100 μg/ml), IPTG (0.2 mM), and X-Gal (40 μg/ml). White colonies were selected for growth, and these clones were picked and directly added to the amplification mix for ITS-1 and afterward sequenced (protocols and cycling profiles are identical to the ones described).

Data Analyses

DNA sequences were aligned using ClustalX 1.83 (Thompson et al. 1997) and manually edited afterward. Additionally sequences of *R. gallica* L. were taken from GenBank (accession numbers AB035656, AB043835, AB043824). The complete alignment is deposited in GenBank. A haplotype network was calculated with TCS (Clement et al. 2000) using a parsimony algorithm (Templeton et al. 1992). Within the cladogram built by TCS, we detected five different nrITS-1 types, which consist of highly homogenic sequences. These ITS-1 types are also identified by eye on the base of a combination of 13 coupled diagnostic polymorphic sites in the alignment. Consensus sequences for the five different ITS-1 types were determined based on all sequences within the respective gray shaded box in the cladogram in Figure 1. To exclude the existence of pseudogenes secondary structure predictions of the five ITS-1 types were inferred with the program Alifold (Hofacker et al. 2002). The analysis was based on separate alignments of the sequences of the different ITS-1 types identified by the TCS analysis and the diagnostic polymorphic sites (a separate alignment of one ITS-1 type contains all sequences in the respective gray shaded box in Figure 1). Alifold was run with the partition function pair probabilities fold algorithm at 20°C using DNA parameters (SantaLucia 1998) and default options.

Results

ITS Analysis

The complete alignment (length = 259) of the ITS-1 sequence data of different species of *Rosa* contains 51

Table 1. Analyzed *Rosa* species with sources and EMBL accession numbers

Taxon	Sample origin and voucher no.	EMBL no.
Subgen. *Hesperhodos* Cockerell 1913		
R. stellata Wooton	Germany, Hessen, Kassel	AJ631842
$2n = 2x = 14$	VW163	
Subgen. *Hulthemia* (Dumort.) Focke 1888		
R. persica Michx. ex Juss.	Germany, Göttingen Botanic Garden, Section Ecology	AJ631841
$2n = 2x = 14$	C10	
Subgen. *Platyrhodon* (Hurst) Rehder 1940		
R. roxburghii Tratt.	Germany, Hessen, Kassel	AJ631843
$2n = 2x = 14$	VW72	
Subgen. *Rosa*		
Sect. *Banksianae* Lindl. 1820		
R. banksiae Ait.	USA, Texas, TAMU	AJ631853
$2n = 2x, 4x = 14, 28$	VW314	
Sect. *Bracteatae* Thory 1820		
R. bracteata Wendl.	USA, Texas, TAMU	AJ631863
$2n = 2x = 14$	VW315	
Sect. *Caninae* (DC.) Ser. 1825		
R. abietina Gren. ex Christ	Switzerland, Glarus, Braunwald	AJ631940
$2n = ?$	C9_1	AJ631941
unbalanced, heterogamous	C9_2	AJ631942
	C9_3	
R. agrestis Savi	Germany, Niedersachsen, Banenrode, VW150_1	AJ631899
$2n = 5x, 6x = 35, 42$	VW150_3	AJ631956
unbalanced, heterogamous	VW150_4	AJ631957
	VW150_5	AJ631959
	VW150_6	AJ631958
	VW150_7	AJ631904
R. caesia Sm.	Germany, Schleswig-Holstein, Fehmarn	AJ631954
$2n = 5x, 6x = 35, 42$	C6_1	
unbalanced, heterogamous		
R. canina L.	Germany, Niedersachsen, Bovenden, North of	AJ631886
$2n = 5x = 35$	Göttingen	AJ631923
unbalanced, heterogamous	VW355_1	
	VW355_2	
R. rubiginosa ssp. *columnifera*	Germany, Mecklenburg-Vorpommern,	AJ631934
Schwertschlager	Neubrandenburg, Lindenberg	
$2n = 5x = 35$	C3_1	
unbalanced, heterogamous		
R. corymbifera Borkh.	Germany, Niedersachsen, Gross Schneen near	AJ631931
$2n = 5x = 35$	Göttingen	
unbalanced, heterogamous	C5_1	
R. glauca Pourr.	Germany, Niedersachsen, Botanic Garden Göttingen,	AJ631895
$2n = 4x = 28$	Section Systematics	AJ631896
unbalanced, heterogamous	VW17_1	AJ631903
	VW17_2	
	VW17_3	
R. jundzillii Besser	Germany, Rheinland-Pfalz, Mertesdorf near	AJ631884
$2n = 6x = 42$	Trier	
unbalanced, heterogamous	VW356_1	AJ631924
	VW356_2	
R. micrantha Borrer ex Sm.	Germany, Mecklenburg-Vorpommern, Neustrelitz	AJ631840
$2n = 4x, 5x, 6x = 28, 35, 42$	C2_1	AJ631887
unbalanced, heterogamous	C2_2	AJ631929
	C2_3	AJ631930
	C2_4	AJ631888
	C2_5	AJ631933
	C2_6	

Table 1. Continued

Taxon	Sample origin and voucher no.	EMBL no.
R. mollis Sm. $2n = 4x, 5x, 6x = 28, 35, 42$ unbalanced, heterogamous	Germany, Schleswig-Holstein, Geltinger Birk, Flensburg VW152_1 VW152_2 VW152_3 VW152_4 VW152_5 VW152_6 VW152_7	AJ631901 AJ631907 AJ631960 AJ631905 AJ631906 AJ631961 AJ631949
R. montana Chaix $2n = 5x = 35$ unbalanced, heterogamous	Italy, Südtirol, Vinschgau, Sonnenberg near of Schlanders C8_1 C8_2	AJ631947 AJ631948
"*R. mosqueta*" = *R. rubiginosa* L. from South America $2n = ?$ unbalanced, heterogamous	Argentinia, Provincia del Chubut, near of Parque Nacional Los Alerces, Puerto Limonoa C51_1 C51_2 C51_3 Argentina, Provincia de Neuquen, near of Parque Nacional Lanin, Hua-Hum C54_1 C54_2 C54_3 C54_4 C54_5 Argentina, Provincia de Neuquen, near of Parque Nacional Lanin, Hua-Hum C55_1	AJ631890 AJ631916 AJ631915 AJ631891 AJ631892 AJ631893 AJ631902 AJ631900 AJ631894
R. pseudoscabriuscula (R. Keller) Henker & G. Schulze $2n = 5x = 35$ unbalanced, heterogamous	Germany, Mecklenburg-Vorpommern, Burg Stargard C1_1 C1_2 C1_3	AJ631927 AJ631928 AJ631932
R. rubiginosa L. $2n = 5x = 35$ unbalanced, heterogamous	Germany, Schleswig-Holstein, Helgoland VW354_1	AJ631885
R. sherardii Davies $2n = 4x, 5x, 6x = 28, 35, 42$ unbalanced, heterogamous	Germany, Mecklenburg-Vorpommern, Neukloster VW309_1	AJ631925
R. sicula Tratt.	Germany, Sachsen-Anhalt, SGH VW161_1 VW161_2 VW161_3 VW161_4 VW161_5 VW161_6	AJ631937 AJ631938 AJ631939 AJ631889 AJ631955 AJ631946
R. stylosa Desvaux $2n = 5x, 6x = 35, 42$ unbalanced, heterogamous	Germany, Baden-Württemberg, Badenweiler C7_1	AJ631926
R. subcanina (H. Christ) R. Keller $2n = 5x = 35$ unbalanced, heterogamous	Germany, Mecklenburg-Vorpommern, Warin VW141_1 VW141_2	AJ631935 AJ631936
R. subcollina (H. Christ) R. Keller $2n = 5x = 35$ unbalanced, heterogamous	Germany, Niedersachsen, Westharz, Hohegeiss VW140_1	AJ631897
R. tomentella Léman $2n = 5x = 35$ unbalanced, heterogamous	Germany, Mecklenburg-Vorpommern, Poischendorf VW146_1	AJ631945

Table 1. Continued

Taxon	Sample origin and voucher no.	EMBL no.
R. tomentosa Sm. $2n = 5x = 35$ unbalanced, heterogamous	Germany, Mecklenburg-Vorpommern, Züsow VW142_1 VW142_2	AJ631943 AJ631944
R. villosa L. $2n = 4x, 8x = 28, 56$ unbalanced, heterogamous	Germany, Mecklenburg-Vorpommern, Lübz VW143_1 VW143_2 VW143_3	AJ631917 AJ631898 AJ631918
Sect. *Carolinae* Crép. 1891		
R. carolina Willd. I $2n = 4x = 28$	Germany, Hessen, Kassel C19	AJ631861
R. carolina Willd. II $2n = 4x = 28$	Germany, Sachsen-Anhalt, SGH C29	AJ631855
R. nitida Willd.	Germany, Niedersachsen, Göttingen, Leonard Nelson Strasse C18	AJ631860
R. palustris Marsh. $2n = 2x = 14$	Germany, Niedersachsen, Göttingen, Botanic Garden, Section Systematics C17	AJ631864
R. virginiana Herrm. $2n = 4x = 28$	Germany, Sachsen-Anhalt, SGH C28	AJ631857
Sect. *Cinnamomeae* (DC.) Ser. 1825		
R. arkansana I Porter ex. I.M. Coult $2n = 4x = 28$	Germany, Sachsen-Anhalt, SGH C30	AJ631858
R. arkansana II Porter ex. I.M. Coult $2n = 4x = 28$	Germany, Sachsen-Anhalt, SGH C35	AJ631862
R. beggeriana Schrenk $2n = 2x = 14$	Germany, Sachsen-Anhalt, SGH C24	AJ631866
R. blanda Ait. $2n = 2x = 14$	Germany, Sachsen-Anhalt, SGH C31	AJ631859
R. cinnamomea Linn. *var. glabra* $2n = 2x = 14$	Germany, Sachsen-Anhalt, SGH C21	AJ631854
R. laxa Retz $2n = 2x = 14$	China, Xinjiang, Kongur, Atoinak, 2750m, leg. M. Richter 1996–07–04 C36	AJ631881
R. majalis Herrm. $2n = 2x = 14$	Germany, Baden-Württemberg, Rottenburg/Neckar, Äuble C39	AJ631867
R. multibracteata Hemsl. et E.H. Wilson $2n = 4x = 28$	Germany, Sachsen-Anhalt, SGH C34	AJ631872
R. pendulina L. $2n = 2x = 14$	Switzerland, Engadin, Chua-Litschana C16	AJ631844
R. rugosa Thunb. $2n = 2x = 14$	Germany, Schleswig-Holstein, Sylt DL58	AJ631865
R. sertata Rolfe $2n = 2x = 14$	Germany, Sachsen-Anhalt, SGH C33	AJ631856
R. suffulta Greene $2n = 2x = 14$	Germany, Sachsen-Anhalt, SGH C32	AJ631851
R. willmottiae Hemsl. $2n = 2x = 14$	Germany, Niedersachsen, Botanic Garden, Göttingen, Section Systematics C14	AJ631871
R. woodsii Lindl. $2n = 2x = 14$	Germany, Hessen, Kassel C15	AJ631852
Sect. *Indicae* Thory 1820		
R. chinensis Jacq. $2n = 2x, 3x, 4x = 14, 21, 28$	Germany, Sachsen-Anhalt, SGH C38	AJ631847

Table 1. Continued

Taxon	Sample origin and voucher no.	EMBL no.
R. odorata (Andrews) Sweet $2n = ?$	Germany, Sachsen-Anhalt, SGH C37	AJ631848
Sect. *Laevigatae* Thory 1820		
R. laevigata Michx. $2n = 2x = 14$	USA, Texas, TAMU VW313	AJ631873
Sect. *Pimpinellifoliae* (DC.) Ser. 1825		
R. altaica Willd. $2n = 4x = 28$	Germany, Schleswig-Holstein, Fehmarn DL36	AJ631849
R. ecae Aitch. $2n = 4x = 28$	Germany, Sachsen-Anhalt, SGH DL7	AJ631878
R. foetida J. Herrm. $2n = 4x = 28$	Germany, Sachsen-Anhalt, SGH DL20	AJ631879
R. hugonis Hemsl. $2n = 2x = 14$	Germany, Sachsen-Anhalt, SGH DL6	AJ631882
R. primula Boul. $2n = 2x = 14$	Germany, Sachsen-Anhalt, SGH DL5	AJ631876
R. sericea Lindl. $2n = 2x = 14$	Germany, Sachsen-Anhalt, SGH DL18	AJ631874
R. spinosissima L. $2n = 4x = 28$	Austria, Senftenberg, Krems DL-V14 DL-V17 DL55 DL56 DL57	AJ631880 AJ631850 AJ631868 AJ631869 AJ631870
R. xanthina Lindl. $2n = 2x = 14$	Germany, Sachsen-Anhalt, SGH DL62	AJ631875
Sect. *Rosa* (*Gallicanae* DC.) Ser. 1825)		
R. gallica L. $2n = 4x = 28$	Germany, Baden-Württemberg, Rottenburg/Neckar, Seebronn VW101_1 VW101_2 sequence from EMBL database sequence from EMBL database sequence from EMBL database	AJ631908 AJ631922 AB035656 AB043824 AB043835
R. alba (= *gallica* × *dumetorum*)	Germany, Sachsen-Anhalt, SGH C25_2 C25_3 C25_4	AJ631919 AJ631951 AJ631952
R. alba var. *suaveolens*	Germany, Sachsen-Anhalt, SGH C26_1	AJ631920
R. alba "Mme. Plantier"	Germany, Sachsen-Anhalt, SGH C40_11 C40_12 C40_15	AJ631909 AJ631883 AJ631914
R. alba "Königin von Dänemark"	Germany, Niedersachsen, Göttingen, Botanic Garden, Section Systematics C41_6 C41_7 C41_8 C41_10	AJ631913 AJ631911 AJ631910 AJ631912
R. alba × *corymbifera*	Germany, Sachsen-Anhalt, SGH C44_1 C44_2 C44_3	AJ631921 AJ631953 AJ631950

Table 1. Continued

Taxon	Sample origin and voucher no.	EMBL no.
Sect. *Synstylae* DC. 1813		
R. helenae Rehd. & Wils. $2n = 2x = 14$	Germany, Hessen, Kassel C13	AJ631877
R. multiflora Thunb. ex. Murr. $2n = 2x$, $3x = 14$, 21	Germany, Niedersachsen, Göttingen, Botanic Garden, Section Systematics C12	AJ631845
R. wichurana Crép. $2n = 2x = 14$	Germany, Niedersachsen, Göttingen, Botanic Garden, Section Systematics C11	AJ631846

Subgeneric classification, nomenclature and chromosome numbers are taken from Wissemann (2003a).
Abbreviations: SGH = Europa-Rosarium Sangerhausen, Kassel: Rose collection Kassel-Wilhelmshöhe, Germany; TAMU: Collection from Texas A&M University, Dept. of Horticultural Sciences.

polymorphic sites resulting in up to 4.6% sequence divergence. In a haplotype network, nrITS-1 sequences sampled from across the genus *Rosa* were confined to five major clusters: the *canina*, *gallica*, *rugosa*, *wichurana*, and *woodsii* types (Figure 1). These five ITS-1 types, with almost no sequence variation within the cluster, can be differentiated by a characteristic combination of 13 coupled single nucleotide substitutions. The consensus sequences of the five different ITS-1 types with the diagnostic polymorphic sites are shown in Figure 2. ITS sequences of species of sect. *Caninae* and *Rosa* are nonconcerted. No double bands were detected when the ITS sequences of nondogroses were sequenced directly after PCR amplification and thus gave no hint for nonconcerted ITS evolution in these sections so far. With

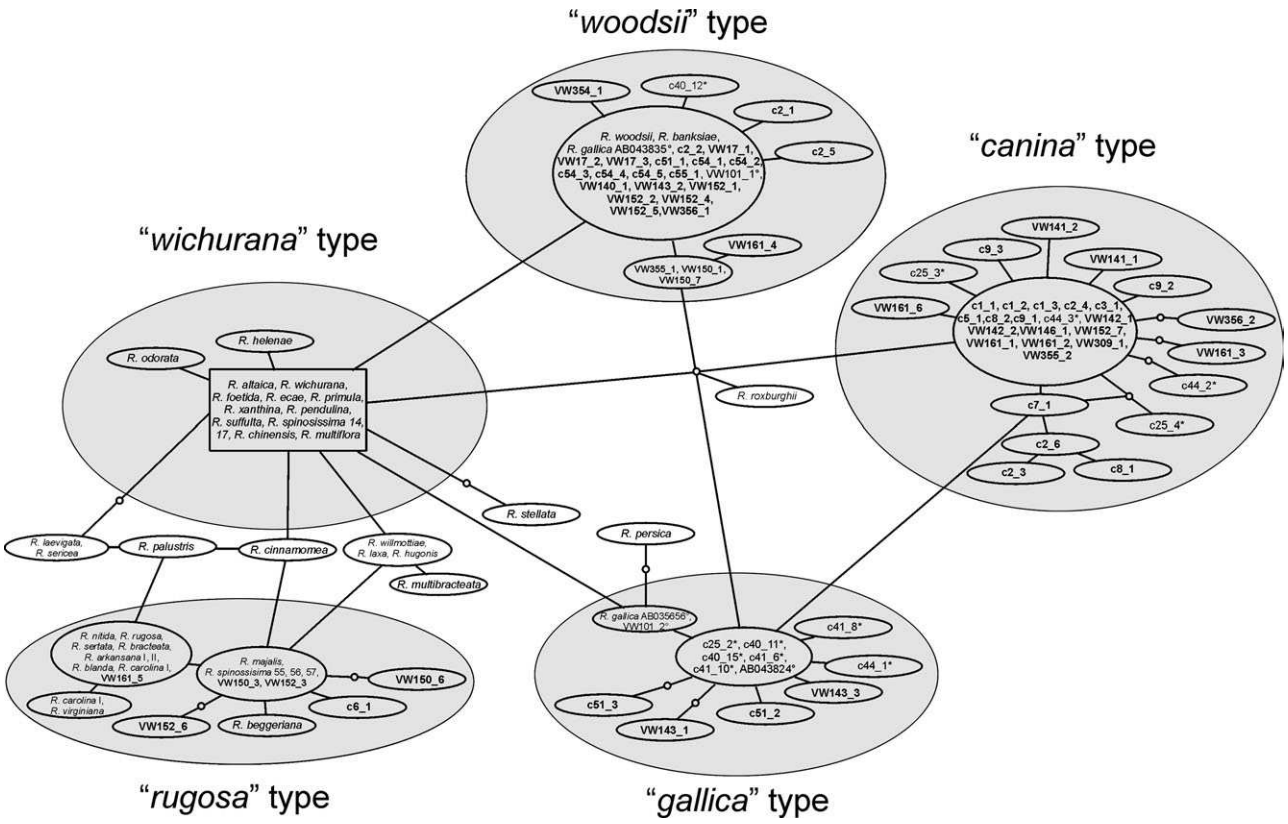


Figure 1. Haplotype network of nrITS-1 sequences from the genus *Rosa*. Clonal sequences of sect. *Caninae*, sect. *Rosa* and "Alba" roses are named by a number code. Clonal sequences of sect. *Caninae* are presented in bold, sequences of sect. *Rosa* are marked with a circle and sequences of "Alba" roses are marked with an asterisk. The first number equals a specific individual of a dogrose (see Table 1), the second number corresponds to the number of the clone. (Example: C54_2 = *Rosa rubiginosa* L., clone 2). All other rose taxa are indicated by their full species names.

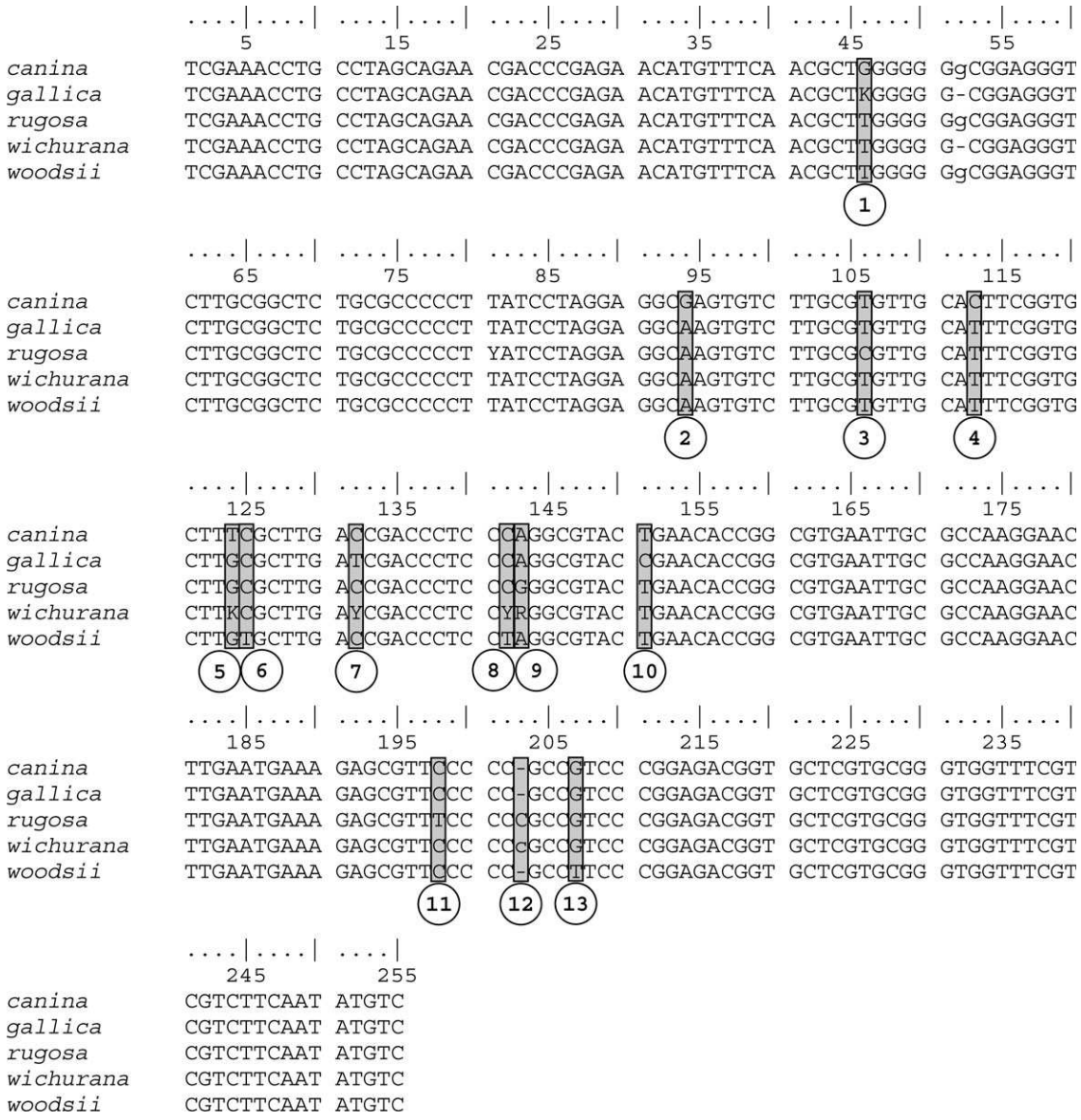


Figure 2. Alignment of the consensus sequences of the *canina*, *gallica*, *rugosa*, *wichurana*, and *woodsii* ITS-1 types. Thirteen polymorphic sites diagnostic for the respective ITS-1 types are shown by numbers in circles and are marked by gray bars.

the exception of the *wichurana* type, the various ITS-1 sequences of dogroses occurred in all ITS-1 types. The *canina* type is restricted to dogroses (sect. *Caninae*) and clones of *R.* × *alba*, a group of putative *R. canina* × *gallica* hybrids. Within the *gallica* type ITS-1 sequences of *Rosa gallica* (sect. *Rosa*), *R.* × *alba* and one dogrose individual ("*R. mosqueta*," c53) are found. Roses of other sections contain ITS-1 sequences, which are distributed within the *rugosa*, *wichurana*, and *woodsii* type. The *rugosa* type contains ITS-1 sequences of the monotypic sect. *Bracteatae* and species of sect. *Carolinae*, *Cinnamomeae*, and *Pimpinellifoliae*. The *wichurana* type occurs in species of the sections *Cinnamomeae*, *Indicae*, *Pimpinellifoliae*, and *Synstylae*. The ITS-1 sequences of *R. stellata* (subgen. *Hesperhodos*), *R. cinnamomea*, *R. multibracteata*, *R. palustris*, *R. willmottiae*, *R. laxa* (sect. *Cinnamomeae*), *R. laevigata* (sect. *Lavigatae*), *R. sericea*, and *R. hugonis* (sect. *Pimpinellifoliae*) are not directly recognized by the polymorphic sites diagnostic for the *wichurana* or *rugosa* type but have an intermediate position between these types. The *woodsii* type comprises in addition to ITS-1 sequences of sect. *Caninae* and *Rosa*, *R. banksiae* (sect. *Banksianae*) and *R. woodsii* (sect. *Cinnamomeae*).

Secondary Structures

Secondary structure predictions of the nrITS-1 sequences for the alignments of the five different ITS-1 types are shown in Figure 3. G+C content is nearly identical between these alignments (Table 2).

We identified five different domains (or arms) within the secondary structures, which are shown as shaded areas in

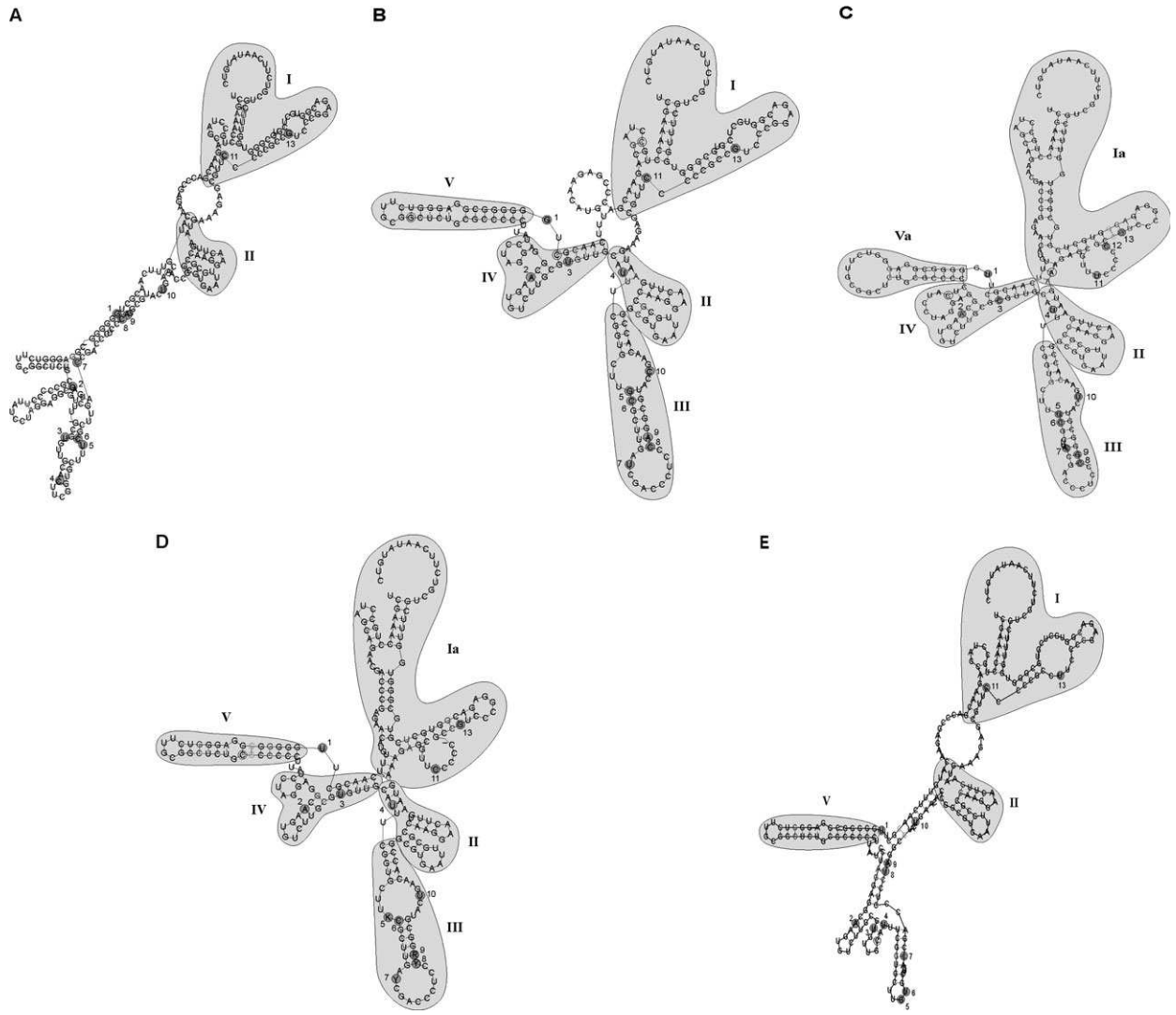


Figure 3. Secondary structures of the different ITS-1 types predicted by the program Alifold. (**A**) *Canina* type, (**B**) *gallica* type, (**C**) *rugosa* type, (**D**) *wichurana* type, and (**E**) *woodsii* type. Diagnostic polymorphic sites are marked by gray circles and numbers (see alignment in Figure 2), helix domains are marked by shaded areas and Roman letters.

Figure 3. Domain I is found in all ITS-1 types (alignment position 1–22 and 194–255) but is slightly different in the *rugosa* and *wichurana* type (alignment position 1–38 and 188–255) (Ia). Secondary structures of all ITS-1 types contain domain II. This domain is identical for the *gallica*, *rugosa*, and *wichurana* type consisting of alignment positions 111–114 and 160–187. The first part of this domain of the *canina* and *woodsii* type includes the alignment positions 32–34 instead of 111–114. This domain contains the conserved angiosperm motif GGCRY-(4 to 7n)-GYGYCAAGGAA (Liu and Schardl 1994) in all ITS-1 types. The domain III is lacking in the *canina* and *woodsii* type but present in the *gallica*, *rugosa*, and *wichurana* type consisting of the alignment positions 116–159. Domain IV is found in the *gallica*, *rugosa*, and *wichurana* type (alignment positions 39–44 and 83–110) but lacking in the *canina* and *woodsii* type. Domain V (alignment position 46–79) is present in all ITS-1 types with the exception of the *canina* type.

Secondary structures of the *rugosa* and *wichurana* type are nearly identical, sharing all five domains. The *gallica* type is also very similar to the *rugosa* and *woodsii* type but contains the domain I instead of Ia. The *canina* type differs mostly from all

Table 2. Mean G+C content of the five nrITS-1 types and minimum free energy of the predicted secondary structures

Type	G+C [%]	ΔG (20°C) [kcal/mol]
canina	59.80	−72.43
gallica	59.30	−77.33
rugosa	59.68	−75.19
wichurana	58.13	−72.42
woodsii	57.72	−71.53

other ITS types because domains III, IV, and V are replaced by a unique structure. Alifold computed the secondary structures based on the most frequent base at ambiguous sites, but results did not differ when ambiguous sites (variable positions no. 5, 7, 8, and 9 in the *wichurana* type) were directly implemented.

Discussion

ITS-1 sequences sampled from across the genus *Rosa* were confined to five major clusters: the *canina*, *gallica*, *rugosa*, *wichurana*, and *woodsii* types (Figure 1). The *woodsii*, *gallica*, and *canina* types are identical with the A-, B- and C-ITS types, respectively, detected in a previous study of dogrose species by Wissemann (2000). The apparent absence of concerted evolution of ribosomal DNA among various chromosome sets of different origin within dogroses, which putatively hybridize in nature (Ritz and Wissemann 2003) contrasts with the fast homogenization of ITS sequences in artificial *Armeria* hybrids (Aguilar et al. 1999) and with the elimination of parental rDNA in the putative hybrid *Nicotiana tabacum* (Volkov et al. 1999). On the other hand different ITS copies persist for long time periods in hybrids of *Amelanchier* (Campbell et al. 1997).

Minimum free energy values of the secondary structure predictions, the G+C content and the presence of the conserved angiosperm motif GGCRY-(4 to 7n)-GYGY-CAAGAA (Liu and Schardl 1994) in all ITS-1 types do not point to the existence of pseudogenes. Minimum free energy values and the G+C content differ only in up to 5.8 kcal/mol (2.6%), whereas Mayol and Rossello (2001) found differences of the G+C content of 12.7% and 43.6 kcal/mol of the mimimum free energy of ITS-1 sequences of *Quercus rubra* L. and thus suggested the existence of pseudogenes. We assume that all detected ITS-1 types are potentially functional, because the *rugosa*, the *wichurana*, and the *woodsii* type occur also exclusively in diploid roses of nondogrose sections. The *canina* type and the *gallica* type always co-occur with other types (e.g., in *Rosa gallica* with the *woodsii* type and in dogroses with the *woodsii* type or the *rugosa* type), but the data are inconclusive as to whether several or only one ITS types are transcribed in the plants.

Relative similarity of secondary structures corresponds with the relationships reflected in the minimum spanning tree. Secondary structures of the closely related *rugosa* and *wichurana* type are most similar to each other sharing all five helix domains. The secondary structure of the *canina* type and the *woodsii* type are most distinct from all other types, which is also mirrored by their more isolated positions.

With the exception of the *wichurana* type, ITS-1 sequences in dogroses occur in all clusters detected by us. The *canina* type is restricted to dogroses and the Alba roses (putative *R. canina* × *R. gallica* hybrids), whereas the other four types contain ITS-1 sequences of various other wild roses of different sections of *Rosa*. The coexistence of identical ITS-1 sequences in the pentaploid genomes of the dogroses on one hand and in several sections of the genus *Rosa* on the other hand suggests that the *Caninae* genome arose by hybridization. Thus our results based on molecular data confirm the hybridogenic origin of dogroses first postulated by Täckholm (1920, 1922) and also suggested by Blackburn and Harrison (1921), Gustafsson (1944), Gustafsson and Hakansson (1942), and Hurst (1925, 1928) based on cytological observations. Furthermore, our data implicate the multiple allopolyploid origin of dogroses between different ancestors of non-*Caninae* wild roses and Protocaninae. The restriction of the *canina* type sequences to dogroses implies the existence of a diploid ancestral Protocanina. By hybridogenic introgression into this diploid Protocanina the modern *Caninae* may have evolved, whereas ancient roses of the *canina* type cluster became extinct. However, the exact evolutionary process of the joining of the different nondogrose genomes and the Protocaninae genome remains unresolved. We hypothesize that the final pentaploid hybrid and its offspring became established by reproductive isolation via the *Canina* meiosis, which enabled subsequent radiation when an open landscape appeared after the end of the last glacial period in Europe.

Acknowledgments

The work was funded by a grant from the Deutsche Forschungsgemeinschaft to V.W. (Wi 2028/1). We thank the Europarosarium Sangerhausen and the Rosensammlung Kassel-Wilhelmshöhe for providing plant material and the VDR Stiftung Europa-Rosarium Sangerhausen for financial support for the analysis of the Alba-roses. The possibility to work in the molecular laboratories of F. H. Hellwig and G. Theiβen (both University of Jena) is gratefully acknowledged. We thank M. Vökel (G. Theiβen's lab) for the kind help with the cloning procedure. We also thank N. Drechsler and R. Melzer for their work in the lab. Special thanks go to K. Bachmann (Gatersleben) and V. Hemleben (Tübingen) for critical comments and discussions.

References

Aguilar JF, Rossello JA, and Feliner GN, 1999. Nuclear ribosomal DNA (nrDNA) concerted evolution in natural and artificial hybrids of *Armeria* (Plumbaginaceae). Mol Ecol 8:1341–1346.

Ainouche ML and Bayer RJ, 1997. On the origins of the tetraploid *Bromus* species (section *Bromus*, Poaceae): insights from internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA. Genome 40:730–743.

Alvarez I and Wendel JF, 2003. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. Mol Phylogenet Evol 29:417–434.

Bailey CD, Carr TG, Harris SA, and Hughes CE, 2003. Characterization of angiosperm nrDNA polymorphism, paralogy, and pseudogenes. Mol Phylogenet Evol 29:435–455.

Baldwin BG, Sanderson MJ, Porter MJ, Wojciechowski MF, Campbell CS, and Donoghue MJ, 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. Ann Missouri Bot Gard 82:247–277.

Blackburn K and Harrison JHW, 1921. The status of the British rose forms as determined by their cytological behaviour. Ann Bot 35:159–188.

Buckler ES and Holtsford TP, 1996. *Zea* ribosomal repeat evolution and substitution patterns. Mol Biol Evol 13:623–632.

Buckler ES, Ippolito A, and Holtsford TP, 1997. The evolution of ribosomal DNA: divergent paralogues and phylogenetic implications. Genetics 145:821–832.

Campbell CS, Wojciechowski MF, Baldwin BG, Alice LA, and Donoghue MJ, 1997. Persistent nuclear ribosomal DNA sequence polymorphism in the *Amelanchier* agamic complex (Rosaceae). Mol Biol Evol 14:81–90.

Clement M, Posada D, and Crandall KA, 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. Mol Ecol 9:1657–1659.

Denduangboripant J and Cronk QCB, 2001. Evolution and alignment of the hypervariable arm 1 of *Aeschynanthus* (Gesneriaceae) ITS2 nuclear ribosomal DNA. Mol Phylogenet Evol 20:163–172.

Gottschling M, Hilger HH, Wolf M, and Diane N, 2001. Secondary structure of the ITS1 transcript and its application in a reconstruction of the phylogeny of Boraginales. Plant Biol 3:629–636.

Grant V, 1971. Plant speciation. New York: Columbia University Press.

Gustafsson A, 1944. The constitution of the *Rosa canina* complex. Hereditas 30:405–428.

Gustafsson A and Hakansson A, 1942. Meiose in some *Rosa*-hybrids. Bot Not 331–343.

Henker H and Schulze G, 1993. Die Wildrosen des norddeutschen Tieflandes. Gleditschia 21:3–22.

Hofacker I, Fekete M, and Stadler PF, 2002. Secondary structure prediction for aligned RNA sequences. J Mol Biol 319:1059–1066.

Hurst CC, 1925. Chromosomes and characters in *Rosa* and their significance in the origin of species. In: Experiments in genetics, vol. 46. Cambridge: Cambridge University Press.

Hurst CC, 1928. Differential polyploidy in the genus *Rosa* L. Z. Indukt Abstammungs-Vererbungsl Supplement 2 46:46–47.

Klásterškỳ I, 1969. Die Problematik des *Rosa canina* L.—Komplexes in der Tschechoslowakei. Mitt Bot Linz 6.1 (1974).

Liu JS and Schardl CL, 1994. A conserved sequence in internal transcribed spacer-1 of plant nuclear ribosomal-RNA genes. Plant Mol Biol 26:775–778.

Ma Y, IslamFaridi MN, Crane CF, Ji Y, Stelly DM, Price HJ, and Byrne DH, 1997. *In situ* hybridization of ribosomal DNA to rose chromosomes. J Hered 88:158–161.

Matsumoto S, Kouchi M, Yabuki J, Kusunoki M, Ueda Y, and Fukui H, 1998. Phylogenetic analyses of the genus *Rosa* using the *mat*K sequence: molecular evidence for the narrow genetic background of modern roses. Scientia Horticulturae 77:73–82.

Matsumoto S, Kouchi M, Fukui H, and Ueda Y, 2000. Phylogenetic analyses of the subgenus *Eurosa* using the ITS nrDNA sequence. Acta Hort. (ISHS) 521:193–202.

Mayol M and Rossello JA, 2001. Why nuclear ribosomal DNA spacers (ITS) tell different stories in *Quercus*. Mol Phylogenet Evol 19:167–176.

Ochsmann J, 2000. Morphologische und molekularsystematische Untersuchungen an der *Centaurea stoebe* L.-Gruppe (Asteraceae-Cardueae) in Europa. Dissertationes Botanicae, 324, Berlin, Stuttgart: Cramer.

Rehder A, 1949. Bibliography of cultivated trees and shrubs hardy in the cooler temperate regions of the northern hemisphere. In: Koeltz, S. (ed.), Collectanea bibliographica, vol. 10, 296–317. Jamaica Plain. Mass.: Arnold Arboretum. Reprint 1978 by O. Koeltz Koenigstein.

Ritland CE, Ritland K, and Straus NA, 1993. Variation in the ribosomal internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2) among 8 taxa of the *Mimulus-guttatus* species complex. Mol Biol Evol 10:1273–1288.

Ritz CM and Wissemann V, 2003. Male correlated non-matroclinal character inheritance in reciprocal hybrids of *Rosa* section *Caninae* (DC) Ser. (Rosaceae). Plant Syst Evol 241:213–221.

Sang T, Crawford DJ, and Stuessy TF, 1995. Documentation of reticulate evolution in peonies (*Peonia*) using internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA—implications for biogeography and concerted evolution. Proc Natl Acad Sci USA 92:6813–6817.

SantaLucia J, 1998. A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics. Proc Natl Acad Sci USA 95:1460–1465.

Schlotterer C and Tautz D, 1994. Chromosomal homogeneity of *Drosophila* ribosomal DNA arrays suggests intrachromosomal exchanges drive concerted evolution. Curr Biol 4:777–783.

Soltis PS and Soltis DE, 1991. Multiple origins of the allotetraploid *Tragopogon mirus* (Compositae)—rDNA evidence. Syst Bot 16:407–413.

Soltis PS, Plunkett GM, Novak SJ, and Soltis DE, 1995. Genetic variation in *Tragopogon* species—additional origins of the allotetraploids *T. mirus* and *T. miscellus* (Compositae). Am J Bot 82:1329–1341.

Suh Y, Thien LB, Reeve HA, and Zimmer EA, 1993. Molecular evolution and phylogenetic implications of internal transcribed spacer sequences of ribosomal DNA in Winteraceae. Am J Bot 80:1042–1055.

Täckholm G, 1920. On the cytology of the genus *Rosa*. A preliminary note. Svensk Botanisk Tidskrift 14:300–311.

Täckholm G, 1922. Zytologische Studien über die Gattung *Rosa*. Acta Horti Bergiani 7:97–381.

Templeton AR, Crandall KA, and Sing CF, 1992. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. Genetics 132:619–632.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, and Higgins DG, 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res 25:4876–
4882.

Vargas P, McAllister HA, Morton C, Jury SL, and Wilkinson MJ, 1999. Polyploid speciation in *Hedera* (Araliaceae): phylogenetic and biogeographic insights based on chromosome counts and ITS sequences. Plant Syst Evol 219:165–179.

Volkov RA, Borisjuk NV, Panchuk II, Schweizer D, and Hemleben V, 1999. Elimination and rearrangement of parental rDNA in the allotetraploid *Nicotiana tabacum*. Mol Biol Evol 16:311–320.

Volkov RA, Medina FJ, Zentgraf U, and Hemleben V, 2004. Molecular cell biology: organization and molecular evolution of rDNA, nucleolar dominance, and nucleolar structure. Prog Botany 65:106–146.

White TJ, Lee S, and JT, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR protocols. A guide to methods and applications (Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, and White JW, eds). New York: Academic Press; 315–322.

Wissemann V, 2000. Molekulargenetische und morphologisch-anatomische Untersuchungen zur Evolution und Genomzusammensetzung von Wildrosen der Sektion *Caninae* (DC.) Ser. Botanische Jahrbücher für Systematik, Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie 122:357–429.

Wissemann V and Hellwig FH, 1997. Reproduction and hybridisation in the genus *Rosa* section *Caninae* (Ser.). Rehd Botanica Acta 110:251–256.

Wissemann V, 2003a. Conventional taxonomy of wild roses. In: Encyclopedia of rose science (Roberts A, Debener T, and Gudin S, eds). London: Academic Press; 111–117.

Wissemann V, 2003b. Hybridization and the evolution of the nrITS spacer region. In: Plant genome: biodiversity and evolution, vol. 1 part A (Sharma AK and Sharma A eds). Enfield: Science Publishers.

Wu S, Ueda Y, He HY, Nishihara S, and Matsumoto S, 2000. Phylogenetic analysis of Japanese *Rosa* species using *mat*K sequences. Breeding Sci 50:275–281.

Wu S, Ueda Y, Nishihara S, and Matsumoto S, 2001. Phylogenetic analysis of Japanese *Rosa* species using DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacers (ITS). J Hort Sci Biotechnol 76:127–132.

Received March 24, 2004
Accepted July 20, 2004

Corresponding Editor: J. Perry Gustafson

4. Manuskript II:

Wissemann, V. & Ritz, C. M. (2005): The genus *Rosa* (Rosoideae, Rosaceae) revisited: molecular analysis of nrITS-1 and *atp*B-*rbc*L intergenic spacer (IGS) versus conventional taxonomy. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 147: 275-290.

Botanical Journal of the Linnean Society, 2005, **147**, 275–290. With 2 figures

The genus *Rosa* (Rosoideae, Rosaceae) revisited: molecular analysis of nrITS-1 and *atp*B-*rbc*L intergenic spacer (IGS) versus conventional taxonomy

VOLKER WISSEMANN FLS* and CHRISTIANE M. RITZ

Friedrich-Schiller University Jena, Department of Systematic Botany, Philosophenweg 16, D-07743 Jena, Germany

Received March 2004; accepted for publication September 2004

Sequences of the nrDNA internal transcribed spacer 1 (nrITS-1) and *atp*B-*rbc*L intergenic spacer (IGS) of the cpDNA were analysed for all sections of the genus *Rosa* L. (Rosoideae, Rosaceae) to study molecular infrageneric taxonomy and relationships of *Rosa* with respect to conventional taxonomy based upon morphological and anatomical data as well as phytochemical characters. The results suggest that *Rosa* in its traditional infrageneric circumscription is not reflected by molecular data. *Cinnamomeae*, *Carolinae* and *Pimpinellifoliae* are not monophyletic based on the molecular data and this is mirrored in conventional taxonomy that separates these sections by weak morphological characters such as sepal performance, existence of bracts, and number of flowers per inflorescence. Section *Pimpinellifoliae* is split by the monotypic sections *Laevigatae*, *Platyrhodon*, *Bracteatae* and *Hesperhodos*. Section *Caninae* is a natural allopolyploid group characterized by its autapomorphic ITS C-type and Canina-meiosis. CpDNA subdivides sect. *Caninae* into two natural clusters of eglandular and glandular species. NrITS shows sect. *Synstylae*/*Indicae* to be the direct sister group to sect. *Caninae*, not *Rosa* (*Gallicanae*) although both groups are morphologically characterized by pinnate sepals. From our molecular data sect. *Indicae* and sect. *Synstylae* are consectional. The highest taxonomic rank below the generic level should be the sectional status. © 2005 The Linnean Society of London, *Botanical Journal of the Linnean Society*, 2005, **147**, 275–290.

ADDITIONAL KEYWORDS: evolution – *Hulthemia* – hybridization – molecular phylogeny – wild roses.

INTRODUCTION

Rosa L. is distributed throughout the temperate and subtropical regions of the Northern hemisphere (Rehder, 1949). The genus comprises about 200 species and the taxonomic treatment of the highly diverse group is complicated due to biological phenomena in reproductive biology, insufficient morphological and anatomical characters to adequately discriminate between species and the human impact by rose breeding (Wissemann, 2003a). Conventional taxonomy (Rehder, 1949; Wissemann, 2003a) divides the genus into four subgenera, three of which are monotypic or contain two species: *Hulthemia* (Dumort.) Focke, 1888, *Platyrhodon* (Hurst) Rehder, 1940, *Hesperhodos* Cockerell, 1913 and *Rosa*. A fourth subgenus *Rosa* harbours about 95% of all species and is subdivided into ten sections: *Pimpinellifoliae* (DC.) Ser. 1825; *Rosa* (= sect. *Gallicanae* (DC.) Ser. 1825); *Caninae* (DC.) Ser. 1825; *Carolinae* Crép., 1891; *Cinnamomeae* (DC.) Ser. 1825; *Synstylae* DC. 1813; *Indicae* Thory, 1820; *Banksianae* Lindl., 1820; *Laevigatae* Thory, 1820; *Bracteatae* Thory, 1820. Since the lectotypification by Britton & Brown (1913), *R. centifolia* L. from the former *Gallicanae* is the generic type. However, this typification has been disputed (e.g. de la Roche, 1978; Rowley, 1992) but the proposal to replace this typification by *R. cinnamomeae* L. as been rejected by the nomenclatural committee in Tokyo 1995 and again in Saint Louis 2000 and thus *R. centifolia* is still the valid choice.

Since roses have been of great influence on human cultural evolution, the earliest attempts to classify the genus date back to the 16th century, when roses were treated either as wild or 'gentle' species and were additionally divided based on petal colour (Wissemann,

*Corresponding author. E-mail: Volker.Wissemann@uni-jena.de

2000). This was accepted until Linnaeus (1753, 1772) classified all species of *Rosa* known at that time, mainly on the shape of the hip. Willdenow (1811) introduced the presence and form of prickles as well as the indumentum and occurrence of glands as taxonomic relevant characters. From then on, the number of described species increased rapidly into several thousands (most prominent Déséglise, 1877; Gandoger, 1892) mirroring uncertainty about the diversity of roses rather than insight into evolutionary processes (Wissemann, 2003a). Delimitation of species in nature, as indicated by natural populations, has been a problem in roses for a long time. Introduction of different gene pools by replanting of disturbed or protected areas is one of the most serious problems for conservation genetics. Herrmann (1762) claimed that horticulture had merged the species so that they would be no longer recognizable. He also pointed to the shortage of phenotypic characters that delimit determination. This lack of characters has been the source of several attempts based on different markers to get insight into phylogenetic relationships within the genus. Debener, Bartels & Mattiesch (1996), Matsumoto & Fukui (1996) and Millan *et al*. (1996) used RAPD markers or RFLP studies (Matsumoto, Wakita & Fukui, 1997) to elaborate the phylogeny of *Rosa*. Sequence data from *mat*K and nrITS have been investigated for their ability to resolve the phylogeny (Matsumoto *et al*., 1998, 2000; Wu *et al*., 2000, 2001) and Grossi, Raymond & Jay 1998 and Grossi *et al.* 1999 investigated biochemical data (flavonoids and isoenzyme polymorphisms). However, results of these investigations remain contradictory due to the small sample of investigated taxa and the inadequate resolution of the markers, which in most cases were also not discussed in the context of morphology, distribution and other sources of evidence. We applied sequences of the nrDNA internal transcribed spacer 1 (nrITS-1) and the cpDNA marker: *atp*B-*rbc*L intergenic spacer (IGS) to study molecular infrageneric taxonomy and phylogenetic relationships among *Rosa* with respect to conventional taxonomy. The results are interpreted in a broader context of evolutionary biology in *Rosa*.

MATERIAL AND METHODS

TAXON SAMPLING

We sequenced four *Rubus*-species (*R. caesius* L., *R. idaeus* L., *R. saxatilis* L. and *R. ulmifolius* Schott) as outgroup taxa according to the results of the molecular analyses in Rosoideae by Eriksson *et al*. (1998, 2003). Sampling of the ingroup taxa represent all sections of the genus *Rosa* (Table 1). Table 2 presents the

Table 1. List of taxa and sources of plant material analysed. Subgeneric classification and nomenclature follows Wissemann (2003a). Accession numbers are for the EMBL data base. Abbreviations: SGH = Europa-Rosarium Sangerhausen, Germany, Aeuble = Wildrose collection of the Schwäbische Albverein Rottenburg/Neckar, Germany; Kassel: Rose collection Kassel-Wilhelmshöhe, Germany; TAMU: Collection at Texas A.M. University, Department of Horticultural Sciences, USA

Taxon	Accession	nrITS1	*atp*B-*rbc*L IGS
Subgen. *Hulthemia* (Dumort.) Focke (1888)			
R. persica Michx. ex Juss.	D-Lower Saxony Göttingen, Bot. Garden, Sect. Ecology, leg. VW	AJ631841	AJ628770
Subgen. *Platyrhodon* (Hurst) Rehder 1940			
R. roxburghii Tratt.	Kassel, leg. VW	AJ631843	AJ628823
Subgen. *Hesperhodos* Cockerell 1913			
R. stellata Wooton	Kassel, leg. VW	AJ631842	AJ628824
Subgen. *Rosa*			
Sect. *Pimpinellifoliae* (DC.) Ser. 1825			
R. altaica Willd.	Altai, Ortsausgang Aktasch, Richtung Ust-Ulangom, leg. F. Schlütz 02.09. 2000	AJ631849	AJ628774
R. ecae Aitch.	SGH, leg. V.W.	AJ631878	AJ628781
R. foetida J. Herrm.	SGH, leg. V.W.	AJ631879	AJ628785
R. hugonis Hemsl.	SGH, leg. V.W.	AJ631882	AJ628780
R. primula Boul.	SGH, leg. V.W.	AJ631876	AJ628822
R. sericea Lindl.	SGH, leg. V.W.	AJ631874	AJ628784

Table 1. *Continued*

Taxon	Accession	nrITS1	*atp*B-*rbc*L IGS
R. spinosissima L.	A-Senftenberg, Krems, Austria leg. M. Koch V14	AJ631880	AJ628787
Sect. *Rosa* (*Gallicanae* (DC.) Ser. 1825)			
R. gallica L.	D-Rottenburg/Neckar, Seebronn. leg. G. Timmermann	AJ631922	AJ628788
Sect. *Caninae* (DC.) Ser. 1825			
R. abietina Gren. ex Christ	H-Kanton Glarus, Braunwald, leg. G. Timmermann	AJ631940 (C9–1) AJ631941 (C9–2) AJ631942 (C9–3)	AJ628797
R. agrestis Savi	D-Niedersachsen, Banenrode, leg. E. Garve & H. Henker Ro 12/92	–	AJ628816
R. *caesia* Sm.	D-Schleswig-Holstein, Fehmarn, leg. V.W.	–	AJ628791
R. jundzillii L.	D-Niedersachsen, Bovenden, north of Göttingen, leg. V.W.	AJ628795	AJ631923
R. rubiginosa ssp. *columnifera*	D-Mecklenburg-Vorpommern, Neubrandenburg, Lindenberg leg. A. Mohr Schwertschlager	AJ631934 (C3–1)	AJ628811
R. corymbifera Borkh.	D-Niedersachsen, Gross Schneen near Göttingen, leg. V.W.	AJ628793	
R. dumalis Bechst.	D-Schleswig Holstein, Fehmarn, north of Bisdorf 1996, Wissemann 1013	AJ811537	–
R. elliptica Tausch	D-Thüringen, Schmon, leg. G. Schulze 5/90	–	AJ628814
R. glauca Pourr.	D-Niedersachsen, Göttingen, Bot. Garden, Sect. Systematics, leg. V.W.	–	AJ628808
R. inodora Fries	D-Mecklenburg-Vorpommern, Wismar, leg. H. Henker Ro 1/92	–	AJ628815
R. jundzillii Besser	D-Rheinland-Pfalz, Mertesdorf near Trier, leg. H. Reichert 93–199	AJ631924	AJ628794
R. micrantha Borrer ex Sm.	D-Mecklenburg-Vorpommern, Neustrelitz, leg. H. Henker Ro 46/92	AJ631929 (C2–3) AJ631930 (C2–4) AJ631933 (C2–6)	AJ628806
R. mollis Sm.	D-Schleswig-Holstein, Geltinger Birk, Flensburg, leg. V.W.	AJ631949 (VW152–7)	AJ628812
R. montana Chaix	I-Südtirol, Vinschgau, Sonnenberg near of Schlanders, leg. V.W.	AJ631947 (C8–1) AJ631948 (C8–2)	AJ628796
'*R. mosqueta*' = *R. rubiginosa* L. from South-America	Argentinia, Provincia del Chubut, Comarca Andino Parallelo 42, Warton, leg. C. Ritz	–	AJ628809
R. pseudoscabriuscula (R. Keller) Henker & G. Schulze	D-Mecklenburg-Vorpommern, Burg Stargard, leg. H. Henker Ro6/91	AJ631927 (C1–1) AJ631928 (C1–2) AJ631932 (C1–3)	AJ628810,
R. rubiginosa L.	D-Schleswig-Holstein, Helgoland, leg. V.W.	AJ631885	AJ628819
R. sherardii Davies	D-Mecklenburg-Vorpommern, Neukloster, leg. H. Henker 23/87	AJ631925	AJ628813
R. sicula Tratt.	SGH, leg. V.W.	AJ631937 (VW161–1) AJ631938 (VW161–2) AJ631939 (VW161–3)	AJ628817
R. stylosa Desvaux	D-Baden-Württemberg, Badenweiler, leg. G. Timmermann	AJ631926	AJ628798
R. subcanina (H. Christ) R. Keller	D-Mecklenburg-Vorpommern, Warin, leg. H. Henker 24/87	AJ631935 (VW141–1) AJ631936 (VW141–2)	AJ628790
R. subcollina (H. Christ) R. Keller	D-Niedersachsen, Westharz, Hohegeiss, leg. H. Henker Ro 10/92	–	AJ628792
R. tomentella Léman	D-Mecklenburg-Vorpommern, Poischendorf, leg. H. Henker 20/87	AJ631945 (VW146–1)	AJ628789

Table 1. *Continued*

Taxon	Accession	nrITS1	*atp*B-*rbc*L IGS
R. tomentosa Sm.	D-Mecklenburg-Vorpommern, Züsow, leg. H. Henker 18/87	AJ631943 (VW142–1) AJ631944 (VW142–2)	AJ628805
R. villosa L.	D-Mecklenburg-Vorpommern, Lübz, leg. H. Henker 34/88	–	AJ628807
Sect. *Carolinae* Crép. 1891			
R. carolina Willd.	SGH, leg. V.W. (C29)	AJ631855	AJ628771
R. nitida Willd.	D-Göttingen, Leonard Nelsonstrasse, leg. V.W.	AJ631860	AJ628828
R. palustris Marsh.	D-Niedersachsen, Göttingen, Bot. Garden, Sect. Systematics, leg. VW	AJ631864	AJ628830
R. virginiana Herrm.	SGH, leg. V.W.	AJ631857	AJ628776
Sect. *Cinnamomeae* (DC.) Ser. 1825			
R. arkansana I Porter ex. I.M. Coult	SGH, leg. V.W. (C30)	AJ631858	AJ628778
R. arkansana II Porter ex. I.M. Coult	SGH, leg. V.W. (C35)	AJ631862	AJ628779
R. beggeriana Schrenk	SGH, leg. V.W.	AJ631866	AJ628829
R. blanda Ait.	SGH, leg. V.W.	AJ631859	AJ628772
R. laxa Retz	China, Xinjiang, Kongur, Atoinak, 2750 m, leg. M. Richter 1996-07-04	AJ631881	AJ628775
R. majalis Herrm.	Rottenburg/Neckar, Äuble, leg. C. Ritz	AJ631867	AJ628777
R. multibracteata Hemsl. et E.H. Wilson	SGH, leg. V.W.	AJ631872	AJ628821
R. rugosa Thunb.	D-Schleswig-Holstein, Sylt, leg. D. Loessner	AJ631865	AJ628782
R. sertata Rolfe	SGH, leg. V.W.	AJ631856	AJ628773
R. suffulta Greene	SGH. Leg. V.W.	AJ631851	AJ628820
R. willmottiae Hemsl.	D-Niedersachsen, Göttingen, Bot. Garden, Sect. Systematics, leg. V.W.	AJ631871	AJ628783
R. woodsii Lindl.	Kassel, leg. V.W.	AJ631852	AJ628826
Sect. *Synstylae* DC. 1813			
R. arvensis Huds.	I-Südtiro, Kastel Feder, leg. V. W.	–	AJ628804
R. helenae Rehd. & Wils.	Kassel, leg. V.W.	AJ631877	AJ628802
R. multiflora Thunb. ex. Murr.	D-Niedersachsen, Göttingen, Bot. Garden, Sect. Systematics, leg. V.W.	AJ631845	AJ628799
R. wichurana Crép.	D-Niedersachsen, Göttingen, Bot. Garden, Sect. Systematics, leg. V.W.	AJ631846	AJ628827
Sect. *Indicae* Thory, 1820			
R. chinensis Jacq. (C38)	SGH, leg. V.W.	AJ631847	AJ628800
R. chinensis Jacq. (C20)	SGH, leg. V.W.	–	AJ628802
R. odorata (Andrews) Sweet	SGH, leg. V.W.	AJ631848	AJ628801
Sect. *Banksianae* Lindl., 1820			
R. banksiae Ait.	TAMU, leg. D. Byrne	AJ631853	AJ628825
Sect. *Laevigatae* Thory, 1820			
R. laevigata Michx.	TAMU, leg. D. Byrne	AJ631873	AJ628786
Sect. *Bracteatae* Thory, 1820			
R. bracteata Wendl.	TAMU, leg. D. Byrne	AJ631863	AJ628818
Outgroup taxa			
Rubus caesius L.	I-Südtirol, Andrian, leg. V.W.	AJ631965	–
Rubus idaeus L.	I-Südtirol, Nals, leg. V.W.	AJ631962	–
Rubus saxatilis L.	I-Südtirol, Felixer Weiher, leg. V.W.	AJ631963	AJ628832
Rubus ulmifolius Schott	I-Südtirol, Andrianer Wald, leg. V.W.	AJ631964	AJ628831

Table 2. List of taxa analysed. Subgeneric classification and nomenclature follows Wissemann (2003a). The first number indicates the estimated total number of species in the section, the second number represents the number of species included in this study

Taxon	
Subgen. *Hulthemia* (Dumort.) Focke, 1888	1/1
Subgen. *Platyrhodon* (Hurst) Rehder, 1940	1/1
Subgen. *Hesperhodos* Cockerell, 1913	2/1
Subgen. *Rosa*	184?/58
Sect. *Pimpinellifoliae* (DC.) Ser. 1825	15/7
Sect. *Rosa* (*Gallicanae* (DC.) Ser. 1825)	1/1
Sect. *Caninae* (DC.) Ser. 1825	50/25
Sect. *Carolinae* Crép., 1891	5/4
Sect. *Cinnamomeae* (DC.) Ser. 1825	80?/12
Sect. *Synstylae* DC., 1813	25/4
Sect. *Indicae* Thory, 1820	3/2
Sect. *Banksianae* Lindl., 1820	2?/1
Sect. *Laevigatae* Thory, 1820	1/1
Sect. *Bracteatae* Thory, 1820	2?/1

distribution of the sampling within the genus. All specimens are deposited at the author's herbarium (Herbarium Wissemann).

DNA ISOLATION, PCR AMPLIFICATION, SEQUENCING, CLONING

Total DNA was extracted from silica gel-dried material of living plants or herbarium specimen using E.Z.N.A. Plant DNA Mini Kit (Peqlab Biotechnologie GmbH) following the users protocol. Amplification of double stranded DNA was performed on 25 µl containing 2.5 µl 10-fold polymerase buffer, 2.5 µl 2 mM dNTP, 10 pmol μl^{-1} of each primer, 1 unit of Taq polymerase (Appligene), 1 µl DNA template. Primers for ITS-1 regions were taken from White *et al*. (1990): 'ITS5' 5′-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3′ and from Ochsmann (2000): 'P2' 5′-CTCGATGGAACACGGGATT CTGC-3′. Primers for the amplification of the 5′ end of the *atp*B-*rbc*L intergenic spacer ('2' 5′-GAAGTAGTAG GATTGATTCT-3′ and '10' 5′-CATCATTATTGTATAC TCTTTC3′)-were taken from Savolainen *et al*. (1994). The standard PCR conditions consist in an initial denaturation of 180 s at 95 °C, 28 cycles of 30 s at 95 °C, 60 s at 48 °C and 120 s at 72 °C with a final extension of 180 s at 72 °C. PCR products except for samples of ITS-1 PCR products of section *Caninae* and *Gallicanae* were directly sequenced in both directions with the same primers as for amplification with Amersham Bioscience Thermo Sequenase labelled Primer Cycle Sequencing kit with 7-deaza-dGTP. Samples of section *Caninae* and *Rosa* were subcloned before sequencing. PCR products were purified using Qiaquick PCR purification kit according to the manufacturer's instructions and subcloned with a t-tailed pBluescript II SK (+) cloning vector into the *E. coli* strain JM13 via electroporation. Transformed *E. coli* cells were plated on LB agar with ampicillin (100 µg ml^{-1}), IPTG (0.2 mM) and X-Gal (40 µg ml^{-1}). White colonies were selected for growth and these clones were picked and directly added to the amplification mix for ITS-1 and afterwards sequenced (protocols and cycling profiles are identical to the ones described above).

SEQUENCE ALIGNMENT AND PHYLOGENETIC ANALYSES

DNA sequences were aligned using ClustalX, version 1.83 (Thompson *et al*., 1997) and apparent misalignments were corrected manually. The final alignment has been deposited in TreeBase http://www.herbaria.harvard.edu/treebase/, accession numbers are given in Table 1. Phylogenetic relationships were analysed via Bayesian inference using Monte Carlo Markov chains (MCMC) was conducted with MrBayes 3.0b4 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001). Four incrementally heated simultaneous Monte Carlo Markov chains were run over 2 000 000 generations, using the general time reversible model of DNA substitution with gamma distributed substitution rates, random starting trees and default starting values of the DNA substitution model. Trees were sampled every 100 generations resulting in an overall sampling of 20 001 trees. The first 1000 trees were discarded as 'burnin'. From the remaining trees a 50% majority rule consensus tree was computed to obtain estimates for the a posteriori probabilities. Branch lengths were estimated as mean values over the sampled trees. This Bayesian approach of phylogenetic analysis was repeated four times, always using random starting trees and random starting values.

RESULTS

Description of sequence data: nrITS-1: 264 bp in total, from all positions including outgroup 75 were variable, 189 constant positions. Only ingroup: 54 variable. cpDNA: 616 bp in total, from all positions including outgroup 59 were variable, 557 constant positions. Only ingroup: 39 variable.

ITS sequences of species of sect. *Caninae* and *Rosa* evolve non-concerted (Wissemann, 1999, 2000, 2002, 2003b), polymorphisms can be easily detected by direct sequencing but required a cloning step to obtain sequences suitable for phylogenetic reconstruction. No polymorphisms (double bands) were detected when the ITS sequences of non-dog roses and non-gallicaroses were sequenced directly after PCR

Table 3. Synopsis of the main characters which (a) support or (b) conflict with the current taxonomy. For details see the Discussion

Taxon	Support	Conflict
Subgen. *Hulthemia* (Dumort.) Focke, 1888	Molecular: nrITS data support inclusion in genus *Rosa*. Morphology: leaf, pollen exine patterns, hips.	Molecular: cpDNA support sister relationship of *Hulthemia* to the remainder of the genus.
Subgen. *Platyrhodon* (Hurst) Rehder, 1940	Morphology: peeling bark, hip, number of leaflets. Reproductive biology: reduced interfertility with other species.	Molecular: nrITS and cpDNA are ambiguous.
Subgen. *Hesperhodos* Cockerell, 1913	Molecular: nrITS data and cpDNA support inclusion in genus *Rosa*. Morphology: leaf, autapomorphic pollen exine pattern, hips. Absence of disc. Cytology: few metacentric chromosomes.	Molecular: nrITS data and cpDNA support inclusion in genus *Rosa*, but uncertain placement.
Subgen. *Rosa*		
Sect. *Pimpinellifoliae* (DC.) Ser. 1825	Phytochemistry: kaempferol, quercitin 4′-glucosides). Morphology: high number of leaflets, single flowers without bracts.	Molecular: nrITS and cpDNA data do not show monophyly of the section. RFLP combines it with *Cinnamomeae*. Morphology: black hips occur also in *Cinnamomeae*.
Sect. *Rosa* (*Gallicanae* (DC.) Ser. 1825)	Molecular: Distinct ITS-sequence, but ambiguous position. Morphology: hip with long glandular stalk.	Morphology: pinnate sepals occur also in sect. *Caninae*.
Sect. *Caninae* (DC.) Ser. 1825	Molecular: nrITS data show monophyly of the allopolyploid section by existence of an autapomorphic ITS-type. CpDNA separates the section from other sections. Reproductive biology: heterogamy. Cytology: Caninae-meiosis.	Morphology: characterization is only possible by a combination of characters, no autapomorphic character state exists.
Sect. *Carolinae* Crép., 1891	Morphology: deciduous sepals. Phytochemistry: specific anthocyanin.	Molecular: *mat*K, nrITS and cpDNA data do not show monophyly of the section, species are intermixed with *Cinnamomeae*. Morphology: deciduous sepals occur also in sect. *Caninae* and are used to separate species within a section. Phytochemistry: flavonoid, enzyme polymorphisms are the same as within *Cinnamomeae*.
Sect. *Cinnamomeae* (DC.) Ser. 1825	Morphology: entire sepals, corymbose flowers. Single flowers with bracts.	Molecular: nrITS and cpDNA data do not show monophyly of the section and intermixes with *Pimpinellifoliae*. RFLP combines it with *Pimpinellifoliae*. Phytochemistry: close affinity and intermixing of biochemical patterns.
Sect. *Synstylae* DC., 1813	Morphology: agglutinated styles. Phytochemistry: biochemical data, carotene.	Molecular: nrITS and cpDNA data do not show monophyly of the section, content but consectionality with sect. *Indicae*. Phytochemistry: similar flower flavonoid composition with *Indicae*.
Sect. *Indicae* Thory, 1820	Morphology: exserted styles, but not agglutinated.	Molecular: nrITS and cpDNA data do not show monophyly of the section, but consectionality with sect. *Synstylae*. Phytochemistry: similar flower flavonoid composition with *Synstylae*.
Sect. *Banksianae* Lindl., 1820	Morphology: see Discussion.	Molecular: nrITS and cpDNA are ambiguous.
Sect. *Laevigatae* Thory, 1820	Morphology: see Discussion.	Molecular: nrITS and cpDNA are ambiguous.
Sect. *Bracteatae* Thory, 1820	Morphology: see Discussion.	Molecular: nrITS and cpDNA are ambiguous.

© 2005 The Linnean Society of London, *Botanical Journal of the Linnean Society*, 2005, **147**, 275–290

amplification and thus gave no hint for non-concerted ITS evolution in these sections so far, although they include a range of ploidy levels up to the tetraploid status. Analysis of cpDNA and nrDNA-1 sequences resulted in partly incongruent topologies of the trees. Since cpDNA is maternally inherited and nuclear sequences originate by biparental inheritance, we do not expect congruent topologies. Extensive reticulation and non-concerted evolution of the ribosomal repeat restrict the assumption of congruent trees. However, complementary information with respect to hybridization events are expected and are discussed below by the description of the different sections. The lack of resolution in certain parts is in accordance with findings by other authors employing different molecular markers (see Discussion for further possible explanation of this phenomenon). Both data sets showed *Rosa* to be monophyletic with respect to the outgroup taxa. By cp-data *Rosa persica* Michx. (section *Hulthemia*) is nested within *Rosa* and not a separate genus *Hulthemia*, supporting the view of Wissemann (2003c), but nrITS sequences place *Hulthemia* in a sister relationship to the remainder of the genus. NrITS-1 data reveal *Rosa* sect. *Caninae* to be a monophyletic group by the existence of the autapomorphic C-type ITS (Wissemann, 2000, 2002, 2003b). Within the *Caninae* nrITS does not allow any conclusion for intrasectional differentiation. However, cpDNA divides the *Caninae* species into two clades, one with odorant glands (but not discriminating between the terpentine- and the wine-scented roses) and one with either eglandular or non-odorant glanded species. By nrITS sequences, the monotypic section *Rosa* with *R. gallica* appears not to be direct sister to section *Caninae. R. gallica* is characterized by its pinnate sepals, a character to be universally expressed in the *Caninae*. *R. gallica* is completely nested with its areal and its distribution amongst the *Caninae*. However, Bayesian analysis does not mirror this relationship, here section *Synstylae* is next to section *Caninae*. Chloroplast data places *R. gallica* in an uncertain position within the *Caninae*, interestingly next to *R. tomentella*, a species from subsection *Tomentellae* but also of uncertain relationship to other *Caninae* based on morphological data. Sister to the clade of *Caninae-Rosa* (*Gallicanae*) species are members of sect. *Synstylae/Indicae* according to the cpDNA data, the close relationships result in *R. arvensis* being placed within the *Caninae-Rosa* (*Gallicanae*)-clade. Morphologically the character of agglutinated styles of the *Synstylae* is not realized in the sister clade. The sister relationship to the *Caninae* is not resolved in the trees, but is focused on the two sections *Rosa* and *Synstylae*. Based on morphological data, *R. gallica*, with its distinct pinnate sepals, more resembles the *Canina*-roses. However, pinnate sepals are also known from section *Synstylae*, for example *R. longicuspis* Bertol. NrITS and *atp*B-*rbc*L IGS sequences unify the Asian sections *Indicae* and *Synstylae* into a consectional group. The positions of the monotypic sections *Laevigatae*, *Banksianae* and *Bracteatae* and the monotypic subgenus *Platyrhodon* and *Hesperhodos* are not resolved. There is clear evidence via both genetic sources that the two sections *Cinnamomeae* and *Carolinae*, are consectional. The North American *Carolinae*-roses are morphologically only distinguished from the *Cinnamomeae* by their reflexed, spreading and deciduous sepals after anthesis, whereas the *Cinnamomeae* have erect and persistent sepals, a character state used in the *Caninae* to separate next related species. The weak and complicated morphological separation of sect. *Pimpinellifoliae* from sect. *Cinnamomeae* by mostly solitary flowers without bracts, is mirrored in both data sets, which include sequences from the *Pimpinellifoliae* into the *Cinnamomeae-Carolinae*-clade. As a future-orientated proposal, the highest subgeneric rank should be the sectional status. However, more data need to be evaluated and we discuss here the pro and cons of a new taxonomy using the backbone of conventional taxonomy.

DISCUSSION

The low resolution in *Rosa* of the molecular data in this extensive study is new for these markers, but is in accordance with low resolution obtained by the use of other markers (*mat*K; *trn*L/*trn*F: Starr & Bruneau, 2002; *mat*K: Matsumoto *et al*., 1998). The reconstruction of the evolutionary history of *Rosa* is further complicated by insufficient morphological, anatomical and phytochemical data (see Table 3). This deficiency is not due to a lack of data, but rather the non-existence of informative character states between species. From the point of cultural history, *Rosa* is a typical genus being 'oversystematized', where numerous scientists have put more opinion than knowledge into monographic studies. There is no revision available for the genus, nomenclature of the thousands of names (species and cultivars) is in its infancy, and the complicated open breeding system with interfertility of many species reticulates all taxa in the genus. The fossil record of roses dates back to the Middle Oligocene of the Cenozoic (Mai & Walther, 1978, 1988). For the uniformity of characters in *Rosa* the principal scenario is likely that the explosive radiation of the Tertiary genus happened in the Holocene of the Quaternary. The still observable close relationship of all character states is the product of a lack of time since radiation and interfertility because there was no time since the spread to develop sufficient reproductive barriers. Secondary evidence for this assumption is that neither

cpDNA nor nrITS sequence positions in the trees follow a geographical distribution of the taxa.

Ecological, geographic or genetic separation triggers speciation by genetic isolation and evolution of sterility barriers, but is rarely seen in the genus since differentiation is rare, and it has not resulted in isolation within the genus. Examples are *R. persica* from the monotypic section *Hulthemia*, which is geographically separated by its distribution in the Afghanistan region and *R. palustris* from sect. *Carolinae*, which is ecologically niched into the swampy regions in North America. Recently Rieseberg *et al*. (2003) demonstrated, that ecological transitions, and thus subsequent speciation by genetic isolation, are facilitated by hybridization. This also happened in dog roses: genetically separated (but not isolated) is the sect. *Caninae*, which is of allopolyploid origin (Wissemann, 2000, 2002) and characterized by the unique heterogamous reproduction via *Caninae*-meiosis (Täckholm, 1920; 1922) and the existence of an autapomorphic nrITS type (Ritz & Wissemann, 2003a).

Evolution of and within the subgeneric taxonomical units (nomenclature according to Wissemann, 2003a)

Subgenus *Hulthemia* (Dumort.) Focke (1888)

Our nuclear molecular data clearly demonstrate that *Hulthemia* is a member of the genus *Rosa* and is not a separate genus. This monotypic subgenus has been disputed since its description by Dumortier (1824). The outstanding character of the central Asian and east Asian (Siberian) *Rosa persica* Michx. ex Juss., 1789 is the reduction of the leaf to a single leaflet without stipules. The position of *R. persica* within the genus *Rosa* in our phylogenies (Figs 1, 2) does not indicate this simplicity to be either an archetypal or an advanced character. Within the genus *Rosa*, variability in the number of leaflets is high from 11 to 9–7 leaflets in sect. *Pimpinellifoliae*, 9–7 in *Bracteatae*, 7 (–5) in most sections, e.g. *Caninae*, 5 in *Indicae* (5)–3 in *Laevigatae* and subgenus *Hesperhodos*, and 1 in *Hulthemia*. In agreement with Parmentier (1897) we interpret the reduction to be a result of ecological adaptation to the hot summer season in the areas where they are found in central Asia (Afghanistan, Usbekistan, Iran). Two morphotypes are reported for *R. persica*, a more southern distributed form with hairy branches and leaves (Boissier, 1872; Meikle, 1966; Zielinski, 1982) and a second glabrous taxon (used in this study here) in the northern range of distribution (Bean, 1980), but the taxonomic relevance of this character state is not clear. Regel (1877) combined both types into one single species (*R. berberifolia* Pall.). Our chloroplast data of *atp*B-*rbc*L-IGS do not support the finding of Starr & Bruneau (2002) that based on chloroplast *trn*L/*trn*L-F, *Hulthemia* is nested within the subgenus *Rosa*. In our cpDNA tree *R. persica* is sister to the remainder of the genus, however, in contrast to Wu *et al*. (2001) whose nrITS data place the species with *R. stellata* (subgenus *Hesperhodos*) in a sister relationship to some species of the *Pimpinellifoliae* and *Laevigatae*. Interestingly, Ueda & Tomita (1989) claimed close phylogenetic relationships between *Pimpinellifoliae* and *Hulthemia* based on pollen exine patterns. With its chestnut-like hips and basal insertion of the seeds, the fruit characters resemble subgenus *Hesperhodos* (*R. stellata* Wooton, 1898) and the subgenus *Platyrhodon* (*R. roxburghii* Tratt., 1823). *R. persica* is able to hybridize with other species from the genus *Rosa*. This has been reported for naturally occurring plants by de la Roche (1978) and Bean (1980), as well as for ornamental breeding (Harkness, 2003). Based on similar insertion patterns of the seeds in the hip, Parmentier (1897) assumed *Hulthemia*, *Hesperhodos* and *Platyrhodon* to be closely related. Unfortunately he interpreted the insertion as a basiparietal insertion and correlated it to the similar situation in *Cinnamomeae*, by which *Cinnamomeae* became an archetype of roses in the genus. In fact, seed insertion of *Hulthemia*, *Hesperhodos* and *Platyrhodon* is only basal, thus supporting the relationship between the three subgenera. Seeds do not grow on the side walls of the hip and thus seed insertion in these three subgenera is fundamentally different from the situation in *Cinnamomeae* (see Crépin, 1898). Molecular, anatomical, as well as reproductive, data (natural hybridization with *Rosa*-species) support the view of *R. persica* being a member of the genus *Rosa*, thus *Hulthemia* is best treated as a section, but not as a separate genus.

Subgenus *Hesperhodos* Cockerell, 1913

Again the molecular data do not support the treatment of *Hesperhodos* at generic rank. At first glance the North American subgenus *Hesperhodos* seems to be most closely related to the central Asian subgenus *Hulthemia*. Both subgenera have prickly, chestnut-like hips and basal insertion of seeds. *R. stellata* has few leaflets (3–5), but which again are interpreted as the result of ecological adaptation to its dry habitat. However, our nrITS data also indicate a close relationship of the two subgenera. Morphologically, the two subgenera are separated by the existence of adnate stipules with divergent, rounded or broadened auricles in *Hesperhodos*. The most prominent morphological character of subgenus *Hesperhodos* is the complete absence of the disc. Since in both trees *R. stellata* is nested within species from subgenus *Rosa*, the elevation of *Hesperhodos* to generic rank

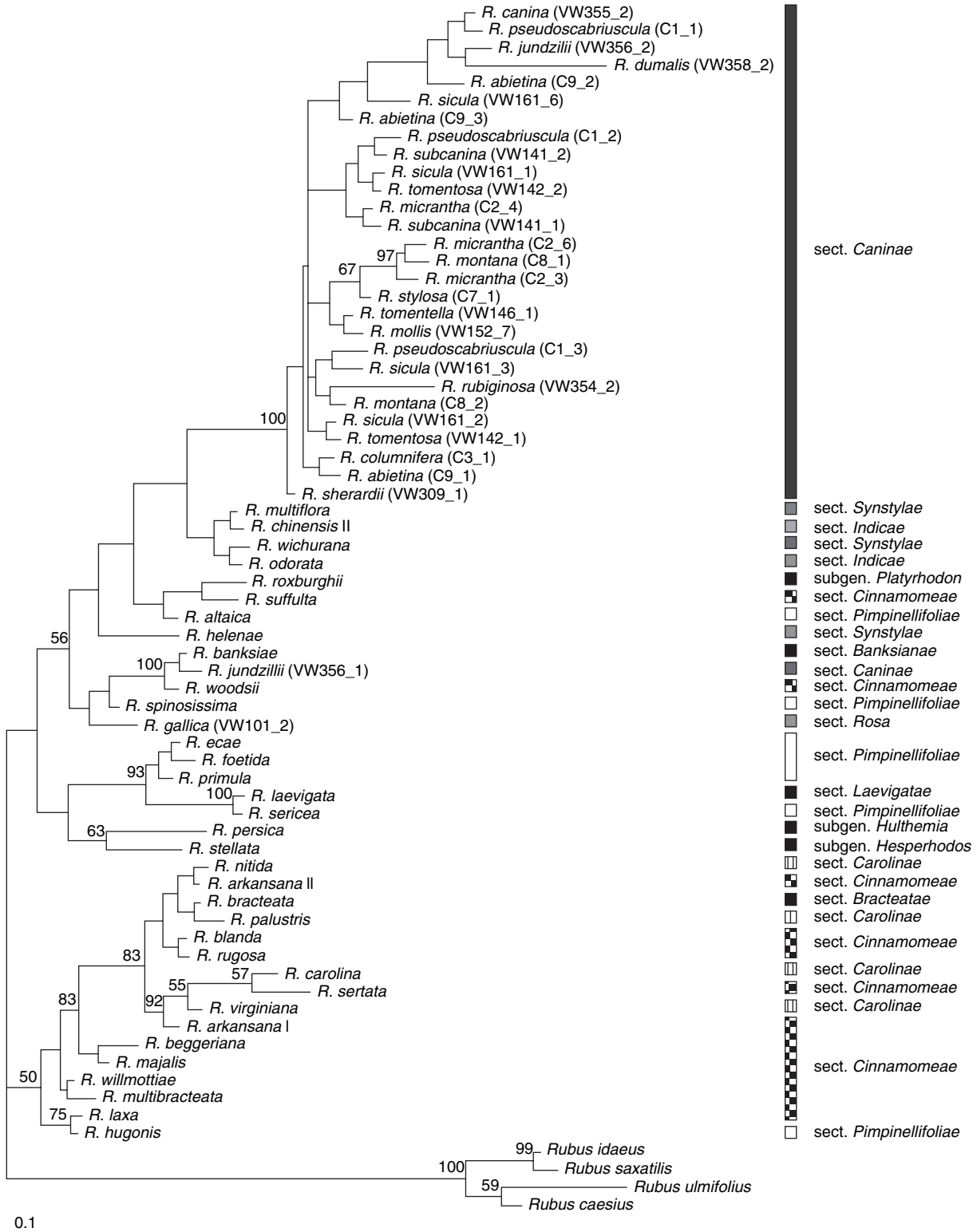


Figure 1. Bayesian inference of phylogenetic relationships of representatives of the genus *Rosa*: Monte Carlo Markov chain analysis based on nrITS-1 sequence data (using the general time reversible model of DNA substitution with gamma distributed substitution rates, 2 000 000 generations). The 50%-majority rule consensus tree was computed from 19 001 trees that were sampled after the process had reached stationarity. The topology was rooted with *Rubus idaeus*, *R. saxatilis*, *R. ulmifolius* and *R. caesius*. Numbers on branches are estimates for a posteriori probabilities.

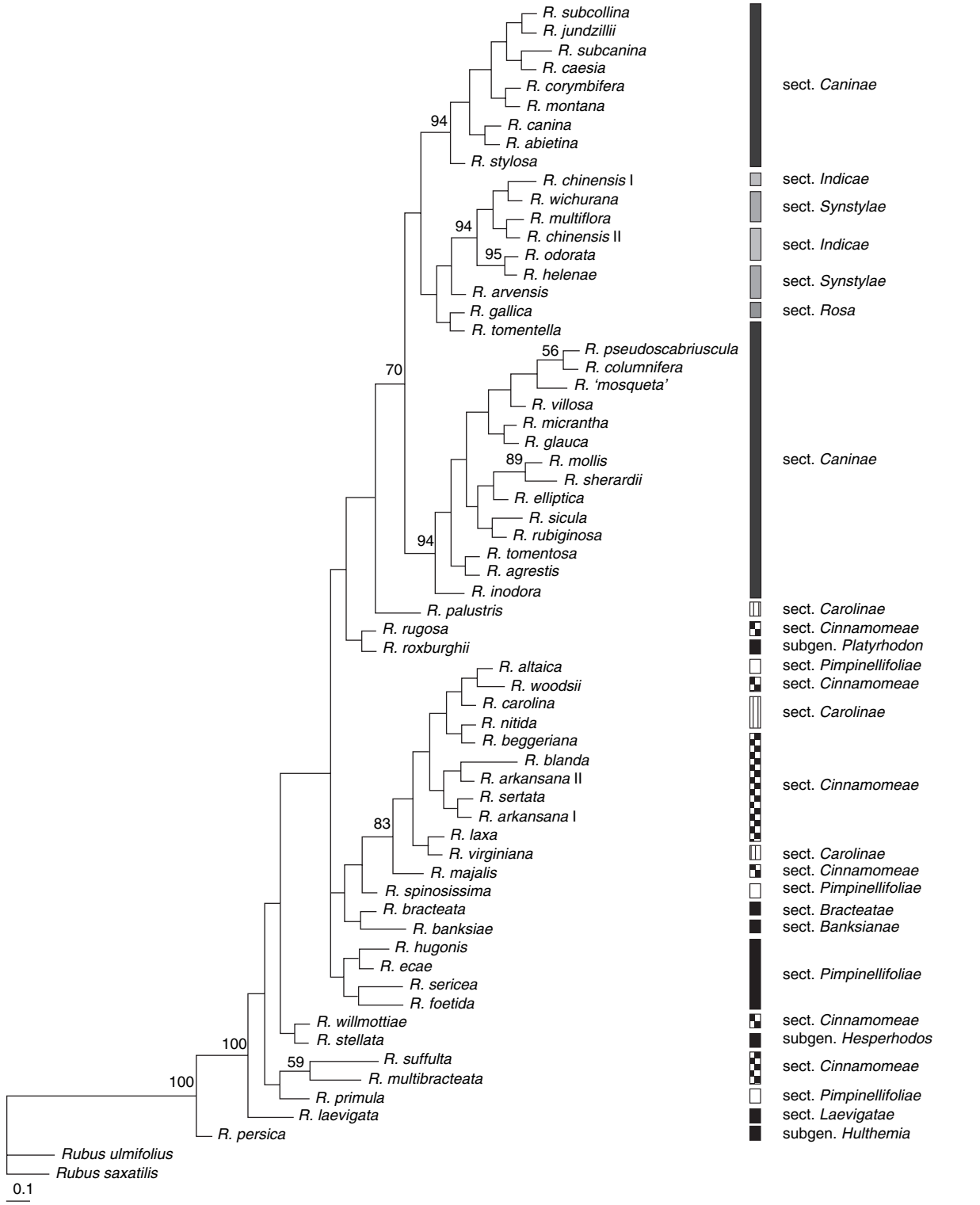


Figure 2. Bayesian inference of phylogenetic relationships of representatives of the genus *Rosa*: Monte Carlo Markov chain analysis based on sequence data of the 5′-region of the cpDNA marker 'atpB-rbcL IGS' (using the general time reversible model of DNA substitution with gamma distributed substitution rates, 2 000 000 generations). The 50%-majority rule consensus tree was computed from 19 001 trees that were sampled after the process had reached stationarity. The topology was rooted with *Rubus saxatilis* and *R. ulmifolius*. Numbers on branches are estimates for a posteriori probabilities.

(e.g. by Boulenger or Hurst, see Bean, 1980: 121) is not justifiable. The morphological examinations by Lewis (1965) indicated that *Hesperhodos* is the only group with finely reticulate pollen surface, whereas the pollen sculpturing of all other species of *Rosa* is striate. Parmentier (1897: 110) analysed the pericycle of *R. minutifolia* Engelmann. He found shorter and oval cells differing from those in all other members of *Rosa* where the pericycle consists of elongate and fusiform cells. Ma *et al*. (1997) detected significantly fewer metacentric chromosomes in *R. minutifolia* than in the other sections. Taken together the morphological differences elucidated by Parmentier (1897) and Lewis (1965) and the genetic separation detected in this study, *Hesperhodos* is best treated at sectional level and not at subgeneric rank.

Subgenus *Platyrhodon* (Hurst) Rehder, 1940

The third subgenus with prickly, chestnut-like hips with basal insertion of seeds is the monotypic subgenus *Platyrhodon* (*R. roxburghii* Tratt., 1823) but differs in a number of autapomorphic character states, which do not allow a satisfying placement based on morphology. Zielinski (1985) interprets the restricted distribution, the non-juicyness of the fruit and the disc structure as the most primitive characters in the whole genus. The number of leaflets per leaf is high (> 7–15) and it is the only species in the genus with peeling bark. Subulate auricles at the tip of the adnate stipules is a further character state which discriminates *Platyrhodon* from *Hesperhodos*. The molecular data are ambiguous. NrITS indicates a close relationship to *R. gallica*, which is unsupported by morphology. CpDNA places the species next to *R. rugosa* from the *Cinnamomeae*, again not supported by morphology, but supporting the view held by Ma, Crane & Byrne (1996, 1997) based on karyotypic relationships, Lewis & Basye (1961) based on cross compatibility and Kim (1994) from isoenzyme analysis (the latter two references are cited in Ma *et al*., 1997). The phylogenetic relationships of *R. roxburghii* remain uncertain. Hip morphology indicates the affinity to *Hesperhodos* and *Hulthemia*, although the basal insertion of the seeds is not as flat as in the other subgenera, but on a placenta-like structure, already mentioned by Crépin (1891). The functional most prominent character of the peeling bark, not known in any other species of the genus, has not been discussed in the literature. By cpRFLP, Takeuchi *et al*. (2000) proposed a separate placement of *Platyrhodon* in *Rosa*. Furthermore, crossability of *R. roxburghii* is difficult, again pointing towards the isolated position of *R. roxburghii* in the genus. Naturally, only *R.* × *micrugosa* originated by hybridization between *R. rugosa* × *R. roxburghii*, but pollen-, seed-parent direction is unknown. Wulff (1954) and Bean (1980) report rare cases from the ornamental breeding in which *R. roxburghii* served as pollen donor. Schum, Hofmann & Felten (2002) established somatic hybrids with *R. roxburghii*. From the overall view of the data, *Platyrhodon* seems to be a morphologically isolated member of the subgenus *Rosa*, thus not deserving subgeneric rank, but should presumably be treated in a monotypic sectional status within subgenus *Rosa*. The data available at present contradict the view of Zielinski (1985) that *R. roxburghii* is the most basal, ancient rose species.

Subgenus *Rosa*

Section *Pimpinellifoliae* (DC.) Ser. 1825

Based on morphology, *Pimpinellifoliae* seems to be a rather loosely-defined group by their mostly single flowers without bracts, a high number of small, round leaflets per leaf, and intensive coloured, often black, hips (although *R. gymnocarpa* Nutt. from *Cinnamomeae* also has black hips). Currently the group of *Pimpinellifoliae* is still widely accepted in practice and literature. Mikanagi *et al*. (1995) recognized the occurrence of unique kaempferol and quercetin 4′-glucosides in *Pimpinellifoliae*. However, recently more data have emerged, which raise doubts about the monophyletic status of the section *Pimpinellifoliae* (Matsumoto *et al*., 2000, 2001). *R. sericea* is morphologically distinct by flowers with mainly four petals and wedge-shaped prickles and extremely high numbers of leaflets (–17), but also has individuals with five petals. Its position is uncertain since both markers, cp- and nrDNA, place *R. sericea* in different positions. Whereas ITS combines it with *R. laevigata* (sect. *Laevigatae*) in a sister group relationship to members of the yellow-flowering Lutea-group of *Pimpinellifoliae*, cpDNA indicates a position of *R. sericea* within these Lutea-species. The Lutea group itself with *R. ecae*, *foetida*, *hugonis*, *primula* is clearly paraphyletic, but relationships are not resolved, although we can reject the view of Rowley (1961), that the bright yellow Austrian briar, *Rosa foetida*, is the nearest ally of *R. spinosissima* as was also shown by the extensive morphological study on *Pimpinellifoliae* by Roberts (1977). It is noteworthy that the proposal of Roberts (1977), based on morphology to transfer *R. farreri* and *R. forrestiana* from *Pimpinellifoliae* into *Cinnamomeae*, is supported by *mat*K-analysis (Matsumoto *et al*., 2001). The most divergent group within the *Pimpinellifoliae* are the Scots roses themselves. *R. spinosissima* L. and its morphological twin *R. altaica* Willd., which can currently be separated morphologically only by size, are genetically completely distinct (both species are tetraploid, at least *R. spinosissima* seems to be allotetraploid: V. Wissemann, isozyme-analysis, unpubl. data). The unresolved position of *R. altaica* in the nrITS tree next to

R. suffulta as well as the placement of *R. altaica* in the *atp*B-*rbc*L IGS tree within the *Carolinae–Cinnamomeae* clade might point to a cryptic hybridization event between a *R. spinosissima*-derivate and a member of *Cinnamomeae*. On this assumption the occurrence of black hips on some morphotypes of *R. altaica* completely resembling the receptacles from *R. rugosa* Thunb. (*Cinnamomeae*) can be explained, as well as the biochemical relationships detected by Grossi *et al*. (1998). Interestingly, RFLP studies by Matsumoto *et al*. (1997) also combined *R. rugosa* (*Cinnamomeae*) with *R. spinosissima* (*Pimpinellifoliae*). De la Roche (1978) mentioned that all natural hybrids known so far from *Pimpinellifoliae* are by *R. spinosissima*, and always with *R. spinosissima* as the pollen parent. However, molecular evidence for this assumption is currently lacking.

Section *Caninae* (DC.) Ser. 1825

In Europe, after the retreat of the last glaciation, dog roses (sect. *Caninae*) spread over the landscape. Because of their vigorous allopolyploid constitution (Wissemann, 2002) they were able to take the area by force and started to establish ecological types in different niches. This ecological differentiation within *Caninae* can be seen for example in the differentiation of the ecological 'L-' and 'D-type' roses (Christ, 1873, 1884; Reichert, 1998; Wissemann, 2000). Dog roses have been identified as allopolyploids (Wissemann, 2000, 2002) but are characterized as a natural evolutionary unit by the autapomorphic characters of a specific nrITS-type and the heterogamous mode of reproduction via Canina-meiosis (Täckholm, 1920, 1922; Blackburn & Harrison, 1921; Lim *et al*., 2000). Given the specific nrITS-type, this type is distinct, but closely related to sequences from members of the *Synstylae* and *Indicae*. Currently we cannot draw the conclusion that this is a hint for the geographical or seed paternal origin of the *Caninae*, since characters of these two sections, e.g. agglutinated styles and entire sepals, are not represented in the dog roses. Further insight from biochemical and molecular data is needed here. However, Zielinski (1985) claimed that members of *Indicae* and *Synstylae* are the closest relatives to *R. canina* from sect. *Caninae* based on morphology. From the cpDNA data, *Caninae* is split into two major clades, one with eglandular or with non-odorant glands and one with odorant (wine and terpentine-scented) glands. Interestingly, these clades are split by a clade including *R. gallica* from sect. *Rosa* and members of the *Synstylae-Indicae*-group, which again supports a close relationship of *Caninae* with *Synstylae*. The unique heterogamous meiosis has led to numerous opinions about the mode of reproduction in this section including apomixis. However, Wissemann & Hellwig (1997) were able to show, that sexual reproduction via heterogamy is the predominant way of reproduction in this section, although apogamy cannot be excluded in certain cases (e.g. Fagerlind, 1940; Flory, 1950; Wissemann & Hellwig, 1997; Werlemark *et al*., 2000).

Section *Rosa* (= sect. *Gallicanae* (DC.)) Ser. 1825

Section *Rosa* is a monotypic section with the European and west Asian species *R. gallica* L., 1759 (Wissemann, 2003a). All other OTUs given species rank from this section are long cultivated hybridogenic, synanthropic species of which natural populations are not known (de la Roche, 1978). From molecular data the position of *R. gallica* is uncertain. The close relationship of *R. gallica* to the upper *Caninae*-clade in the cpDNA-dataset is morphologically supported by lobed or pinnate sepals and the occurrence of non-odorant glands. However, *R. gallica* is a homogamous species with regular meiosis and does not harbour the specific *Caninae*-nrITS (Wissemann, 1999). We still believe this species, or an unknown and extinct close relative, to be one partner during the process of allopolyploidization of the *Caninae*, which has introduced the morphological character of pinnate sepals. The possibility of this has been shown for the origin of *R. jundzillii* (Wissemann, 1999).

Section *Carolinae* Crép. 1891

Section *Carolinae* is completely dispersed within the clade of roses from sect. *Cinnamomeae*, supporting the view of Wylie (1954) who treated both groups as consectional. Morphologically only the non-persistence of sepals separates *Carolinae* from the *Cinnamomeae*, a character used in the *Caninae* to separate closely related species and subject to dominant inheritance (Ritz & Wissemann, 2003b). Based on anatomical data, Parmentier (1897) had already claimed consectional status for *Carolinae* and *Cinnamomeae*. Grossi *et al.* (1998) analysed flavonoid and enzyme polymorphisms of *Carolinae* and *Cinnamomeae* and were able to show that again *Carolinae* grouped with the *Cinnamomeae*. However, Grossi *et al*. (1999) detected a specific anthocyanin (pelargonidin-substituted) present in *Carolinae* but not in *Cinnamomeae*. *Mat*K-analysis by Matsumoto *et al*. (1998) also combined the two sections. From the knowledge of character inheritance in *Caninae* (Wissemann, 2000; Ritz & Wissemann, 2003b), we do not expect that the species in *Carolinae,* if included into the *Cinnamomeae*, represent one clade of closely related species based on presence of deciduous sepals. Species with deciduous sepals in the *Caninae* are completely mixed in the section. Our analysis of the cpDNA (as well as nrITS sequences) support this view; species with deciduous sepals do not form a monophyletic group in the trees (Figs 1, 2). Section *Carolinae* is here included in section *Cinnamomeae*.

Section *Cinnamomeae* (DC.) Ser. 1825 (incl. section *Carolinae* Crép., 1891)

Section *Cinnamomeae* is by far the largest section within the genus with *c*. 80 species. After inclusion of the *Carolinae* it harbours about 50% of all species in the genus. Differentiation within this section is high and there is much variability between the described species. Ecological and subsequent genetic differentiation occurred within *R. palustris* Marsh., 1785, that is clearly separated by the cp-sequence but nested within *Cinnamomeae* by nrITS sequences. Our data suggest from the nrITS sequence a closer relationship of *Cinnamomeae-Carolinae* to the subgenera *Hulthemia*, *Platyrhodon* and *Hesperhodos*, which Parmentier (1897) already had assumed by the 'basi-parietal insertion of seeds'. However, the interpretation of Parmentier (1897), that these three subgenera have basiparietal insertion of seeds is wrong, as already pointed out by Crépin (1898). *Hulthemia*, *Platyrhodon* and *Hesperhodos* have a pure basal insertion of the seeds at the bottom of the hip, not on the walls (Herring, 1925). Affinity of parts of *Pimpinellifoliae* to the *Cinnamomeae* was shown by Grossi *et al*. (1998) from the chemical and biochemical pattern that can be observed in the nrITS analysis and especially the cpDNA analysis. It is noteworthy that Grossi *et al*. (1998) found a close relationship between the *Pimpinellifoliae*-species, *R. altaica* Willd., and the *Cinnamomeae-Carolinae*-clade. We found the same connection in the *atp*B-*rbc*L IGS-tree, which indicates that conspecificity of *R. spinosissima* L. and *R. altaica* is doubtful (see further remarks under sect. *Pimpinellifoliae*).

Section *Synstylae* DC., 1813

Grossi *et al*. (1998) found the *Synstylae* to be one of the best circumscribed groups with respect to biochemical data. Unfortunately, they did not integrate members of the *Indicae* into their study. Our data, both cpDNA and nuclear DNA, show consectionality of *Synstylae* and *Indicae*. In the analysis of Japanese wild roses by Wu *et al*. (2000) *mat*K-DNA again merged both sections together. Mikanagi *et al*. (1995) showed similar flower flavonoid composition for *Synstylae* and *Indicae*, but Cao, He & Li (1996) pointed to the extreme differences in carotene content between the two sections (*Synstylae* on average > 6 mg/100 g; *Indicae* on average < 0.4 mg/100 g). Based on morphology the only taxonomically useful difference is the agglutinated style of the *Synstylae* but with respect to all other characters, the morphological character of columnated styles becomes doubtful as an autapomorphic character state. From the point of history of science it is noteworthy, that this character was the first and oldest morphological character proposed in the classification of the whole genus (Seringe, 1818). The only European species of *Synstylae*, *R. arvensis* Huds. appears to be sister to the *Synstylae-Indicae*-clade in the cp-tree.

Section *Indicae* Thory, 1820

The Chinese section *Indicae*, with only three species (*R. odorata* (Andrews) Sweet, 1818, *R. gigantea* Collet ex Crép. 1888 and *R. chinensis* Jacq. 1768), is clustered with *Synstylae* roses in both data sets. Shishkin & Yuzepchuk (1971: 331) already pointed to the close relationship of *Indicae* to *Synstylae*, which both have exserted styles, the first group only lacking the connection of the styles. For further remarks, see above (*Synstylae*).

Section *Banksianae* Lindl. 1820

This section harbours two species (*R. banksiae* Ait., 1811, *R. cymosa* Tratt., 1823), but the taxonomic status of the latter is disputed. By RAPD-analysis Millan *et al*. (1996) assigned *R. banksiae* as a member of subgenus *Rosa*. Morphologically the section is characterized by free and deciduous stipules, nonpubescent receptacles and branchlets (difference to sect. *Bracteatae*) and reflexed and deciduous sepals (difference to sect. *Laevigatae*). The receptacle is smooth and not bristly as in sect. *Laevigatae*. The taxonomic position is completely unresolved. In all phylogenetic trees, *R. banksiae* is placed within or next to the *Cinnamomeae-Carolinae*-clade, in the *atp*B-*rbc*L Bayesian tree next to *Bracteatae* (also by Wu *et al*., 2000, 2001 using *mat*K sequences and nrITS, respectively), but not with *Laevigatae*. Thus the morphological characterization by deciduous stipules indicates not synapomorphy but convergence or plesiomorphy. As in subgenus *Hesperhodos*, Ma *et al*. (1997) found fewer metacentric chromosomes than in other sections.

Section *Laevigatae* Thory, 1820

There is only one species in this monotypic Chinese section, *R. laevigata* Michx., 1803. The bristly hip discriminates the species from sect. *Banksianae*, the difference from *Bracteatae* is by non-pubescent branchlets. Morphologically this section is united in a larger group with *Banksianae* (e.g. already included into this section by Déséglise, 1877: 65 '*R. sinica* Murray') and *Bracteatae* by the free and deciduous stipules. However, as in *Banksianae*, molecular classification does not support a coherence based on this morphological character. In the nrITS tree, *R. laevigata* is nested within members of section *Pimpinellifoliae*, contradicting the view of de la Roche (1978) of *Laevigatae* being the closest relative to *Banksianae*.

Section *Bracteatae* Thory, 1820

Again this presumable monotypic south-east Asian section (*R. bracteata* Wendl., 1798, uncertain taxonomic status of *R. clinophylla* Thory) is morphologi-

cally characterized by free and deciduous stipules (as *Laevigatae* and *Banksianae*), but differs in pubescent or tomentose young branchlets and receptacles from these two sections. The phylogenetic position is completely uncertain based on cpDNA and nrDNA data. Whereas the ITS data indicate a position within the *Cinnamomeae-Carolinae* clade, cpDNA places it unsupported as sister to *R. banksiae* (also by Wu *et al*., 2000), nested within the *Pimpinellifoliae* clade.

PERSPECTIVES

As presented above, our understanding of evolution and phylogenetic relationships within the genus *Rosa* is on the one hand contradictory, and on the other in its infancy. The enormous phenotypic, genotypic and ecological variability and plasticity, influenced by evolutionary processes such as hybridization, currently restrict a taxonomic revision of the genus. From the classical taxonomic view, knowledge of the genus *Rosa* suffers from two problems. First, the European section *Caninae* is such a problematic taxonomic and evolutionary group, that rhodology is a eurocentric field of science. The intensive work on dogrose species since Linnaean times made *Rosa* into a genus completely 'oversystematized' for European species, but neglecting the bewildering diversity outside Europe. Second, we lack extensive knowledge of rose taxa from the centres of diversity in central Asia, necessary to understand the intrageneric relationships. Additionally, we do not only need more data, but a deeper understanding of the processes underlying the evolutionary history of the markers used for classification. This must include more detailed studies on the specific marker systems (e.g. Álvarez & Wendel, 2003; Wissemann, 2003b) and their performance under selective forces, as well as breeding experiments (e.g. Ritz & Wissemann, 2003b) to understand character inheritance and impact of ecological factors on character expression. For the reconstruction of phylogenetic relationships at species level we need a better resolving molecular marker. Nr-ITS as well as the cp-DNA currently used in *Rosa*-studies give insight into questions of consectionality of sections, but do not resolve deep species relationships.

ACKNOWLEDGEMENTS

The work was funded by a grant from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) to V.W. (Wi 2028-1). We thank the Europarosarium Sangerhausen and the Rosensammlung Kassel-Wilhelmshöhe for providing plant material. Support by the VDR Stiftung Europa Rosarium Sangerhausen is gratefully acknowledged. We thank F. H. Hellwig (Jena) for allowing work in a molecular laboratory. We like to thank the two anonymous referees which helped to improve significantly the quality of the paper by raising questions which are lost if one is too much in the subject.

REFERENCES

Álvarez I, Wendel JF. 2003. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **29:** 730–743.

Bean WJ. 1980. *Trees and shrubs hardy in the British Isles.* London: Murray, Vol. 4, 1–73.

Blackburn KB, Harrison JWH. 1921. The status of the British rose forms as determined by their cytological behaviour. *Annals of Botany* **35:** 159–188.

Boissier E. 1872. *Rosa*. In: *Flora Orientalis Sive Enumeratio Plantarum in Oriente a Graecia et Aegypto ad Indiae Finis Hucusque Observatarum*, Vol. 2: *Calyciflorae, Polypetalae.* Genf, Basel: H. Georg, 669–689.

Britton NL, Brown A. 1913. *An illustrated flora of the northern United States* 2nd edn. New York: Scribner, 1–3.

Cao YL, He YH, Li CL. 1996. Vitamin contents in the hips of 38 species of *Rosa* and their relation to division of sections. *Acta Botanica Sinica* **38:** 822–827.

Christ H. 1873. *Die Rosen der Schweiz mit Berücksichtigung der unliegenden Gebiete Mittel- und Südeuropas*. Basel, Genf, Lyon: H. Georg.

Christ H. 1884. Allgemeine Ergebnisse aus der systematischen Arbeit am Genus *Rosa*. V. Locale Scheidung der Formen. *Botanisches Centralblatt* **18.11:** 343–350.

Crépin F. 1891. Nouvelle classification des roses. Extrait du. *Journal des Roses* 3–5. Drosne: Melun, E., 3–30.

Crépin F. 1898. Les idées d'un anatomiste sur les espèces du genre *Rosa* et sur leur classification. *Bulletin Société Royal Botanique de Belgique* **37:** 151–201.

Debener Th, Bartels Ch, Mattiesch L. 1996. RAPD analysis of genetic variation between a group of rose cultivars and selected wild rose species. *Molecular Breeding* **2:** 321–327.

Déséglise A. 1877. *Catalogue raisonné ou énumeration méthodique des espèces du genre rosier pour l'Europe, l'Asie et l'Afrique spécialement les rosiers de la France et de l'Angleterre*. Genéve: Mentz, 1–348.

Dumortier BC. 1824. *Notice sur un nouveau genre de plantes: Hulthemia; précédée d'un aperçu sur la classification des roses.* Ainé: Tournay: Impr. de J. Casterman, 13–14.

Eriksson T, Donoghue MJ, Hibbs MS. 1998. Phylogenetic analysis of *Potentilla* using DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacers (IST), and implications for the classification of *Rosoideae* (Rosaceae). *Plant Systematics and Evolution* **211:** 155–179.

Eriksson T, Hibbs MS, Yoder AD, Delwiche CF, Donoghue MJ. 2003. The phylogeny of Rosoideae (Rosaceae) based on sequences of the internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA and the TRNL/F region of chloroplast DNA. *International Journal of Plant Science* **164:** 197–211.

Fagerlind F. 1940. Sind die Canina-Rosen agamospermische Bastarde? *Svensk Botanisk Tidskrift* **34:** 334–354.

Flory WS. 1950. Pollen condition in some species and hybrids of Rosa with a consideration of assosiated phylogenetic factors. *The Virginia Journal of Science New Series* **1:** 11–59.

Gandoger M. 1892. *Monographia Rosarum Europae et Orientis terrarumque adjacentium.* Tom. 2, Paris: Baillière et fil. Bibliopolae.

Grossi C, Raymond O, Jay M. 1998. Flavonoid and enzyme polymorphisms and taxonomic organisation of *Rosa* sections: Carolinae, Cinnamomeae, Pimpinellifoliae and Synstylae. *Biochemical Systematics and Ecology* **26:** 857–871.

Grossi C, Raymond O, Sanlaville-Boisson C, Jay M. 1999. *Rosa* taxonomy and hierarchy of markers defined by ACT STATIS. *Zeitschrift Fuer Naturforschung* **54c:** 25–34.

Harkness P. 2003. 16. Kasseler Rundgespräch in Sangerhausen: Unsere besten Rosen des 20. Jahrhunderts. *VDR Rosenjahrbuch*. Verein Deutscher Rosenfreunde Baden-Baden, 60–70.

Herring P. 1925. Classifications of *Rosa*. *Dansk Botanisk Arkiv* **4:** 1–24.

Herrmann J. 1762. *Dissertatio Inauguralis Botanico-Medica de Rosa*. Straßburg: Officina J.H. Heitz.

Huelsenbeck JP, Ronquist F. 2001. MrBayes – Bayesian inference of phylogeny, Version 3.0b4. *Bioinformatics* **17:** 754–755.

Kim Y-J. 1994. A study of selected species of *Rosa* using isozyme polymorphisms. MSc Thesis, College Station, Texas A & M University.

Lewis WH. 1965. Monograph of *Rosa*. North America. V. Subgenus *Hesperhodos*. *Annals of Missouri Botanical Garden* **52. 2:** 99–113.

Lewis WH, Basye RE. 1961. Analysis of nine crosses between diploid *Rosa* species. *Proceedings of the American Society of Horticultural Sciences* **78:** 572–579.

Lim KY, Bringloe JB, Werlemark G, Meynet J, Roberts AV, Leitch AR. 2000. Molecular cytogenetic investigation in *Rosa* section *Caninae*. In: Werlemark G, ed. Genetic variability and reproductive strategies in Nordic dogroses, *Rosa* section *Caninae*. *Acta Universitatis Agriculturae Sueciae, Agraria 257. Paper* **VIII:** 1–15.

Linnaeus C. 1753. *Species plantarum.* Holmiae, Tomus **1:** 491–492.

Linnaeus C. 1772. *Systema naturae ex editione duodecima in epitomen redactum et praelectionibus academicis accomodatum at Iohanne Beckmanno.* Tom 2: Regnum Vegetabile. Göttingen: Vandenhoeck.

Ma Y, Crane CF, Byrne DH. 1996. Meiotic behavior of hybrids involving *Rosa laevigata*. *Cytologia* **61:** 457–463.

Ma Y, Crane CF, Byrne DH. 1997. Karyotypic relationships among some *Rosa* species. *Caryologia* **50. 3–4:** 317–326.

Mai DH, Walther H. 1978. Die Floren der Haselbacher Serie im Weisselster-Becken. *Abhandlungen des Staatlichen Museums für Mineralogie und Geologie* **28:** 101–102.

Mai DH, Walther H. 1988. Die pliozänen Floren von Thüringen, Deutsche Demokratische Republik. *Quatärpaläontologie* **7:** 5–297.

Matsumoto S, Fukui H. 1996. Identification of rose cultivars and clonal plants by random amplified polymorphic DNA. *Scientia Horticulturae* **67:** 49–54.

Matsumoto S, Kouchi M, Fukui H, Ueda Y. 2000. Phylogenetic analyses of the subgenus *Eurosa* using the ITS nrDNA sequence. *Acta Horticulturae (ISHS)* **521:** 193–202.

Matsumoto S, Kouchi M, Yabuki J, Kusunoki M, Ueda Y, Fukui H. 1998. Phylogenetic analyses of the genus *Rosa* using the *mat*K sequence: molecular evidence for the narrow genetic background of modern roses. *Scientia Horticulturae* **77:** 73–82.

Matsumoto S, Nishio H, Ueda Y, Fukui H. 2001. Phylogenetic analyses of genus *Rosa*: polyphyly of section *Pimpinellifoliae* and origin of *Rosa* × *fortuniana* Lindl. *Acta Horticulturae (ISHS)* **547:** 357–363.

Matsumoto S, Wakita H, Fukui H. 1997. Molecular classification of wild roses using organelle DNA probes. *Scientia Horticulturae* **68:** 191–196.

Meikle RD. 1966. *Rosa*. In: Townsend CC, Guest E, Al-Rawi A, eds. *Flora of Iraq*. Glasgow: University Press, 141–151.

Mikanagi Y, Yokoi M, Ueda Y, Saito N. 1995. Flower flavonol and anthocyanin distribution in subgenus *Rosa*. *Biochemical Systematics and Ecology* **23:** 183–200.

Millan T, Osuna F, Cobos S, Torres AM, Cubero JI. 1996. Using RAPDs to study phylogenetic relationships in *Rosa*. *Theoretical and Applied Genetics* **92:** 273–277.

Ochsmann J. 2000. Morphologische und molekularsystematische Untersuchungen an der *Centaurea stoebe* L.-Gruppe (Asteraceae-*Cardueae*) in Europa. *Dissertationes Botanicae* 324. Berlin, Stuttgart: J. Cramer.

Parmentier P. 1897. Recherches anatomiques et taxinomiques sur les rosiers. *Annales de Sciences Naturelles, Series VIII (Botanique)*, **6.1–3:** 1–175 + 8 pl. (published 1898).

Regel E. 1877. *Tentamen Rosarum Monographiae.* St. Petersburg, 1–114.

Rehder A. 1949. *Bibliography of cultivated trees and shrubs hardy in the cooler temperate regions of the northern hemisphere*. Jamaica Plain Massachusetts: Arnold Arboretum. Reprint 1978 by O. Koeltz Koenigstein. *Collectanea Bibliographica*. Koeltz S, ed. Vol. 10, 296–317.

Reichert H. 1998. Die zwei Wuchstypen bei Rosen der Sektion *Caninae* und ein Vorschlag für eine Kurzbezeichnung derselben. *Acta Rhodologica* **1:** 29–35.

Rieseberg LH, Raymond O, Rosenthal DM, Lai Z, Livingstone K, Nakazato T, Durphy JL, Schwarzbach AE, Donovan LA, Lexer C. 2003. Major ecological transitions in wild sunflowers facilitated by hybridization. *Science* **301:** 1211–1216.

Ritz CM, Wissemann V. 2003a. The evolution of diversity in *Rosa* L., section *Caninae* (DC) Ser., Rosaceae. *16th Symposium Biodiversität und Evolutionsbiologie, 17th Senckenbergkolloquium, Staadt Frankfurt/Main*, 89.

Ritz CM, Wissemann V. 2003b. Male correlated non-matroclinal character inheritance in reciprocal hybrids of *Rosa*, section *Caninae* (DC) Ser., Rosaceae. *Plant Systematics and Evolution* **241:** 213–221.

Roberts AV. 1977. Relationship between species in the genus *Rosa*, section *Pimpinellifoliae*. *Botanical Journal of the Linnean Society* **74:** 309–328.

de la Roche G. 1978. Commentary on 'Les Roses'. In: Roche G De la, Rowley GD, Lawalrée A, Stearn WT, eds. *Commentar-*

ies to Les Roses by P.J. Redouté. A contribution to the history of the genus Rosa. Antwerpen: De Schutter, 148–341.

Rowley G. 1961. The scotch rose and its garden descendants. *Journal of the Royal Horticultural Society of London* **86:** 433–437 + 5 plates.

Rowley GD. 1992. Typ. Cons. Prop: *R. cinnamomeae* L. *Taxon* **41:** 568–569.

Savolainen V, Manen JF, Douzery E, Spichiger R. 1994. Molecular phylogeny of families related to Celastrales based on rbcL 5′-flanking sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **3:** 27–37.

Schum A, Hofmann K, Felten R. 2002. Fundamentals for integration of somatic hybridization in rose breeding. *Acta Horticulturae (ISHS)* **572:** 29–36.

Seringe NC. 1818. Allgemeine Betrachtungen über die Rosen. *Museum der Naturgeschichte Helvetiens, Botanische Abtheilung* **I:** 1–8.

Shishkin BK, Yuzepchuk SV. 1971. *Flora of the USSR: Rosaceae-Rosoideae, Prunoideae*. Reprint: Koenigstein: Koeltz Scientific Books, Vol. 10, 322–377.

Starr J, Bruneau A. 2002. Phylogeny of *Rosa* L. (Rosaceae) based on *trn*L-F intron and spacer sequences. Abstract Botany 2002, 1.ASPT Colloquium: *Rosaceae phylogeny: current knowledge, problems, and prospects*. [http://www.2002.botanyconference.org/cgi–bin/new–view02.pl].

Täckholm G. 1920. On the cytology of the genus *Rosa*. A preliminary note. *Svensk Botanisk Tidskrift 14* **2–3:** 300–311.

Täckholm G. 1922. Zytologische Studien über die Gattung *Rosa*. *Acta Horti Bergiani* **7:** 97–381.

Takeuchi S, Nomura K, Uchiyama H, Yoneda K. 2000. Phylogenetic relationship in the genus *Rosa* based on the restriction enzyme analysis of the chloroplast DNA. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* **69:** 598–604.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* **25:** 4876–4882.

Ueda Y, Tomita H. 1989. Morphometric analysis of pollen exine patterns in roses. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* **58:** 211–220.

Werlemark G, Nybom H, Olsson A, Uggla M. 2000. Variation and inheritance in hemisexual dogroses, *Rosa* section *Caninae*. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* Spec. issue **14:** 28–31.

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White JW, eds. *PCR protocols. A guide to methods and applications*. New York: Academic Press, 315–322.

Willdenow CL. 1811. *Berlinische Baumzucht, oder Beschreibung der im Königlichen Botanischen Garten bei Berlin im Freien Ausdauernden Bäume und Sträucher, für Gartenliebhaber, Forstmänner und Freunde der Botanik* 2nd edn. Berlin, Nauck.

Wissemann V. 1999. Genetic constitution of *Rosa* sect. *Caninae* (*R. canina, R. jundzillii*) and sect. Gallicanae (*R. gallica*). *Journal of Applied Botany / Angewandte Botanik* **73:** 191–196.

Wissemann V. 2000. Molekulargenetische und morphologisch-anatomische Untersuchungen zur Evolution und Genomzusammensetzung von Wildrosen der Sektion *Caninae* (DC.) Series *Botanische Jahrbücher für Systematik, Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie* **122:** 357–429.

Wissemann V. 2002. Molecular evidence for allopolyploid origin of the *Rosa canina*–complex (Rosaceae, Rosoideae). *Journal of Applied Botany/Angewandte Botanik* **76:** 176–178.

Wissemann V. 2003a. Conventional taxonomy of wild roses. In: Roberts A, Debener T, Gudin S, eds. *Encyclopedia of rose science*. London: Elsevier, 111–117.

Wissemann V. 2003b. Hybridization and the evolution of the nrITS spacer region. In: Sharma AK, Sharma A, eds. *Plant genome, biodiversity and evolution*, Vol. 1 Part A. Enfield, New Hampshire: Science Publishers, Inc. 57–71.

Wissemann V. 2003c. Wildrosen I: Einleitung und Untergattung *Hulthemia*. *VDR Rosenjahrbuch* 142–145.

Wissemann V, Hellwig FH. 1997. Reproduction and hybridisation in the genus *Rosa*, section *Caninae* (Ser.) Rehd. *Botanica Acta* **110:** 251–256.

Wu S, Ueda Y, He HY, Nishihara S, Matsumoto S. 2000. Phylogenetic analysis of Japanese *Rosa* species using matK sequences. *Breeding Science* **50. 4:** 275–281.

Wu S, Ueda Y, Nishihara S, Matsumoto S. 2001. Phylogenetic analysis of Japanese *Rosa* species using DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacers (ITS). *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* **76:** 127–132.

Wulff HD. 1954. Notes on the breeding behavior of *Rosa roxburghii* and *Rosa multibracteata*. *American Rose Annual* 73–77.

Wylie AP. 1954. The history of garden roses. Masters Memorial Lecture 1954. *Journal of the Royal Horticultural Society* London **79:** 555–571, **80** (1955)**:** 8–24, 77–87.

Zielinski J. 1982. Rosaceae II-*Rosa*. In: Rechinger KH, ed. *Flora Des Iranischen Hochlandes und der Umrahmenden Gebirge.* Graz, Austria: Akad. Druck- u.-Verlagsanstalt **152:** 1–32.

Zielinski J. 1985. Studia nad rodzajem *Rosa* L. Systematyska sekcji *Caninae* DC. em Christ. *Arboretum Kórnickie* **30:** 3–109.

5. Manuskript III:

Ritz, C. M. & Wissemann, V. (2003): Male correlated non-matroclinal character inheritance in reciprocal hybrids of *Rosa* section *Caninae* (DC) Ser. (Rosaceae). *Plant Systematics and Evolution*. 241 (3-4): 213-221.

Plant Syst. Evol. 241: 213–221 (2003)
DOI 10.1007/s00606-003-0058-2

Plant Systematics and Evolution
Printed in Austria

Male correlated non-matroclinal character inheritance in reciprocal hybrids of *Rosa* section *Caninae* (DC.) Ser. (Rosaceae)

C. M. Ritz and **V. Wissemann**

Friedrich-Schiller-Universität Jena, Institut für Spezielle Botanik, Jena, Germany

Received January 27, 2003; accepted July 2, 2003
Published online: November 4, 2003
© Springer-Verlag 2003

Abstract. Artificial F1 hybrids within dog-roses (*Rosa* section *Caninae* (DC.) Ser.) have been assessed for expression of morphological characters with regards to the actual taxonomy applied. In the mostly pentaploid members of the section the unique heterogamous Canina-meiosis leads to matroclinal inheritance of characters by transmitting 4/5 of the genetic information via seed donor whereas 1/5 is provided by the pollen donor. Evaluation of phenotypic variability revealed that the two taxonomically relevant characters "widening of the orifice" and "persistence of the sepals" are statistically significant controlled by the pollen donor. Reciprocal crossings confirmed the same pattern. One possible explanation is that this phenomenon might be subject to genomic imprinting mechanisms. The morphological analysis gives clear evidence that conventional taxonomical concept is artificial and does not reflect the evolutionary patterns among dog-roses.

Key words: *Rosa*, Rosaceae, dog-roses, hybridisation, heterogamy, imprinting, *Arabidopsis*, speciation.

Introduction

The enormous phenotypic plasticity of the genus *Rosa* L. has frightened numerous plant systematists (for an overview see Wissemann, in press). Especially within the section *Caninae* (DC.) Ser. taxonomy remains difficult for a number of biological reasons (Wissemann 2000a). The actual taxonomy of dog-roses (*Rosa* sect. *Caninae*) is based on a synthetic model (Wissemann 2000a) which allows the identification of species by a set of combined and correlated characters. Two morphologically well defined base types (L-Type and D-Type) are distinguished in this model (Christ 1873, Dingler 1907, Reichert 1998). *Rosa* species which belong to the L-type (laxus, loose) are characterised by a lax growth habit, deciduous sepals and a narrow orifice of the hips (diameter < 1 mm). Plants which are grouped within the D-type (densus, dense) show a compact growth habit, persistent sepals and a wide orifice. The system suffers from a very narrow and strict definition of the edge types by creating a rather broadly circumscribed complex of L/D- types, which contains numerous intermediate forms. As already outlined by Wissemann (2000a) this L/D model is a highly artificial system which serves as a system to classify morphospecies but does not necessarily reflect phylogenetic relationships and evolutionary history. Contrary to the elusive phenotypic plasticity, section *Caninae* is clearly defined by the unique

meiotic behaviour which is characteristic for all members of this section, the Canina-meiosis (Täckholm 1920, 1922). With a base number of $x = 7$ the pentaploid somatic cells contain 7 bivalents (14 chromosomes) and 21 univalents (21 chromosomes). After meiosis the fertile pollen grain harbours 7 chromosomes, whereas the egg cell contains 28 chromosomes. This bias leads to a pronounced matroclinal inheritance whereby 4/5 of the nuclear genome is provided by the seed parent and only 1/5 by the pollen parent.

The occurrence of interspecific hybridisation within section *Caninae* is widely known (Keller 1931, overview by Wissemann and Hellwig 1997). However, the identification of hybrid offspring is extremely complicated due to the lack of differential characters to discriminate the taxa. Despite the strong interest in hybridisation events within sect. *Canina*, experimental crossings are scarce (Dingler 1908, Hurst 1927, Gustafsson 1944, Feuerhahn and Spethmann 1995, Wissemann and Hellwig 1997, Werlemark et al. 1999). Evidence from artificial crossings with regard to the occurrence of differential characters between the well defined L- and D- type is only available from Gustafsson (1944) with respect to presence of hairs, odorant glands and sepal persistence. The reproductive fitness of hybrids is also controversially discussed. Keller (1931) described natural hybrids of dog-roses and assessed low to none reproductive success with regard to hip maturation and the number of grains per hip. Contrary, Eigner and Wissemann (1999) were able to demonstrate, that even an intersectional hybrid is able to produce numerous fertile seeds. Gustafsson (1944) observed differences with regards to fertility between reciprocal crossings. Wissemann and Hellwig (1997) compared reproductive success (number of grains per hip and seed viability) between the outcomes of apogamous, autogamous, geitonogamous and xenogamous crossings (F1). In the study presented here the reproductive success (number of grains per hip and seed viability) is compared between the bushes grown from the crossings of Wissemann and Hellwig (1997). Additionally, the interspecific crossings are investigated in detail with regard to the differential characters which distinguish the parents of the hybrids.

The following aims are addressed:

- Which morphological characters are shown by hybrids of artificial crossings between different dog-rose species with regards to the actual taxonomy?
- Does offspring of crossings between L- and D-types morphologically cluster between the two narrowly defined types and thus represent L/D-types?
- Is the strong matroclinal inheritance reflected in the distribution of morphological characters of the outcomes of crossings?
- Do hybrids differ significantly in reproductive success (number of grains per hip and viability of seeds) from their parents? Do they express heterosis or hybrid depression?
- Do F1-outcomes of autogamous, geitonogamous and xenogamous crossings show significant differences with regard to reproductive success (number of grains per hip and viability of seeds)?

Material and methods

Crossing experiments were carried out in 1996 (Wissemann and Hellwig 1997) for *R. canina* L., *R. corymbifera* Borkh., *R. rubiginosa* L., *R. elliptica* Tausch and *R. micrantha* Borr. ex Sm. The taxonomy followed Klášterský (1969) as well as Henker and Schulze (1993). 139 plants produced by apogamy, autogamy, geitonogamy, xenogamy and hybrids were equally treated and randomly planted in the Botanical Garden of the Georg-August-Universität Göttingen, Germany in 2002. Hip-bearing twigs of all investigated plants were gathered and the specimens were deposited in the herbarium Wissemann (wis). Differential characters such as presence of hairs at the lower leaf surface and the rachis, presence of glands on leaf surface and pedicel were examined in the herbarium specimens. If possible ten hips were harvested from every shrub. Diameter of the orifice and persistence of sepals were assessed directly in the field. Number

of grains per hip were counted and the fertility of seeds were tested using Fagerlind's test in relaxed water (Fagerlind 1940, 1944). This quick and easy test was shown to yield comparable results for large samples as e.g. TTC based methods (Wissemann 1995) and allows in contrast to destructive or chemical tests further experiments with the harvested seed. The statistical analyses were performed with SPSS 10.0. Analyses of variance (GLM) or alternatively the nonparametric Kruskall-Wallis test was performed to investigate differences of the number of grains per hip and seed fertility between species and crossing types. Linear regression was used for the analysis of the diameter of the orifice. Plants with less than three hips were excluded from the statistical analyses.

Results

Morphology. The results of the morphological analysis of distinctive characters are shown for all parental species and all artificial F1-hybrids in Table 1. The offspring of the interspecific crossings is not reciprocal. Generally, hybrids strongly resemble the seed parent in their vegetative habit. The hybrids are not distinguishable from the species the seed parent belongs to, with respect to the presence of hairs or glands at leaf surface, rachis or pedicels (Table 1).

In contrast, hybrids may differ in fruit characters (sepal persistence and diameter of orifice) from the seed parent. In the case of different character states for sepal persistence and the diameter of orifice between seed and pollen parents, the offspring clearly resembles the character state of the pollen parent. For example the hybrid *R. corymbifera* × *rubiginosa* does not possess odorant glands neither on the leaf surface nor at the pedicel but at least the rachis is densely hairy as in *R. corymbifera*. The hip of the hybrid bears persistent sepals and the diameter of the orifice exceeds 1,0 mm by far as in *R. rubiginosa*. In the reciprocal case (*R. rubiginosa* × *R. corymbifer*a) the hybrid expresses odorant glands on the leaf surface as well as at the pedicel, whereas the diameter of orifice is clearly below 1,0 mm (Table 1).

A linear regression between the diameter of orifice (Fig. 1 and Fig. 2) was conducted including hybrids and the parents respectively. This analysis demonstrates a significant correlation between the diameter of the orifice of the pollen parent and of the respective offspring. ($R^2 = 0.678$, $p = 0.023$). Nearly 70% of the variation of this character is explained by the variation of the pollen parent. A non significant, very weak correlation was detected between the diameter of the orifice of the hybrid and the respective seed parent ($R^2 = 0.209$, $p = 0.303$).

The state of the sepal persistence of the hybrids corresponds exactly with the state of sepal persistence of the respective pollen parent with one exception (*R. rubiginosa* × *micrantha*).

Hybrid seed set and fitness. The total number of seeds per hip does not differ significantly between hybrid plants and the different modes of pollination (Kruskall-Wallis, $\chi^2_3 = 1.15$, $p = 0.765$). Furthermore, no statistically significant differences of the percentage of infertile seeds per hip between hybrids and the different modes of pollination were found (ANOVA, $F_{2,33} = 0.577$, $p = 0.587$).

Discussion

Hybrid offspring of artificial crossings among dog-roses strongly resemble the seed parent in the vegetative habit. Hybrids without hips are not distinguishable from the mother plant. This pattern is very reasonable taking into account the matroclinal mode of inheritance of dog-roses. The characters "hairyness of leaves" and the presence of glands at the leaf surface and pedicels as well as the epicuticular wax sculptures (Wissemann 2000b) are inherited maternally; the paternal influence of only one fifth of the somatic chromosome number is not recognisable by morphology. Contrary to the matroclinal inheritance, the diameter of the orifice and the behaviour of sepals during hip ripening do not follow this mode of inheritance. The investigated hybrids express this character in the same way as the pollen parent, regardless which character state is expressed. It

Table 1. Key characters and the diameter of the orifice of five species of *Rosa* sect. *Caninae* and their interspecific hybrids, data marked by an asterisk are excluded from the linear regression, because fewer than 3 hips per plant could be gathered

	Hairs at rachis and lower leaf surface	Odorant glands at leaf surface and pedicel	Odorant glands at the pedicel	Persistence of sepals	Diameter of orifice [mm] number of plants and standard error
R. canina L.	absent	absent	absent	deciduous	0.55 n = 7; se = 0.05
R. corymbifera Borkh.	present	absent	absent	deciduous	0.71 n = 3; se = 0.10
R. rubiginosa L.	present	present	present	persistent	1.23 n = 6; se = 0.10
R. micrantha Borr. ex Smith.	present	present	present	deciduous	0.70 n = 4; se = 0.09
R. elliptica Tausch	present	present	absent	persistent	0.85 n = 1;
R. canina × *corymbifera*	absent	absent	absent	deciduous	0.56 n = 3, se = 0.02
R. corymbifera × *canina*	present	absent	absent	deciduous	0.4* n = 1
R. canina × *rubiginosa*	absent	absent	absent	persistent	1.00 n = 1
R. rubiginosa × *canina*	present	present	present	deciduous	0.6* n = 1
R. rubiginosa × *corymbifera*	present	present	present	deciduous	0.65 n = 1
R. corymbifera × *rubiginosa*	present	absent	absent	persistent	1.28 n = 2; se = 0.13
R. rubiginosa × *micrantha*	present	present	present	persistent	0.58 n = 1
R. micrantha × *rubiginosa*	present	present	present	persistent	0.84 n = 1
R. elliptica × *rubiginosa*	present	present	absent	persistent	0.8* n = 1
R. canina × *elliptica*	absent	absent	absent	deciduous	0.9 n= 1

is remarkable that the outcomes of the here investigated crossings between species of the L- (low diameter of the orifice and deciduous sepals) and D-type (wide diameter of the orifice and persistent sepals) are not totally intermediate (L/D-types), but their sepal persistence and the diameter of the orifice corresponds to the L-type when the pollen parent was an L-type or to the D-type, when the pollen parent was a D-type. Results from the

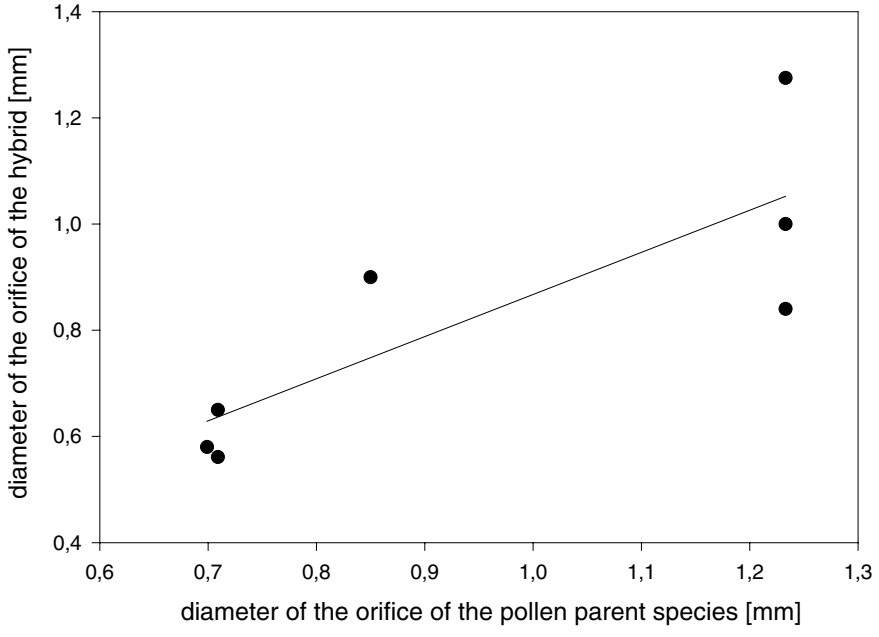


Fig. 1. Relationship between the diameter of the orifice of the **pollen** parent species and the hybrid [mm]; linear regression: $y = 0.795x + 0.073$; $R_2 = 0.0678$, $p = 0.023$

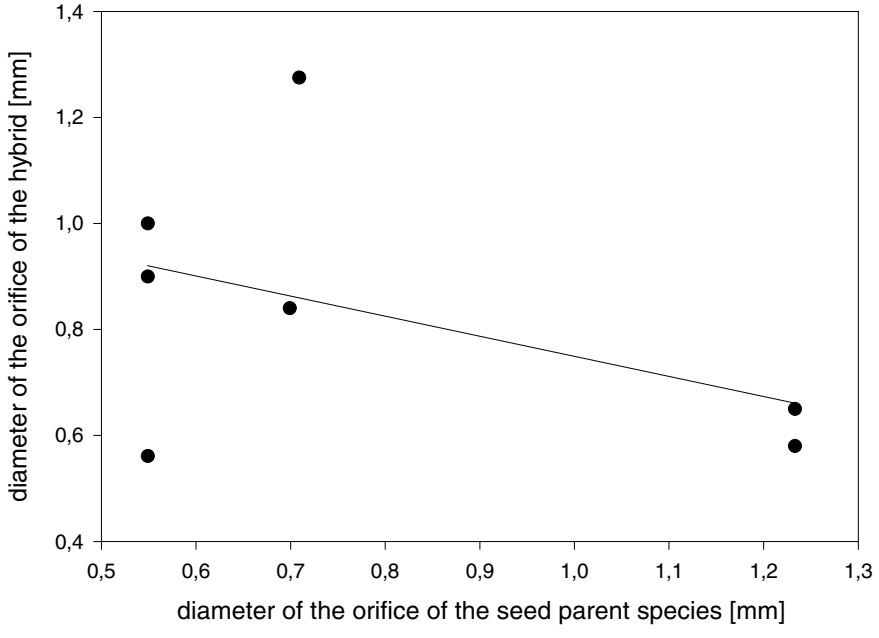


Fig. 2. Relationship between the diameter of the orifice of the seed parent species and the hybrid [mm]; linear regression: $y = -0.378x + 1.128$; $R_2 = 0.209$, $p = 0.303$

limited number of hybrids in our study is well supported by data from existing literature, where this morphological phenomenon has been unrecognised in its importance and implications when it was described by e.g. Gustafsson (1944) for a number of experimental crossings within section *Caninae* as well as for intersectional hybrids. The same pattern was recognised by Graham and Primavesi (1993) for 13 assumingly intrasectional natural hybrids of section *Caninae* in Britain, as well as by Feuerhahn and Spethmann (1995) for an artificial intersectional hybrid between *R. nitida* Willd. (sect. *Carolinae* Crépin, seed parent) and *R. rugosa* Thunb. (sect. *Cinnamomeae* DC., pollen parent).

The separate occurrence of both characters (diameter of the orifice and sepal persistence) has never been described for a species (Henker 2000). Thus it is likely that the persistence of sepals and the diameter of the orifice are influenced by the same gene or gene-complex or are at least coupled. There is no formal genetic explanation for this mode of inheritance, because a dominant/recessive relation of the character is not observed and maternal inheritance of organelles was shown by Matsumoto et al. (1997) for the intersectional hybrid *R.* × *fortuniana* Lindl. (*R. laevigata* Michx. (sect. *Laevigatae*), seed parent × *R. banksiae* Regel (sect. *Banksianae*), pollen parent, as well as by Matsumoto et al. (2001) for *R. californica* 'Plena'. We sequenced both, experimental as well as natural hybrids of *Rosa* sect. *Caninae* (data not shown) and found the same pattern of matroclinal cpDNA inheritence in the system under study here. By contributing the genetic information from the single chromosome set from a pollen grain the persistence of sepals is switched in a 0/1 mode to either the D- or the L-type. The gene or the genes encoding for the diameter of the orifice and sepal persistence are located within the 7 chromosomes of the pollen grain and thus they belong to the bivalent forming group of chromosomes. The strong paternality of these characters may be explained by epigenetic phenomena including genomic imprinting. Genomic imprinting has been described in mammals and plants (Alleman and Doctor 2001). Genes that are targets for imprinting in plants are with the exception of the *MEDEA* gene in *Arabidopsis* involved in the development of the triploid secondary endosperm, where the balance between paternal and maternal genes is controlled by imprinting (Alleman and Doctor 2001). In angiosperms, haploid organisms are easily created from anther culture and the presence of both parental genomes seems not to be necessary to develop complete plant bodies, thus imprinting may be restricted to the endosperm which is dependent from both parental genomes (Alleman and Doctor 2001). This may not be true for roses of sect. *Caninae*. Producing haploid cultures from *Rosa* anthers was not possible until now (Wissemann et al. 1996, 1998). Probably, the 7 chromosomes of the pollen parent are not sufficient to produce a plant. It is still unknown why paternal distribution of orifice diameter and persistence of sepals should be controlled by genetic imprinting. The evolutionary significance of these two characters is not obvious. Presumably these characters are linked to other unknown characters which are targets for imprinting. However, imprinting as an active process causes expenses and so must be exposed to selective pressure. In the scenario of imprinting the male alleles silence four female ones. In contrast to dioecious organisms it remains unclear why selective pressure favours sex-related characters in hermaphroditic plants. To answer the question, genetic evidence (methylation patterns) for imprinting events needs to be tested. An alternative explanation for this pattern of paternal inheritance may be a heterozygous situation of 2×2 co-dominant alleles in the egg cell caused by balancing selection. If the pollen parent is homozygous (that may be reasonable due to the narrowly circumscribed edge species), the pollen parent would turn the balance to the expression of the paternal allel. Not in accordance to this hypothesis are the observations of Feuerhahn and Spethmann (1995), who observed the same pattern of patroclinal inheritance of sepal persistence in crossings of two diploid rose species. The strictly co-dominant inheritance does not explain the occurrence of intermediate forms of the L/D-type in nature, either.

Summing up, at least one allele for sepal persistence and the diameter of the orifice is located on the chromosomes of the bivalent forming chromosomes of the pollen grain. Grant (1976) concluded that the bivalents carry the variation between the species, because of their normal meiotic pairing behaviour and the capability for crossing over, whereas the univalents contain the constant characters for the respective group of roses

Table 2. Number of seeds per hip and the percentage of infertile seeds, values given as mean ± standard error for shrubs produced by different crossing types

	Autogamy n = 2	Geitonogamy n = 7	Xenogamy n = 19	Hybrids n = 9
Seed number per hip	11.7 ± 1.8	11.8 ± 2.3	11.4 ± 0.9	9.8 ± 1.2
Percentage of infertile hips	27% ± 13	32% ± 2	34% ± 4	44% ± 11

Table 3. Hybrids between different subsections of sect. *Caninae* and species with identical character distribution concerning presence of glands and hairs on leaf surface and persistence of sepals and the diameter of the orifice

Hybrid	Corresponding species
R. canina × *rubiginosa*	*Rosa dumalis* Bechstein, *R. subcanina* (H. Christ) R. Keller
R. rubiginosa × *canina*	*Rosa micrantha*, *R. columnifera* (Schwertschl.) Henker & G. Schulze
R. rubiginosa × *corymbifera*	*Rosa micrantha*, *R. columnifera*
R. corymbifera × *rubiginosa*	*Rosa caesia* Sm., *R. subcollina* (H. Christ) R. Keller
R. canina × *elliptica*	*Rosa dumalis*, *R. subcanina*
R. canina × *corymbifera*	*Rosa canina*
R. corymbifera × *canina*	*Rosa corymbifera*

(subsect. *Vestitae* H.Christ, subsect. *Rubigineae* H.Christ, subsect. *Tomentellae* H.Christ and subsect. *Caninae*). This is consistent with the distribution of the characters studied here, because the L- and the D-type occur in all subsections of sect. *Caninae* (Wissemann 2000a). Thus hybrids between L- and D-types of different subsections strongly resemble morphologically described species (Table 3), because *Rosa* species are always defined by a combination of several characters. Nevertheless, the conclusion that hybrids between distinct species are morphologically undistinguishable with other described species (L/D-types) remains unsatisfactory without explicit knowledge about the genetic constitution of the respective species and the resembling hybrids. A cluster analysis using AFLP data could shed light onto these relations. Presently we can only detect hybrids with for example a strongly *Rosa micrantha* -like appearance.

Keller (1931) described hybrids of different members of sect. *Caninae* from field observations. The hybrid *R. eglanteria* L. × *R. canina* L. ssp. *dumetorum* Thuill. is characterised by the same characters as the artificial hybrid *R. rubiginosa* × *R. corymbifera* investigated here. The leaves are hairy and bear odorant glands, the pedicel is glandulous and sepals are reflexed and deciduous (Keller 1931). The same correspondence we found also between *R. eglanteria* L. × *R. canina* L. ssp. *R. vulgaris* Gams and the corresponding artificial hybrid *R. rubiginosa* × *R. canina*. Keller (1931) described the natural hybrid as a plant with hairy and glandulous leaves with gland bearing pedicels and reflexed and deciduous sepals. This description completely agrees with the characters found in the artificial hybrid.

The fertility of the hybrid outcomes of sect. *Caninae* hybrids is in general discussed controversially (e.g. Christ 1873, Keller 1931). However, Gustafsson (1944) was able to show, that no general assumption is possible here, each hybridisation appearing in its effects as a singular fortuitous event. Keller (1931) reports for *R. eglanteria* L. × *R. canina* L. ssp. *R. vulgaris* Gams that soon after flowering hips are deciduous and sterile. Also *R. micrantha* Sm. × *rubiginosa* L. develops only very few

hips containing only 1–2 grains per hip (Keller 1931). These observations are contradictory to our findings. We could not detect any statistically significant difference neither in the total number of seed per hip nor in the percentage of fertile seed per hip between the hybrid outcomes and the parental species. The total number of hips per shrub was not investigated because the plants are still too young and flowered in 2001 for the first time. Hybrids do not suffer from a hybrid depression. This seems reasonable taking into account that the entire section *Caninae* is of hybrid origin (Täckholm 1922) and the genetic distances between the species is very low (Wissemann 2000a). Probably, Keller was searching for plants with low fertility, because this was one of his obvious characters to identify a hybrid. The artificial hybrids produced here would be probably not detectable in the field, because of their extreme resemblance or even identity to other described species (Table 3).

The F1 outcomes of the autogamous, geitonogamous and xenogamous crossings do not differ in their reproductive success. Plants that arose from these crossings show no inbreeding depression.

These results show that *Rosa* sect. *Caninae* is able to successfully reproduce sexually. Interspecific hybrids do not show any disadvantages and may become established easily, some of them are already presumably described as separate species. These observations make clear that the taxonomy of *Rosa* sect. *Caninae* does not sufficiently reflect patterns and processes of variation, because the understanding of the genetic background of the hybrids and character inheritance is still in its infancy.

We like to thank the Deutsche Forschungsgemeinschaft for financial support of this study by a grant to V.W. (Wi 2028-1) under the DFG priority programme 1127 "Radiations – Origins of Biological Diversity". We express our gratitude to F.H. Hellwig (Jena) and G. Theißen (Jena) for stimulating discussion of the results as well as to two anonymous reviewers, who helped to improve the manuscript. The help of S.R. Gradstein (Göttingen) who supports our studies by providing the fields for the experimental rose collection in the Göttingen Botanical Garden for the next years is greatfully acknowledged. We thank the staff of the Botanical Garden Göttingen for their kind help and cooperation during this study.

References

Alleman A., Doctor J. (2000) Genomic imprinting in plants: observations and evolutionary implications. Pl. Molec. Biol. 43: 147–161.

Christ H. (1873) Die Rosen der Schweiz. Verlag H. Georg, Basel.

Dingler H. (1907) Versuch einer Erklärung gewisser Erscheinungen in der Ausbildung und Verbreitung der wilden Rosen. Mitt. Naturwiss. Vereins Aschaffenburg 6: 1–38.

Dingler H. (1908) Neuere Beobachtungen in der Gattung *Rosa*. Bot. Jahrb. 40: 100–108.

Eigner A., Wissemann V. (1999) *Rosa* × *mangii*, eine neue intersektionelle Hybride charakterisiert durch morphologische und genetische Untersuchungen. Haussknechtia 7: 35–40.

Fagerlind F. (1940) Sind die Canina-Rosen agamospermische Bastarde? Svensk. Bot. Tidskr. 34: 334–354.

Fagerlind F. (1944) Kompatibilität und Inkompatibilität in der Gattung *Rosa*. Acta Horti Berg. 13: 274–302.

Feuerhahn B., Spethmann W. (1995) Kreuzungen bei Wildrosenarten. Gehölzforschung 3., Hannover.

Graham G. G., Primavesi A. L. (1993) Roses of Great Britain and Ireland. B.S.B.I. Handbook No. 7. Botanical Society of the British Isles, London.

Grant V. (1976) Artbildung bei Pflanzen. Paul Parey, Berlin Hamburg.

Gustafsson A. (1944) The constitution of the *Rosa canina* complex. Hereditas 30: 405–428.

Henker H. (2000) Rosa. In: Conert E. I., Jäger J., Kadereit J., Schultze-Motel W., Wagenitz G., Weber H. E. (eds.) Hegi G.: Illustrierte Flora von Mitteleuropa, Bd. IV/2C, Lfg. A (Weber H.E.(ed.)): 1–108.

Henker H., Schulze G. (1993) Die Wildrosen des norddeutschen Tieflandes. Gleditschia 21: 3–22.

Hurst C. C. (1927) Differential polyploidy in the genus *Rosa* L. Zeitschrift für induktive Abstammungs- und Vererbungslehre, Suppl. 2 (1928): 866–906.

Keller R. (1931) Synopsis Rosarum spontanearum Europae mediae. Denkschr. Schweiz. Naturf. Ges. 65.

Klášterský I. (1969) Die Problematik des *Rosa canina* L. – Komplexes in der Tschechoslowakei. Mitt. Bot. Linz 6.1 (1974).

Matsumoto S., Nishio H., Ueda Y., Fukui H. (2001) Phylogenetic analyses of the genus *Rosa*: polyphyly of the section *Pimpinellifoliae* and the origin of *Rosa x Fortuniana* Lindl. Acta Horticulturae 547: 357–363.

Matsumoto S., Wakita H., Fukui H. (1997) Molecular classification of wild roses using organelle DNA probes. Scientia Horticulturae 68: 191–196.

Reichert H. (1998) Die zwei Wuchstypen bei Rosen der Sektion *Caninae* und ein Vorschlag für eine Kurzbezeichnung derselben. Acta Rhodologica 1: 29–35.

Täckholm G. (1920) On the cytology of the genus *Rosa*. A preliminary note. Svensk. Bot. Tidskr. 14: 300–311.

Täckholm G. (1922) Zytologische Studien über die Gattung *Rosa*. Acta Horti Berg. 7: 97–381.

Werlemark G., Uggla M., Nybom H. (1999) Morphological and RAPD markers show a highly skewed distribution in a pair of reciprocal crossings between hemisexual dog-rose species, *Rosa* sect. *Caninae*. Theor. Appl. Genet. 98: 557–563.

Wissemann V. (1995) Kreuzungsverhalten und Merkmalsvariation an ausgewählten Wildrosenpopulationen der Sektion *Caninae* (Ser.) Rehd. in Südniedersachsen (Diploma-thesis, Göttingen: Georg-August-Universität), pp. 78.

Wissemann V. (2000a) Molekulargenetische und morphologisch-anatomische Untersuchungen zur Evolution und Genomzusammensetzung von Wildrosen der Sektion *Caninae* (DC.) Ser. Bot. Jahrb. Syst. 122: 357–429.

Wissemann V. (2000b) Epicuticular wax morphology and the taxonomy of *Rosa* (section *Caninae*, subsection *Rubiginosae*). Plant Syst. Evol. 221: 107–112.

Wissemann V. (2003) Conventional taxonomy of wild roses. In: Roberts A., Gudin S., Debener T. (eds.) Encyclopedia of Rose Science. Academic Press, London (in press).

Wissemann V., Hellwig F. H. (1997) Reproduction and hybridisation in the genus *Rosa* section *Caninae* (Ser.) Rehd. Bot. Acta 110: 251–256.

Wissemann V., Möllers C., Hellwig F. H. (1996) Microspore and anther culture in the genus *Rosa*, investigations and current status. Angew. Bot. 70: 218–220.

Wissemann V., Möllers C., Hellwig F. H. (1998) Microspore culture in the genus *Rosa*, further investigations. Angew. Bot. 72: 7–9.

Address of the author: Christiane M. Ritz (e-mail: ritz@otto.biologie.uni-jena.de), Volker Wissemann, Friedrich-Schiller-Universität Jena, Institut für Spezielle Botanik, Philosophenweg 16, D-07743 Jena, Germany.

6. Manuskript IV:

Ritz, C. M., Maier, W. F. A., Oberwinkler, F. & Wissemann, V. (im Druck, akzeptiert am 03. März 2005): Different evolutionary histories of two *Phragmidium* species infecting the same dogrose hosts. *Mycological Research.*

Different evolutionary histories of two *Phragmidium* species infecting the same dogrose hosts

Ritz, C.M.[1§]; Maier, Wolfgang. F.A.[23§], Franz Oberwinkler[2] & Volker Wissemann[1]

[1] Friedrich-Schiller-Universität Jena, Institut für Spezielle Botanik, Philosophenweg 16, D-07743 Jena, Germany
[2] Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Lehrstuhl für Spezielle Botanik und Mykologie, Auf der Morgenstelle 1, D-72076 Tübingen, Germany
[3] Present address: Department of Genetics, FABI, University of Pretoria, Pretoria 0002, South Africa
[1] address for correspondence: christiane.ritz@uni-jena.de
§ The first two authors contributed equally to the paper.

Abstract

Rust fungi in the genus *Phragmidium* are frequent pathogens of both wild and cultivated roses. We investigated the occurrence and relationships of rusts on dogroses, *Rosa* sect. *Caninae* (*Rosa canina*, *R. corymbifera* and *R. rubiginosa*) in Germany. Two *Phragmidium* species, *P. mucronatum* and *P. tuberculatum*, were found and they were able to infect each of the three dogrose species examined. However, the overall infection of *R. rubiginosa* was significantly lower, which could be important for rose breeding. Despite overlapping host ranges, the evolutionary background of *P. tuberculatum* and *P. mucronatum* is quite distinct. Phylogenetic analyses of the D1/D2 region of the large ribosomal subunit suggest that *P. mucronatum* shares a common ancestor with other rose rusts, whereas *P. tuberculatum* evolved from a *Rubus-Sanguisorba* rust clade and must have undergone a host shift to *Rosa* spp.

Keywords

rust fungi, *Phragmidium,* Phragmidiaceae, dogroses, *Rosa*, Rosaceae, host-parasite interaction, nrLSU, host switch

Introduction

The predominantly Northern hemispheric rust genus *Phragmidium* comprises about 60 species (Cummins & Hiratsuka 2003). *Phragmidium* species, like the entire family Phragmidiaceae, have an autoecious life cycle and are restricted to rosaceous hosts, with only two documented exceptions from the USA (Peterson & Cronin 1967). On dogroses four *Phragmidium* species can be found in Central Europe, *viz. P. fusiforme* J. Schröt., *P. mucronatum* (Pers.) Schltdl. *P. tuberculatum* J. Müller and *P. rosae-pimpinellifoliae* (Rabenh.) Dietel. However, the taxonomic history of many species is rather complex (see

Dietel 1905a,b) and especially the *Phragmidium* species on roses, "Formenkreis *Phragmidium mucronatum*", were said to have overlapping morphological characters (Gäumann 1959). This casts doubt onto the broad host ranges stated for *P. mucronatum* and *P. tuberculatum* since these species could have been misidentified due to excessively broad morphological species concepts (compare Newcombe 2003).

The Eurasian dogroses (*Rosa* L. sect. *Caninae* (DC.) Ser.) are a morphologically and genetically highly diverse group, about 30 species of which can be found in Central Europe (Klásterš k? 1969; Henker & Schulze 1993). Their most striking feature is a unique meiotic behaviour, the so-called "Canina-meiosis" (Täckholm 1920, 1922), where the pentaploid genome is distributed unequally during meiosis resulting in haploid pollen grains and tetraploid egg cells. After fertilization the pentaploid state is restored and results in full sexual reproduction (Wissemann & Hellwig 1997).

During the course of this study we investigated which rust species can be found on the three most common dogrose species in Germany (*Rosa canina* L., *R. corymbifera* Borkh. and *R. rubiginosa* L.). We examined the frequency of the occurring rusts and whether these rust species show any infection preference for a particular rose host. By means of molecular phylogenetic analyses based on nrLSU sequence data we tested whether the morphological species determinations proved valid and whether there is any correlation between specific host infection and pathogen phylogeny.

Materials and methods

Sampling and collection

Three species of dogroses differing in leaf surface characters were investigated, *i.e. R. canina* with glabrous leaves, *R. corymbifera* with hairy leaves and *R. rubiginosa* with glandular leaves. Rust fungi from these hosts were collected during August 2002 in Germany at 16 sample sites representing a geographical north-south axis of 800 km (Fig. 1). A sample site consists of populations of the respective host-species and represents an area of 500 to 1000 square metres. Rust specimens used for DNA analyses, voucher information and GenBank accession numbers are listed in Table 1. For DNA extraction rust fungi were collected as silica-gel dried infected leaf material.

A total of 15 rose bushes (five bushes per species) were sampled at each site. Rust infection was recorded as categorical data (presence or absence of rust). In the case of infection, the rust species was morphologically identified after Gäumann (1959) based on either aeciospore or teliospore characters, using a Carl Zeiss microscopes (with bright field and phase contrast optics). Specimens of rust fungi were deposited in the herbarium of the University of Tübingen (TUB). Statistical analyses of rust infections were performed using the software package SPSS 11.0. Presence/absence data of rust infection were compared between the rose species using logistic regression. Abundance of rust fungi and niche differentiation (e.g. the preferential infection of a given host by one of the two rust species) were analysed using a six-field Chi^2 test. Since the absolute abundance of the two observed rust species was found to be very different, the expected values of the six-field-test were corrected for the relative frequency of the respective rust fungus.

We determined nrLSU sequences for *P. mucronatum*, *P. fusiforme* and *P. tuberculatum* and integrated all available (nrLSU) sequences of Phragmidiaceae from an earlier study (Maier *et al.* 2003) for phylogenetic analyses.

DNA extraction

Total DNA was extracted from either aeciospores or teliospores using the DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden) according to the manufacturer's protocol. The protocol was modified by shaking the dried samples with the help of a mixer mill (MM 300, Retsch, Haan) for 3 min at 30 Hz in a 1.5 ml tube together with one tungsten carbide ball (3 mm diam).

DNA amplification

The 5' end of the nuclear 28S rRNA gene (nrLSU) was amplified from diluted extracts ($10^{-1}$and 10^{-2}). Primers for the amplification were LR0R (5'-ACC CGC TGA ACT TAA GC) described by Moncalvo *et al.* (1995) and LR6 (5'-CGC CAG TTC TGC TTA CC) described by Vilgalys & Hester (1990). PCR conditions consisted of an initial denaturation at 94 °C for 180 s, 12 cycles of 94 °C for 35 s, 45 °C for 45 s, 72 °C for 60 s, 12 cycles of 94 °C for 35 s, 45 °C for 55 s, 72 °C for 90 s, 12 cycles of 94 °C 35 s, 45 °C for 60 s, 72 °C for 120 s and a final elongation of 72 °C for 10 min.

Sequencing

The amplified DNA was purified using Qiaquick PCR purification kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions, and was then sequenced directly in both directions. Cycle-sequencing was performed using the ABI PRISM Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Applied Biosystems, Warrington) or the ThermoSequenase labelled primer cycle sequencing Kit (Amersham Pharmacia, Uppsala) with the unlabelled or IRD-labelled primers NLMW1 (5'-TCA ATA AGC GGA GGA AAA GA; Sampaio *et al.* 2002) and NL4 (5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G; O'Donnell 1992, 1993). The cycle sequencing profile was 25 cycles of 96 °C for 10 s, 50 °C for 5 s and 60 °C for 4 min. The resulting DNA fragments were separated on an acrylamide gel, using an automatic LI-COR DNA sequencer 4000L or an ABI 373A Stretch (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Phylogenetic reconstructions

Sequence alignment was carried out using the software Clustal X 1.83 (Thompson *et al.* 1997) followed by slight manual editing. The final alignment has been deposited in TreeBase (http://www.herbaria.harvard.edu/treebase/) and is accessible under the following study accession number (preliminary access SN1944).

Parsimony analyses were performed using the heuristic search mode in PAUP 4.0b10 (Swofford 2002) with 100 random addition sequence replicates and TBR branch swapping. All character states were treated as unordered, equally weighted and gaps were treated as missing characters. Branch support was evaluated by 1000 bootstrap replicates (Felsenstein 1985) and with the help of Bremer support (Bremer 1994) using the software AutoDecay 3.0 (Eriksson & Wikström 1995).

Bayesian inference of phylogeny using Monte Carlo Markov chains (MCMC) was conducted with MrBayes 3.0b4 (Huelsenbeck & Ronquist 2001). Four incrementally heated simultaneous Monte Carlo Markov chains were run over 2.000.000 generations, using the DNA substitution model of Hasegawa, Kishino and Yano (HKY 85; Hasegawa *et al.* 1985) with gamma-distributed substitution rates (see Swofford *et al.* 1996), random starting trees and default starting values of the very DNA substitution model. The HKY+G model of DNA substitution was chosen by both the Akaike information criterion and the likelihood ratio tests implemented in MrModeltest 1.0b (Nylander 2002). Trees were sampled every 100 generations resulting in an overall sampling of 20.001 trees. The first 1000 trees were discarded as "burnin". From the remaining trees a 50 % majority rule consensus tree was computed to obtain estimates for the *a posteriori* probabilities. Branch lengths were estimated as mean values over the sampled trees. This Bayesian approach of phylogenetic analysis was repeated four times, always using random starting trees and random starting values for the HKY85 model to test the independence of the results from topological priors (Huelsenbeck *et al.* 2002).
Furthermore, a neighbour-joining analysis was performed also using HKY 85 as DNA substitution model.
The unrooted dendrograms from neighbor joining, parsimony and MCMC analyses were rooted with *Kuehneola uredinis* (Link) Arth., *Triphragmium ulmariae* (Hedw. f. ex DC.) Link and *Trachyspora intrusa* (Grev.) Arth. according to the findings of Maier *et al.* (2003).

Results

Rust species
Of the four potentially occurring dogrose rusts, we only detected *Phragmidium mucronatum* and *P. tuberculatum*.

Statistical analyses of infection
The number of rose bushes (*R. canina*, *R. corymbifera* and *R. rubiginosa*) infected by *P. mucronatum* and *P. tuberculatum* is shown in Table 2. The investigated rose species displayed different responses to rust infection (logistic Regression; Wald = 31.64, df = 2, $p < 0.001$). Rust infection on *R. rubiginosa* was significantly lower compared to *R. canina* (log. Reg.; Wald = 30.37, df = 1, $p < 0.001$) and *R. corymbifera* (log. Reg.; Wald = 18.75, df = 1, $p < 0.001$), whereby no significant difference of rust infection could be detected between *R. canina* and *R. corymbifera* (log. Reg.; Wald = 2.05, df = 1, $p = 0.15$). These results did not change if the logistic regression was performed for the two rust species separately. Additionally, we tested whether *P. mucronatum* and *P. tuberculatum* showed a niche differentiation among the three rose species. Since *P. tuberculatum* was significantly rarer than *P. mucronatum* on the three investigated rose species ($\chi^2_1 = 10.37$, $p = 0.001$), the expected values of the six-field-test were corrected for the relative abundance of the rust fungus (Table 2). No significant host preferences could be detected between the two rust fungi ($\chi^2_1 = 0.47$, $p = 0.79$).

Phylogenetic reconstructions

Phylogenetic analyses of the nrLSU sequence data based on maximum parsimony (MP), neighbor joining (NJ) and Bayesian inference (MCMC) resulted in the same tree topology (Fig. 2 and Fig. 3, NJ not shown). Furthermore, all four runs of MCMC-analyses yielded identical tree topologies. Members of the genus *Phragmidium* appear as a monophyletic group with 64% and 72% bootstrap support (MP and NJ, respectively) and 99% *a posteriori* probability.

The observed rose-parasitizing rust fungi *P. mucronatum* and *P. tuberculatum* were not monophyletic. While *P. mucronatum* grouped with *P. fusiforme*, mainly occurring in the Alps, and *P. montivagum* pathogenic on North American wild roses (both bootstrap and *a posteriori* probability of 100%), *P. tuberculatum* appeared as the sister taxon to four *Phragmidium* species living on either *Rubus fruticosus* agg., *Rubus idaeus*, *Sanguisorba minor* or *Potentilla sterilis* (supported by 83% bootstrap and 76% *a posteriori* probability). The 5'-regions of the nrLSU of all investigated specimens of *P. tuberculatum* were identical, with *P. mucronatum* differing from *P. tuberculatum* in 8-9% of the 527 characters of the alignment. In *P. mucronatum*, seven of the ten sequenced specimens were identical, with the other specimens differing from them and from each other in about 1% of the examined nucleotides. These were the collections U2, T10, and T15.

Discussion

Species delimitation and phylogeny

On the three most common dog roses in Germany (*Rosa canina*, *R. corymbifera*, *R. rubiginosa*) we detected only *Phragmidium mucronatum* and *P. tuberculatum*. While *P. rosae pimpinellifoliae* has been recorded from *R. canina* and *R. rubiginosa*, the mainly alpine *P. fusiforme* has not been observed on any of the here studied dog roses (Gäumann 1959).

It was stated that the morphological features of the European rose rusts are partly overlapping which question the data given on their host range. However, we found that species determination of *P. mucronatum* and *P. tuberculatum* based on both aecio- and teliospore features according to Gäumann (1959) was unambiguously reproducible. Since species determination is easiest if both species are available for comparative microscopy, the unexpectedly large differences in the LSU sequences will prove helpful as additional characters for species determination in future. Interestingly, sequences of some *P. mucronatum* specimens differed slightly from the majority of specimens of that species. However, no morphological differences could be detected, and further investigations will be necessary to decide whether there are cryptic species in this taxon.

Due to the overlapping host ranges of *P. tuberculatum* and *P. mucronatum* and their strong morphological resemblance (Sydow & Sydow 1915), we expected also a close phylogenetic relationship between them. However, this assumption was not reflected by the phylogenetic reconstructions because *P. mucronatum* grouped within a clade comprising *P. fusiforme* and the North American *P. montivagum*, while *P. tuberculatum*

was a sister group to European *Rubus*- and *Sanguisorba*-rusts (Figs. 2 and 3). Thus, we suggest the existence of a core rose rust clade on the one hand and a host jump from a predecessor of *P. tuberculatum* that had lived on *Rubus* or *Sanguisorba* to *Rosa* on the other hand. The phylogenetic hypotheses derived from the trees also contradict subgeneric delineations based on the structure of teliospore pedicels (Arthur 1906 *fide* Gäumann 1959) – being hygroscopic (subgenus *Earlea*) or firm (subgenus *Euphragmidium*) – as well as the host genus-specific "Formenkreise" of Gäumann (1959).

The detected sequence divergences in the D1/D2 region of the nrLSU of *Phragmidium* as a whole, being up to 10% in some species pairs, are the highest observed for a rust genus so far (see Maier *et al.* 2003). This is roughly twice as much as in other rust genera, suggesting either that *Phragmidium* is a relatively old genus or has an accelerated substitution rate. Support for the first explanation is provided by the fact that *Phragmidium* species are restricted to a relatively old host family, the Rosaceae (Kalkmann 1988), in contrast to e.g. *Puccinia* which has its focus on more recently evolved angiosperm families like Poaceae, Cyperaceae and Asteraceae.

Ecological infection data

Neither *P. mucronatum* nor *P. tuberculatum* showed any infection preferences with respect to one of the observed rose species. This results in overlapping host ranges, as summarized by Gäumann (1959), who stated broad host ranges for both species including also non-dog roses. These wide host ranges might be a consequence of the putative hybridisation of dog roses after the last ice age (Grant 1971). Similar hypotheses to explain broad host ranges which are rather unusual for the rusts were formulated for cereal and grass rusts (Savile & Urban 1982, Urban & Marková 1984), and it has been assumed that hybridisation of hosts can form a bridge for parasites, enabling them to infect paternal lineages as well as hybrids (Floate & Whitham 1993).

The observation that *P. tuberculatum* was only half as frequent as *P. mucronatum* might be explained by the distinct phylogenetic history of the two rusts. It can be speculated that *P. tuberculatum*, which evolved from the *Rubus-Sanguisorba* rust clade might be less adapted to *Rosa* as compared to *P. mucronatum* which is in the rose rust clade and most likely shares a longer adaptational or coevolutionary history with its rose hosts. However, phylogenetic host data and quantitative data on infection severity (rust pustules per leaf surface) derived from laboratory-based experiments will be needed to test this hypothesis.

The observation that *R. rubiginosa* was infected significantly less frequently in nature than the other investigated rose species might be somehow correlated with the conspicuously scented glands producing a sticky epicuticular secretion on the leaf surface. Furthermore, we detected that *R. corymbifera,* a species with a hairy lower leaf surface, was infected as frequently as the glabrous *R. canina.* The result that the presence of trichomes has no influence on rust infection corresponds also with the findings of Rubiales & Niks (1992) who found no correlation between the presence of hair in *Hordeum* species and rust infection. Besides leaf surface, another and maybe more important parameter influencing the infection patterns of the investigated rust fungi might be the relative frequency of the rose species in the sample area, since *Rosa canina* and *R. corymbifera* are more frequent than *R. rubiginosa* in Europe (Kurrto *et al*. 2004). With a rather lax growth habit these two

species occur on dry grasslands, meadows and pastures as well as in hedges and forest belts, whereas the rather thermophilous *R. rubiginosa* with its more condensed growth habit is found mainly in open areas. It seems plausible that the wind-distributed rust fungi might be best adapted to the most frequent rose species.

The lack of any obvious niche differentiation of the two *Phragmidium* species and the putative host jump of *P. tuberculatum* to *Rosa* contradicts *a priori* assumptions on strict cospeciation of specific rust-plant interactions. A similar exception has been described for *Puccinia* spp. parasitizing *Arabis* spp. (Roy 2001). Furthermore, host switches within *Phragmidium* were also detected by reconciliation analyses of parasite and host trees of various genera of rust fungi infecting Rosaceae (Jackson 2004). In the mentioned study, however, the role of association by descent was significant. Our current hypothesis is that the frequent hybridisation of dog roses in nature (Ritz & Wissemann 2003) might have prevented host-induced speciation in the parasites and is furthermore the cause of the wide host range of the two observed rose rust taxa.

Acknowledgements

We thank the Deutsche Forschungsgemeinschaft for financial support of this study (Wi 2028/1-1, OB 24/25-1) under the DFG priority programme 1127 “Radiations – Origins of Biological Diversity”. The practical help of Nadine Drechsler during identification of the numerous fungus samples is gratefully acknowledged.

References

Arthur, J.C. (1906) Eine auf die Struktur und Entwicklungsgeschichte begründete Klassifikation der Uredineen. *Wissenschaftliche Ergebnisse des Internationalen Botanischen Kongresses, Wien* 1905: 331-348.

Bremer, K. (1994) Branch support and tree stability. *Cladistics* **10**: 295-304.

Cummins, G. B. & Hiratsuka, Y. (2003) *Illustrated Genera of Rust Fungi*. APS Press, St. Paul, Minnesota.

Dietel, P. (1905a) Über die Arten der Gattung *Phragmidium. Hedwigia* **44**: 112-132.

Dietel, P. (1905b) Über die Arten der Gattung *Phragmidium*. II. *Hedwigia* **44**: 330-346.

Eriksson, T. & Wikström, N. (1995) *AutoDecay 3.0*. Stockholm, Stockholm University.

Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**: 783-791.

Floate, K. D. & Whitham, T. G. (1993) The hybrid bridge hypothesis - host shifting via plant hybrid swarms. *American Naturalist* **141**: 651-662.

Gäumann, E. (1959) *Die Rostpilze Mitteleuropas mit besonderer Berücksichtigung der Schweiz*. Büchler & Co., Bern.

Grant, V. (1971) *Plant Speciation*. Columbia University Press, New York.

Hasegawa, M., Kishino, H. & Yano, T.-A. (1985) Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution* **22**: 160-174.

Henker, H. & Schulze, G. (1993) Die Wildrosen des norddeutschen Tieflandes. *Gleditschia* **21**: 3-22.

Huelsenbeck, J. P. & Ronquist, F. (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* **17**: 754-755.

Huelsenbeck, J. P., Larget, B., Miller, R. E. & Ronquist, F. (2002) Potential applications and pitfalls of Bayesian inference of phylogeny. *Systematic Biology* **51**: 673-688.

Jackson, A. P. (2004) A reconciliation analysis of host switching in plant-fungal symbioses. *Evolution* **58**: 1909-1923.

Kalkmann, C. (1988) The phylogeny of the Rosaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* **98**: 37-59.

Klásteršk?, I. (1969) Die Problematik des *Rosa canina* L. - Komplexes in der Tschechoslowakei. *Mitteilung der Botanischen Arbeitsgemeinschaft am Oberösterreichischen Landesmuseum Linz* **6.1** (1974): 65-74.

Kurrto, A., Lampinen, R. & Junikka, L. (eds.) (2004) *Atlas Florae Europaeae. Distribution of Vascular Plants in Europe. 13. Rosaceae (Spiraea to Fragaria, excl. Rubus)*. The Committee for Mapping the Flora of Europe & Societas Biologica Fennica Vanamo. Helsinki.

Maier, W., Begerow, D., Weiß, M. & Oberwinkler, F. (2003) Phylogeny of the rust fungi: an approach using nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Canadian Journal of Botany* **81**: 12-23.

Moncalvo, J.-M., Wang, H.-H. & Hseu, R.-S. (1995) Phylogenetic relationships on *Ganoderma* inferred from the internal transcribed spacers and 25S ribosomal DNA sequences. *Mycologia* **87**: 223-238.

Newcombe, G. (2003) *Puccinia tanaceti*: specialist or generalist? *Mycological Research* **107**: 797-802.

Nylander, J. A. A. (2002) *MrModeltest 1.0b*. Uppsala, Dept. Systematic Zoology, EBC; Uppsala University, Sweden.

O'Donnell, K. L. (1992) Ribosomal DNA internal transcribed spacers are highly divergent in the phytopathogenic ascomycete *Fusarium sambucinum* (*Gibberella pulicaris*). *Current Genetics* **22**: 213-220.

O'Donnell, K. L. (1993) *Fusarium* and its near relatives. Pp. 225-233 in: Reynolds, D. R. & Taylor, J. W. (eds) *The fungal holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics*. Wallingford, CAB International.

Peterson, R. S. & Cronin, E. A. (1967) Non-rosaceous hosts of *Phragmidium* (Uredinales). *Plant Disease Reporter* **51**: 766-767.

Ritz, C. M. & Wissemann, V. (2003) Male correlated non-matroclinal character inheritance in reciprocal hybrids of *Rosa* section *Caninae* (DC) Ser. (Rosaceae). *Plant Systematics and Evolution* **241**: 213-221.

Roy, B. A. (2001) Patterns of association between crucifers and their flower-mimic pathogens: host jumps are more common than coevolution and speciation. *Evolution* **55**: 41-53

Rubiales, D. & Niks, R. E. (1992) Low appressorium formation by rust fungi on *Hordeum-chilense* lines. *Phytopathology* **82**: 1007-1012.

Sampaio, J. P., Weiß, M., Gadanho, M. & Bauer, R. (2002) New taxa in Tremellales: *Bulleribasidium oberjochense* gen. et sp. nov., *Papiliotrema bandonii* gen. et sp. nov. and *Fibulobasidium murrhardtense* sp. nov. *Mycologia* **94**: 873-887.

Savile, D. B. O. & Urban, Z. (1982) Evolution and ecology of *Puccinia graminis*. *Preslia* **54**: 97-104.

Swofford, D. L. (2002) *Paup* 4.0. Phylogenetic analyses using parsimony (and other methods)*. Sunderland, Massachusetts, Sinauer Associates.

Swofford, D. L., Olsen, G. J., Waddell, P. J. & Hillis, D. M. (1996) Phylogenetic inference. Pp. 407-515 in: Hillis, D. M., Moritz, C. & Mable, B. K. (eds) *Molecular Systematics*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

Sydow, P. & Sydow, H. (1915) *Monographia Uredinearum. Volumen III*. Gebrüder Borntraeger, Leipzig.

Täckholm, G. (1920) On the cytology of the genus *Rosa*. A preliminary note. *Svensk Botanisk Tidskrift* **14**: 300-311.

Täckholm, G. (1922) Zytologische Studien über die Gattung *Rosa*. *Acta Horti Bergiani* **7**: 97-381.

Thompson, J. D., Gibson, T. J, Plewniak F., Jeanmougin, F. & Higgins, D.G. (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* **25**: 4876-4882.

Urban, Z. & Marková, J. (1984) Ecology and evolution of *Puccinia graminis* Pers. *Ceská Mykologie* **38**: 65-95.

Vilgalys, R. & Hester, M. (1990) Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology* **172**: 4238-4246.

Wissemann, V. & Hellwig, F. H. (1997) Reproduction and hybridisation in the genus *Rosa* section *Caninae* (Ser.) Rehd. *Botanica Acta* **110**: 251-256.

Tab. 1: Voucher information, herbarium accession and GenBank accession numbers of rust samples used for the DNA analyses.
The capital letter of the specimen voucher corresponds to the localities of *Phragmidium mucronatum* and *P. tuberculatum* presented in Figure 1. The other species of Phragmidiaceae listed below are taken from Maier *et al.* (2003).

Tab. 2: Number of rose-bushes (*R. canina, R. corymbifera* and *R. rubiginosa*) infected with *Phragmidium mucronatum* and *Phragmidium tuberculatum* and number of sample sites with rust infection during summer 2002 at 16 samples sites in Germany.

Tab. 1:

Taxon	Host plant, specimen voucher and herbarium accession No.	GenBank No.
Phragmidium mucronatum	*Rosa corymbifera*, B21, TUB 012075	AJ715513
	Rosa corymbifera, C2, TUB 012076	AJ715519
	Rosa corymbifera, G7, TUB 012077	AJ715516
	Rosa rubiginosa, G8, TUB 012078	AJ715517
	Rosa corymbifera, P15, TUB 012082	AJ715514
	Rosa corymbifera, S14, TUB 012083	AJ715515
	Rosa rubiginosa, T10, TUB 012084	AJ715521
	Rosa corymbifera, T14, TUB 012085	AJ715512
	Rosa canina, T15, TUB 012086	AJ715518
	Rosa canina, U2, TUB 012090	AJ715520
Phragmidium tuberculatum	*Rosa canina,* H2, TUB 012079	AJ715508
	Rosa canina, J12, TUB 012080	AJ715510
	Rosa canina, M8, TUB 012081	AJ715511
	Rosa corymbifera, W9, TUB 012087	AJ715509
	Rosa rubiginosa, W11, TUB 012088	AJ715507
	Rosa corymbifera, W20, TUB 012089	AJ715506
Phragmidium fragariae	*Potentilla sterilis*	AF426217
Phragmidium fusiforme	*Rosa pendulina*	AJ715522
Phragmidium montivagum	*Rosa* cf. *woodsii*	AF426213
Phragmidium rubi-idaei	*Rubus idaeus*	AF426215
Phragmidium sanguisorbae	*Sanguisorba minor*	AF426216
Phragmidium violaceum	*Rubus fruticosus* agg.	AF426214
Kuehneola uredinis	*Rubus fruticosus* agg.	AF426218
Trachyspora intrusa	*Alchemilla vulgaris* agg.	AF426220
Triphragmium ulmariae	*Filipendula ulmaria*	AF426219

Tab. 2:

	Rosa canina	*Rosa corymbifera*	*Rosa rubiginosa*	sample sites with infection
Phragmidium mucronatum	30	29	10	17
Phragmidium tuberculatum	20	12	4	13
Number of sampled bushes	80	80	80	

Fig. 1: Sample sites of rust collection during summer 2002 in Germany. (**B**): Baden-Württemberg, Zollernalbkreis, Beuren, (**C**): Nordrhein-Westfalen, Geseke, (**D**): Thüringen, Kahla, Dohlenstein, (**E**): Niedersachsen, Groß Schneen, Einzelberg, (**F**): Schleswig-Holstein, Fehmarn, Gammendorf, (**G**): Niedersachsen, Göttingen, Gartetal, (**H**): Bayern, Happertshausen, (**J**): Thüringen, Jena-Zwätzen, (**M**): Rheinland-Pfalz, Mainz-Finthen, (**P**): Schleswig-Holstein, Pöschendorf, (**R**): Baden-Württemberg, Rottenburg/Neckar, (**S**): Sachsen-Anhalt, Sangerhausen, (**T**): Rheinland-Pfalz, Trier-Ruwer, (**U**): Nordrhein-Westfalen, Westheim, (**W**): Mecklenburg-Vorpommern, Neubrandenburg, Krickow, (**Z**): Rheinland-Pfalz, Hunsrück, Züsch.

Fig. 2: Strict consensus of 54 equally most parsimonious trees (67 parsimony informative characters of a total of 527 characters) based on nrLSU sequence data (tree length 156, CI = 0.69, RI = 0.92, RC = 0.70). Bootstrap values are shown above branches (1000 replicates), Bremer support values are indicated below branches. The topology was rooted with *Kuehneola uredinis*, *Triphragmium ulmariae* and *Trachyspora intrusa*.

Fig. 3: Bayesian inference of phylogenetic relationships of representatives of Phragmidiaceae: Monte Carlo Markov chain analysis based on nrLSU sequence data (substitution model of Hasegawa, Kishino, and Yano with gamma distributed substitution rates, 2.000.000 generations). The 50%-majority rule consensus tree was computed from 19.001 trees that were sampled after the process had reached stationarity. The topology was rooted with *Kuehneola uredinis*, *Triphragmium ulmariae* and *Trachyspora intrusa*. Numbers on branches are estimates for *a posteriori* probabilities.

Fig. 1:



Fig. 2:

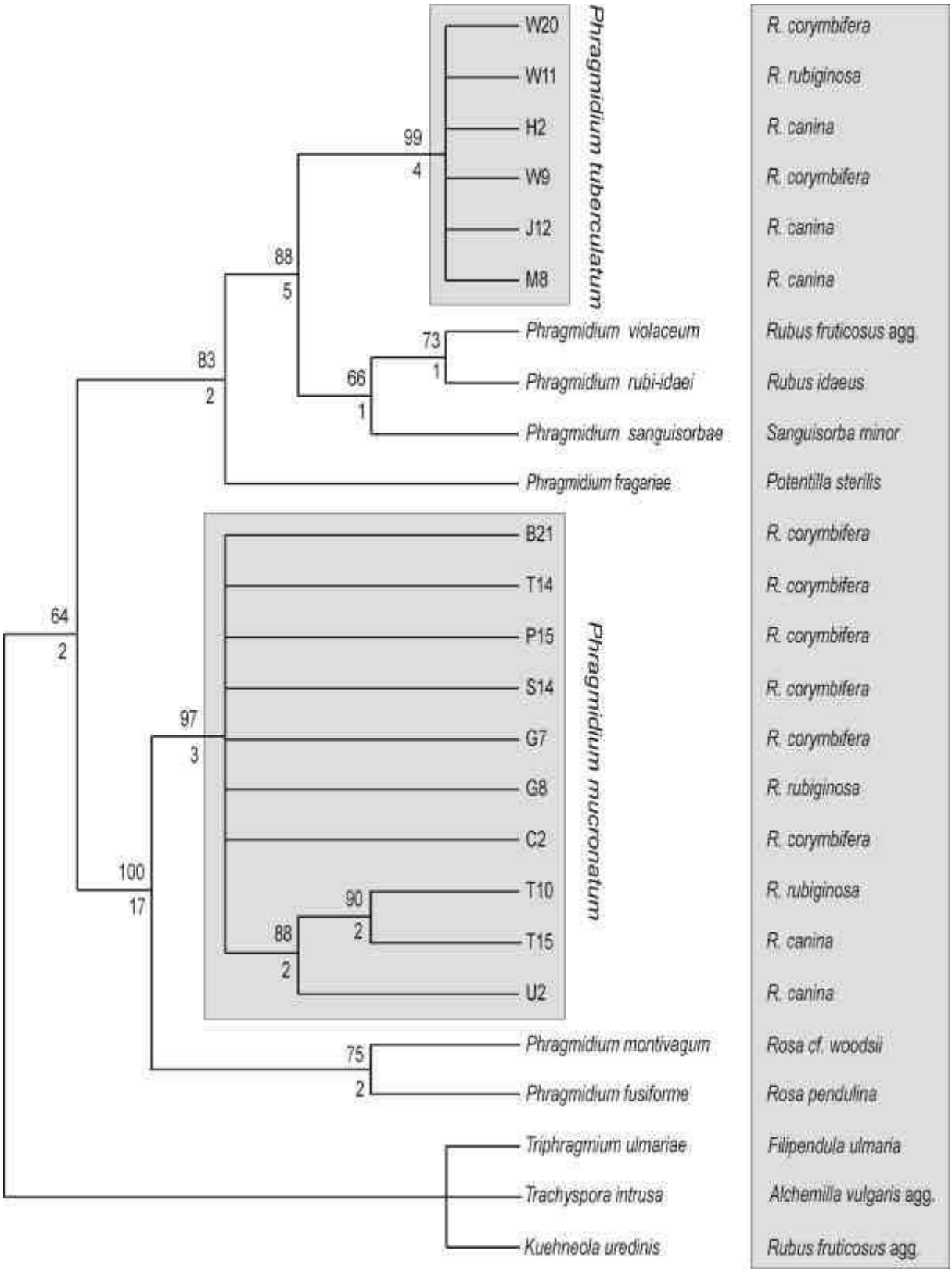
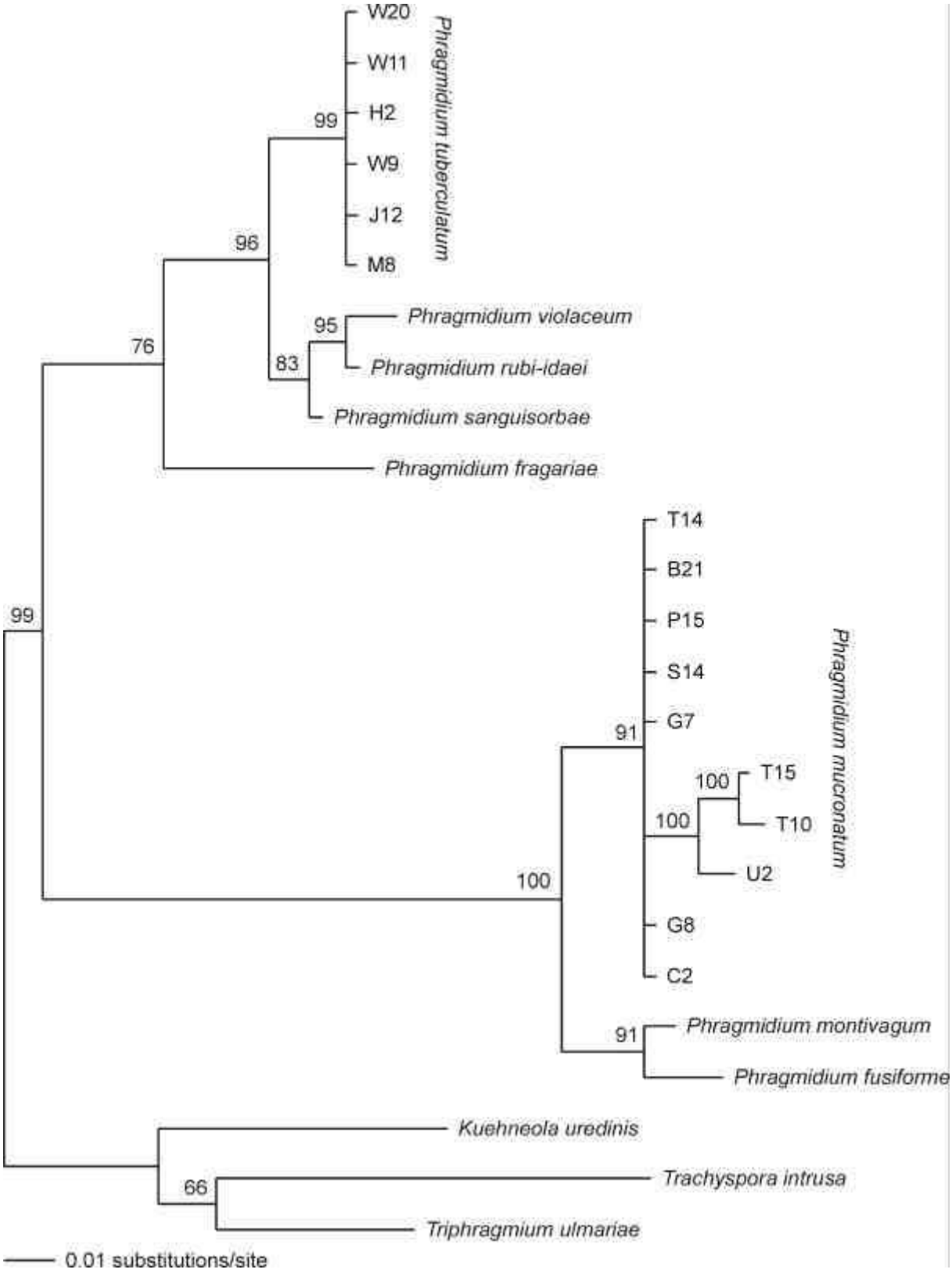

W20
W11
H2
W9
J12
M8
Phragmidium tuberculatum
Phragmidium violaceum
Phragmidium rubi-idaei
Phragmidium sanguisorbae
Phragmidium fragariae
B21
T14
P15
S14
G7
G8
C2
T10
T15
U2
Phragmidium mucronatum
Phragmidium montivagum
Phragmidium fusiforme
Triphragmium ulmariae
Trachyspora intrusa
Kuehneola uredinis
99
4
88
5
73
1
66
1
83
2
64
2
97
3
100
17
90
2
88
2
75
2
R. corymbifera
R. rubiginosa
R. canina
R. corymbifera
R. canina
R. canina
Rubus fruticosus agg.
Rubus idaeus
Sanguisorba minor
Potentilla sterilis
R. corymbifera
R. corymbifera
R. corymbifera
R. corymbifera
R. corymbifera
R. rubiginosa
R. corymbifera
R. rubiginosa
R. canina
R. canina
Rosa cf. woodsii
Rosa pendulina
Filipendula ulmaria
Alchemilla vulgaris agg.
Rubus fruticosus agg.

Fig.3:


W20
W11
H2
W9
J12
M8
Phragmidium tuberculatum
99
96
95
83
76
Phragmidium violaceum
Phragmidium rubi-idaei
Phragmidium sanguisorbae
Phragmidium fragariae
T14
B21
P15
S14
G7
T15
T10
U2
G8
C2
Phragmidium mucronatum
91
100
100
99
91
Phragmidium montivagum
Phragmidium fusiforme
Kuehneola uredinis
Trachyspora intrusa
66
Triphragmium ulmariae
0.01 substitutions/site

7. Gesamtdiskussion

7.1. Diskussion der verwendeten Methoden

7.1.1. Verwendung von nrITS-1-Sequenzen für den Nachweis des hybridogenen Ursprungs der Caninae

Die nrITS-Region (nuclear ribosomal internal transcribed spacer) ist der populärsten kernkodierte molekulare Marker für phylogenetische Rekonstruktionen auf Gattungs- und Artebene in der Botanik. Die Vorteile des Markers sind vielfältig. Er wird biparental vererbt, ist aufgrund seiner geringen Größe, der zahlreichen Kopien und der nahezu universellen Primer von White et al. (1990) leicht zu amplifizieren. Der nrITS wird zwar transkribiert und nimmt eine spezifische Sekundärstruktur an, ist aber eine nicht-kodierende Sequenz und unterliegt daher einem geringen Selektionsdruck (Baldwin et al. 1995). Der nrITS gehört zu einer multi-copy-Genfamilie der ribsomalen DNA, die sich in den NOR-Regionen (nuclear organizer region) der Chromosomen befindet. Die ribosomale DNA unterliegt dem Phänomen der konzertierten Evolution (Elder 1995). Mechanismen wie Genkonversion und ungleiches Cross-over sorgen für die Homogenisierung aller Wiederholungseinheiten der nrDNA. Neuere Arbeiten weisen darauf hin, dass diese Konzertierung bei weitem nicht vollständig verlaufen muss, so dass paraloge Sequenzen und Pseudogene innerhalb eines Individuums phylogenetische Rekonstruktionen verfälschen können (Alvarez & Wendel 2003; Bailey et al. 2003; Wissemann 2003b). Die fehlende Konzertierung von ITS-Sequenzen in allopolyploiden Genomen bietet aber auch eine Informationsquelle, um Hybridisierungsereignisse in Pflanzen nachzuweisen (Soltis & Soltis 1991; Ritland et al. 1993; Suh et al. 1993; Sang et al. 1995; Soltis et al. 1995; Ainouche & Bayer 1997; Campbell et al. 1997; Vargas et al. 1999). Wissemann (1999, 2000a, 2002) zeigte, dass in der Sektion *Caninae* die ITS-Region nicht-konzertiert evolviert und schloss damit auf den allopolyploiden Ursprung der *Caninae*. Diese Schlussfolgerungen beruhen auf den Befunden von Ma et al. (1997), die in den polyploiden Rosen pro Chromosomensatz eine NOR-Region gefunden haben. Schlotterer & Tautz (1994) zufolge liegen ITS-Sequenzen innerhalb einer NOR-Region konzertiert vor. Ich nehme daher an, dass die verschiedenen ITS-Typen nur in jeweils einer NOR-Region auftreten und deshalb die Genome repräsentieren, die an der hybridogenen Entstehung der *Caninae* beteiligt waren. In der vorliegenden Arbeit wurden diese ITS-Typen dazu verwendet, die Herkunft der Hybridgenome aufzudecken. Zusätzlich zu einem Haplotypennetzwerk, das die Verteilung der ITS-Typen in der Gattung *Rosa* veranschaulicht, wurden von jedem ITS-Typ Sekundärstrukturen berechnet. Ich verwendete dazu das Programm „Alifold“, das es ermöglicht, Sekundärstrukturen auf der Basis von Alignments der verschiedenen ITS-Typen zu ermitteln (Hofacker et al. 2002). Die relative Stabilität der ITS-Sekundärstrukturen soll Aufschluss darüber geben, ob diese ITS-Typen Pseudogene (degenerierte Sequenzen) enthalten, die die Ergebnisse des Haplotypennetzwerkes verfälschen könnten.

7.1.2. Phylogenien auf der Basis von nrITS-1 und atpB-rbcL-IGS- Sequenzen

Durch die oben erwähnten Schwierigkeiten, die bei den phylogenetischen Rekonstruktionen mit ITS-Sequenzen auftreten können, erschien es sinnvoll, die Ergebnisse mit einem Chloroplastenmarker zu untermauern. Ich habe den *atp*B-*rbc*L intergenic spacer sequenziert, da Sequenzen der *mat*K- und der *trn*L-*trn*F-Region nur wenige Polymorphismen aufweisen (Matsumoto et al. 1998; Starr & Bruneau 2002). Die Auflösung der nrITS- und der *atp*B-*rbc*L-IGS-Phylogenie war auch in dieser Arbeit sehr niedrig. Der geringe Variabilität von geläufigen molekularen Markern in sehr nah verwandten Arten ist in vielen phylogenetischen Studien ein Problem (Ritz et al. 2003b). Möglicherweise können Analysen, die auf schneller evolvierenden Markern (z.B. Mikrosatellitensequenzen) beruhen, besser aufgelöste Phylogenien erzielen. Bei den pentaploiden *Caninae* wäre das mit einem erheblichen Aufwand durch Klonieren verbunden. Ich vermute, dass einerseits das junge Alter der Gruppe für die niedrige Variabilität der Marker verantwortlich ist und andererseits die intrasektionelle Hybridisierung der *Caninae* eine divergente Markerevolution behindert.

7.1.3. Morphologische Analyse der intrasektionellen Hybriden der Caninae

Experimentell hergestellte Wildrosenhybriden sind schwierig zu untersuchen, da mehrere Jahre verstreichen, ehe die Hybriden sich zum ersten Mal reproduzieren und ein entsprechend großes Versuchsfeld zum Aufpflanzen der Sträucher notwendig ist. Dadurch war die Anzahl der untersuchten Hybriden leider sehr gering. Morphologische Untersuchungen an Hundsrosenhybriden wurden von Dingler (1908), Hurst (1928), Gustafsson (1944), Feuerhahn & Spethmann (1995), Werlemark et al. (1999) und Werlemark & Nybom (2001) durchgeführt. Aspekte zur L/D-Typ-Merkmalsvererbung wurden lediglich von Gustafsson (1944) tangiert. Ich habe in meinen Untersuchungen an der Hybridsammlung von Wissemann & Hellwig (1997) den Schwerpunkt auf die den L/D-Typ bestimmenden Merkmale Kelchblattpersistenz und Griffelkanaldurchmesser gelegt, weil diese Merkmale zu den bedeutendsten in der Hundsrosentaxonomie gehören (Henker 2000). Es war nicht möglich, den Griffelkanaldurchmesser der Hybriden direkt mit dem der Eltern*individuen* zu vergleichen, da diese sich an den Originalfundorten befinden und teilweise nicht mehr existieren. Ich konnte die Griffelkanaldurchmesser und das Verhalten der Kelchblätter nach dem Abblühen nur auf die Eltern*arten* beziehen, daher ist es nicht zulässig, die Heritabilität dieser Merkmale zu bestimmen (Falconer & Mackay 1975). Hinzu kommt, dass ich über die genetische Konstitution der Eltern keine Information habe. Die Eltern entsprechen nicht den bei Züchtern üblichen reinen Linien, sondern wurden nach dem taxonomischen Konzept von Klášterský (1969) den Arten zugeordnet. Solche reinen Linien zu erzeugen würde Jahrzehnte dauern.

7.1.4. Phylogenetische und ökologische Untersuchungen der Rosenroste

Ich habe drei unterschiedliche Rosenarten auf ihren Rostbefall untersucht, um festzustellen, ob eine ökologische Nischendifferenzierung innerhalb der Rosenroste auf ihre Wirte besteht. Ich habe die vorkommenden Roste bestimmt, aber die Befallsdichte der Roste nicht berücksichtigt. Angaben wie z.B. die Anzahl der Pusteln pro Blättchen geben ein differenzierteres Bild über eine Nischendifferenzierung der Roste. Solche Dichtezählungen sind aber schwierig zu standardisieren. Die Pusteln sind unterschiedlich groß, und Aecio-, Uredo- und Basidiosporen können gleichzeitig vorkommen. Hinzu kommt, dass die von Rost befallenen Rosen, vor allem *Rosa canina*, ihre Blätter schon im Hochsommer abwerfen und danach erneut austreiben.
Die D1/D2-Region der nrLSU (nuclear ribosomal large subunit) wird häufig zur phylogenetischen Analyse von Pilzen verwendet (Berres et al. 1995; Begerow et al. 1997; Weiss & Oberwinkler 2001) und hat sich auch für die Rostpilze (Uredinales) als gut geeignet erwiesen (Maier et al. 2003). Ein Anteil polymorpher Positionen von bis zu zehn Prozent zwischen einzelnen *Phragmidium*-Arten wurde innerhalb der Rostpilze bisher noch nie beobachtet (Maier et al. 2003). Die ITS-Region ist vermutlich noch variabler, aber ihre Amplifikation ist bisher nicht gelungen. Um das Vorhandensein von subspezifischen Stämmen innerhalb der Rostarten zu untersuchen, sind populationsgenetische Analysen mit AFLPs am besten geeignet. Dieser Ansatz scheitert im Moment daran, dass die Kultivierung von Rosten extrem schwierig ist und Basidiosporen aufgrund der Rekombination nicht verwendet werden können

7.2. Der hybridogene Ursprung der *Caninae*

Bereits Täckholm (1920, 1922) hat nach seiner Entdeckung der Canina-Meiose den hybridogenen Ursprung der *Caninae* postuliert. Diese Hypothese wurde später von den meisten Rhodologen übernommen (Keller 1931; Gustafsson & Håkansson 1942; Fagerlind 1948; Stebbins 1951; Zielinski 1985). Sequenzdaten ribosomaler DNA lieferten den ersten molekulargenetischen Nachweis der Allopolyploidie der *Caninae* (Wissemann 1999, 2000a, 2002). Wissemann identifizierte vier verschiedene nrITS-1-Typen (A-, B-, C-, E-Typ), die die einzelnen Genome repräsentieren. Der ITS-C-Typ wurde bisher nur in Vertretern der *Caninae* gefunden. In der vorliegenden Arbeit wurden diese Ergebnisse bestätigt (Manuskript I: Ritz et al. 2005). Die von Wissemann identifizierten ITS-Typen haben auch mit einer deutlich größeren Stichprobe sowohl innerhalb der *Caninae* als auch der gesamten Gattung *Rosa* Bestand. Alle untersuchten Arten der *Caninae* und der *Gallicanae* (*Rosa*) zeigten nicht-konzertierte ITS-Evolution und beinhalteten bis zu drei verschiedene ITS-Typen pro Individuum. Wissemann (1999, 2000a, 2002) fand sogar vier verschiedene ITS-Typen in einer pentaploiden Hundsrose und widerlegt damit die Hypothese von Gustafsson & Håkansson (1942), die die *Caninae* aufgrund ihrer Kreuzungsexperimente für interne Autotriploide hielten.
Im Gegensatz zu den *Caninae* lag bei den Arten der übrigen Sektionen *Banksianae*, *Bracteatae*, *Carolinae*, *Cinnamomeae*, *Indicae*, *Laevigatae*, *Pimpinellifoliae* und

Synstylae, sowie bei den Subgenera *Hesperhodos* COCKERELL, *Hulthemia* (DUMORT.) FOCKE und *Platyrhodon* (HURST) REHDER kein Hinweis auf nicht-konzertierte ITS-Evolution vor. Diese Arten enthalten jeweils nur einen ITS-Typ. Ich habe diese Typen, um die Verbindung zu den korrespondierenden Artengruppen zu verdeutlichen, nach der bekanntesten diploiden Rosenart mit dem jeweiligen Typ benannt. Der A-Typ wurde als *woodsii*-, der B-Typ *gallica*- und der C-Typ *canina*-Typ bezeichnet. Der E-Typ spaltet sich in den *wichurana*- und den *rugosa*-Typ. Die *Caninae* können den *canina*-, den *gallica*-, den *woodsii*- und den *rugosa*-Typ enthalten, der *wichurana*-Typ wurde bei meinen Untersuchungen in keiner Hundsrose gefunden. In dieser Arbeit wurde bestätigt, dass der *canina*-Typ (ITS-C-Typ) ausschließlich auf Hundsrosen beschränkt ist. Er ist bei keiner der hier untersuchten diploiden Rosen gefunden worden. Daraus ergibt sich die mögliche Erklärung, dass die diploiden bzw. autopolyploiden Vorfahren der *Caninae* ausgestorben sind. Die Existenz der Ur-*Caninae* bzw. Prae-*Caninae* wurde bereits von Täckholm (1920, 1922) und Zielinski (1985) angenommen. Die Frage, ob die Ur-*Caninae* tatsächlich ausgestorben sind, kann nicht eindeutig beantwortet werden, da hier nur Vertreter der *Caninae* aus Mitteleuropa untersucht worden sind. Es ist theoretisch möglich, dass z.B. in Vorderasien, einem rhodologisch kaum erforschten Verbreitungszentrum der *Caninae*, noch Hundsrosenvorläufer vorkommen können. Abgesehen davon deuten die hier gewonnenen ITS-Daten auf mehrfache Hybridisierung der Ur-*Caninae* mit den Vorfahren verschiedener Rosenarten anderer Sektionen hin. Diese Hybridisierungsereignisse haben entsprechend der Verbreitung der *Caninae* vermutlich im europäisch-vorderasiatischen Raum stattgefunden. Aus dem gleichen Grund ist weiterhin anzunehmen, dass die anderen Hybridisierungspartner unter den Vorfahren heutiger *Cinnamomeae*, *Gallicanae*, *Pimpinellifoliae* oder *Synstylae* zu suchen sind.

Täckholm (1920, 1922), Keller (1931) und Gustafsson & Håkansson (1942) nahmen an, dass die *Caninae* mehrfach entstanden sind. Täckholm (1920, 1922) wie auch Gustafsson & Håkansson (1942) gehen von separaten Hybridisierungsereignissen für jede in den *Caninae* vorkommende Ploidiestufe (tetra, penta- und hexaploid) aus. Für diese Autoren resultiert die Canina-Meiose aus den Homologieverhältnissen der Hybridgenome. Fagerlind (1948) wies als erster darauf hin, dass die Canina-Meiose von einem Genkomplex gesteuert sein muss und nicht auf die Asyndeseverhältnisse der beteiligten Genome zurückzuführen ist. Seiner Meinung nach sind alle Rosengenome stark autogenomatisch, d.h. alle sind homolog zueinander. Unter diesem Gesichtspunkt scheint eine polyphyletische Entstehung der komplexen Canina-Meiose unwahrscheinlich.

Zielinski (1985) vermutet, dass ein diploides Ur-*Caninae*-Genom für die Canina-Meiose verantwortlich ist. Die nrITS-Daten von Wissemann (1999, 2000a, 2002) und die Mikrosatellitendaten von Nybom et al. (2004) bestätigen, dass ein intern diploider Chromosomensatz in Hundsrosen vorkommt. Wissemann (1999, 2000a, 2002) und ich (Manuskript I: Ritz et al. 2005) fanden jeweils nur maximal vier verschiedene ITS-Typen und Nybom et al. (2004) identifizierten lediglich vier Allele eines Mikrosatellitenmarkers in pentaploiden Hundsrosen. Nybom et al. (2004) zeigten anhand von Mikrosatellitenmarkern, dass die Chromosomenpaarung zwischen zwei stark homologen Genomen stattfindet und dass eines dieser Genome vom Pollen stammt, d.h. die Genome *en block* vererbt werden wie von Hurst (1925) angenommen. Es ist wahrscheinlich, dass es

sich bei diesen Genomen um das vom *canina*-ITS-Typ repräsentierte diploide Ur-*Caninae*-Genom handelt. Allerdings wurden bisher die ITS-Typen in einem Individuum nicht quantitativ kloniert, um ihre relative Häufigkeit abzuschätzen. Widersprüchlich zu diesen Befunden ist, dass, wenn nur das Ur-*Caninae*-Genom an der Bivalentenbildung beteiligt ist und die Hybridgenome ausschließlich Univalente formen, diese Univalente stets in vollständigen Sätzen vorliegen. Wieso bleiben die Hybridgenome vollständig erhalten, obwohl in Rosen aneuploide Reihen absolut selten sind? Eigene unveröffentlichte Untersuchungen zur genetischen Konstitution von Einzelpollenkörnern zeigen, dass sich nicht ausschließlich der *canina*-ITS-Typ sondern alle möglichen in Hundsrosen vorkommenden ITS-Typen in den Pollenkörnern befinden. Nach den oben genannten Ergebnissen von Nybom et al. (2004) ist zu erwarten, dass die Pollenkörner mit dem *canina*-ITS-Typ einen Selektionsvorteil gegenüber Pollenkörnern mit anderen ITS-Typen haben, und nur sie die Eizellen befruchten. Leider konnten meine Ergebnisse aufgrund von methodischen Schwierigkeiten der Einzelzell-PCR bisher nicht reproduziert werden.

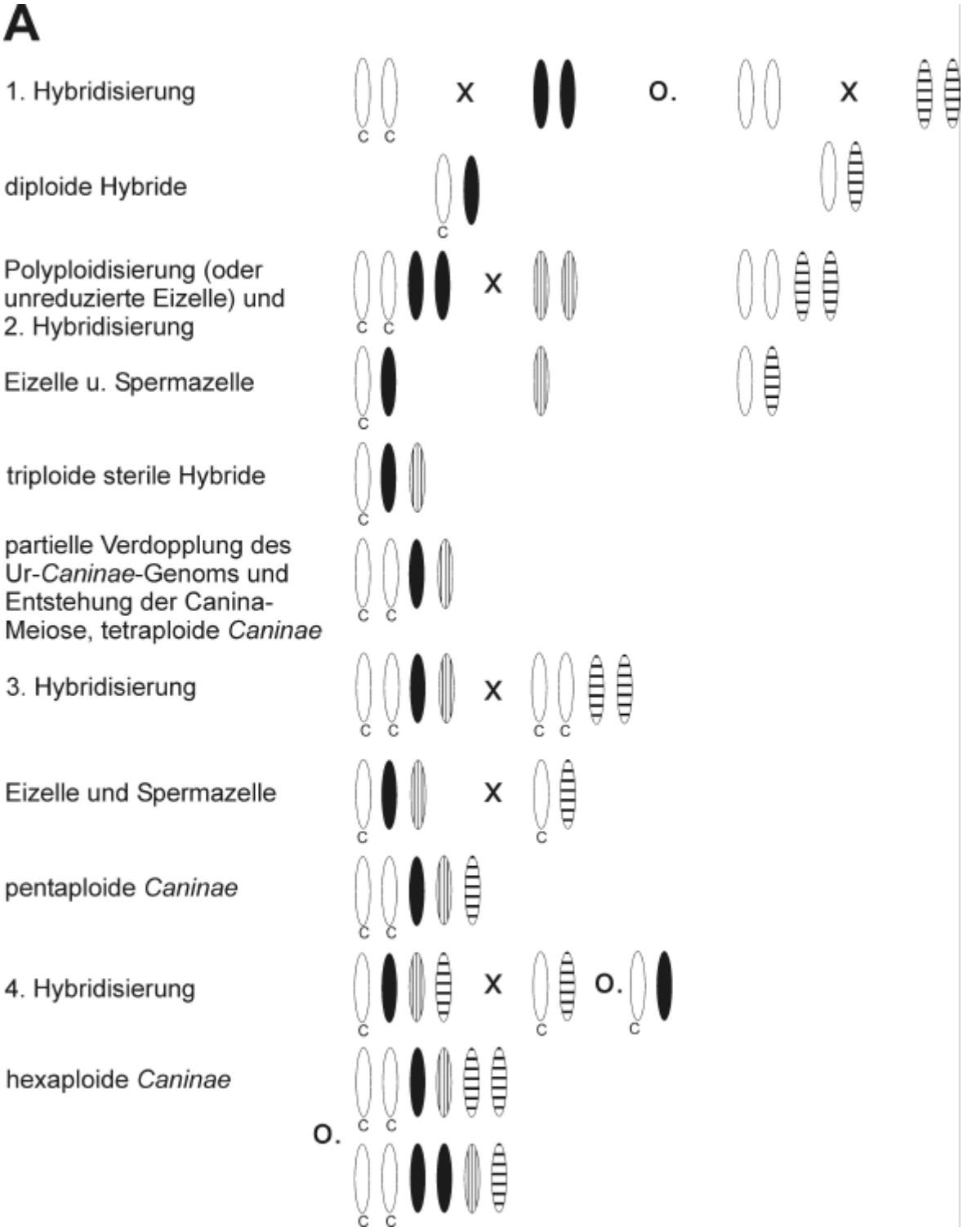
Zielinskis Hypothese über ein die Canina-Meiose regulierendes diploides Ur-*Caninae*-Genom wird durch die Befunde von Wulff (1954) untermauert. Wulff (1954) beobachtete das spontane Auftreten einer canina-ähnlichen Meiose während der Mikrosporogenese in der diploiden intersektionellen Hybride *Rosa* x *ruga* (*Rosa arvensis* x *R. chinensis*). Wulff entdeckte, dass die Pollenmutterzellen einer Blüte spontan zur pentaploiden Stufe polyploidisierten und dann haploide Pollenkörner gebildet wurden. Er erklärte diesen Vorgang durch partielle Endomitose des diploiden Hybridgenoms. Seiner Meinung nach hat sich das *arvensis*-Genom, das den *Caninae* phylogenetisch nahe steht zweimal verdoppelt, während das *chinensis*-Genom ungeteilt blieb. Möglicherweise gibt es einen regulierenden Genkomplex, der beim Eintreten der Meiose angeschaltet wird und der partielle Endomitose und Asyndese auslöst, wie Blackhurst (1948), Fagerlind (1948) und Wulff (1954) vermuten. Wulff (1954) schloss aus diesen Beobachtungen, dass eventuell sogar rein diploide Arten wie z.B. *Rosa arvensis* unter bestimmten Umständen befähigt sind, die Canina-Meiose zu entwickeln. Der *Caninae*-Komplex ist demzufolge mehrfach mutativ und nicht hybridogen entstanden (Wulff 1954). Wie oben erwähnt, weisen alle molekularen Daten auf den hybridogenen Ursprung der Hundsrosen hin (Wissemann 1999, 2000a, 2002, Nybom et al. 2004, Manuskript I: Ritz et al. 2005).

Auch nach Zielinskis Überlegungen entsteht die Canina-Meiose in einer autotetraploiden Ur-*Caninae* (Zielinski 1985). Erst danach begannen die Ur-*Caninae*, durch Hybridisierung Genome von Nicht-*Caninae* aufzunehmen. Diese Hybridisierungsereignisse fanden mehrmals unabhängig voneinander und mit verschiedenen Hybridisierungspartnern statt. Die Introgression fremder Genome umfasste für tetraploide Arten maximal zwei, für pentaploide Arten maximal drei und für hexaploide Arten maximal vier Chromosomensätze, da für die Ausprägung der Canina-Meiose ein diploider Satz Ur-*Caninae*-Genome notwendig ist. Danach sind die *Caninae* mit Hybridgenomen „gesättigt", das heißt, sie können nur noch von Spermazellen mit dem Ur-*Caninae*-Genom befruchtet werden, um den internen diploiden Zustand und damit die Canina-Meiose aufrechtzuerhalten. Allerdings bleibt unverständlich, unter welchem Selektionsdruck sich die Canina-Meiose in Autopolyploiden entwickelt hat und wieso diese keine Normal-Meiose beibehalten haben.

Die von Nybom et al. (2004) entwickelte Hypothese zur Evolution der *Caninae* beruht auf dem Entstehen einer interspezifischen triploiden Hybride. Diese Hybride verdoppelte durch partielle Endomitose das Ur-*Caninae*-Genom und war zur Canina-Meiose befähigt. Neben dieser Hypothese ist auch vorstellbar, dass eine diploide Ur-*Caninae* eine unreduzierte Eizelle bildete und mit einer allotetraploiden Nicht-Hundsrose hybridisierte. Die daraus hervorgegangene tetraploide Hybride enthält ein diploides Ur-*Caninae*-Genom und entwickelt die Canina-Meiose. Diese beiden Szenarien, bei denen eine Hybridisierung der Entstehung der Canina-Meiose vorangeht, erscheinen weitaus plausibler als Zielinskis (1985) Hypothese, da die Canina-Meiose den Ausweg aus der Hybridsterilität der Primärbastarde darstellt. Abbildung 2 zeigt schematisch, wie die verschiedenen Ploidiestufen der *Caninae* entsprechend dieser beiden Hypothesen entstanden sein könnten.
Alle bisher erwähnten Hypothesen zur Entstehung der *Caninae* beruhen auf der Existenz einer diploiden Ur-*Caninae.* Diese Hypothesen sind letztendlich nicht falsifizierbar, sondern nur verifizierbar, wenn eine diploide Ur-*Caninae* gefunden wird. Eine meiner Meinung unwahrscheinliche Alternativhypothese zum Vorhandensein einer diploiden Ur-*Caninae* ist die mutative Entstehung des *Caninae*-Genom in allopolyploiden Nicht-Hundsrosen. Ein Beispiel hierfür aus einer anderen Pflanzengruppe ist die mutative Entstehung von Mais aus Teosinte (Doebley 2004). Ähnlich den hypothetischen Ur-*Caninae* wurde auch für die Evolution der Gattung *Zea* L. die Existenz eines „Ur-Maises“ postuliert, den es jedoch wahrscheinlich nie gegeben hat.
Zielinski (1985) vermutet die Entstehung der *Caninae* im Spättertiär. Erst im Pleisto- und Holozän, nach dem Rückzug des Inlandeises, haben sich die Arten weiter verbreitet. Die meisten nacheiszeitlich radiierten polymorphen Sippen sind agamosperme Komplexe. Darlington (1932) und Fagerlind (1948) bezeichneten die *Caninae* als semiklonal und erklärten so den extremen, mit apomiktischen Sippen vergleichbaren Polymorphismus der Gruppe. Im Gegensatz zu den agamen Komplexen sind die *Caninae* funktionell diploid. Sie konnten durch ihre einzigartige Meiose die Hybridsterilität überwinden.

7.3. Schwestergruppen der Ur-*Caninae* und intrasektionelle Gliederung

Wie im vorhergehenden Kapitel dargestellt, konnte ich die Hypothese von Wissemann (1999, 2000a, 2002), dass der *canina*-ITS-Typ (C-Typ) ausschließlich in Hundsrosen vorkommt, bestätigen. Wissemann zufolge ist der *canina*-Typ daher geeignet, die phylogenetischen Beziehungen der *Caninae* zu untersuchen. In meiner Arbeit (Manuskript II: Wissemann & Ritz 2005) sind die *canina*-ITS-Typen von 14 Arten der Sektion *Caninae* in eine phylogenetische Rekonstruktion der gesamten Gattung *Rosa* eingeflossen. Diese auf Kernmarkern basierende Phylogenie wurde durch eine zweite Rekonstruktion mit dem Chloroplastenmarker *atp*B-*rbc*L IGS ergänzt. Beide Phylogenien sind sowohl innerhalb


A
1. Hybridisierung
diploide Hybride
Polyploidisierung (oder unreduzierte Eizelle) und 2. Hybridisierung
Eizelle u. Spermazelle
triploide sterile Hybride
partielle Verdopplung des Ur-Caninae-Genoms und Entstehung der Canina-Meiose, tetraploide Caninae
3. Hybridisierung
Eizelle und Spermazelle
pentaploide Caninae
4. Hybridisierung
hexaploide Caninae
C
X
O.

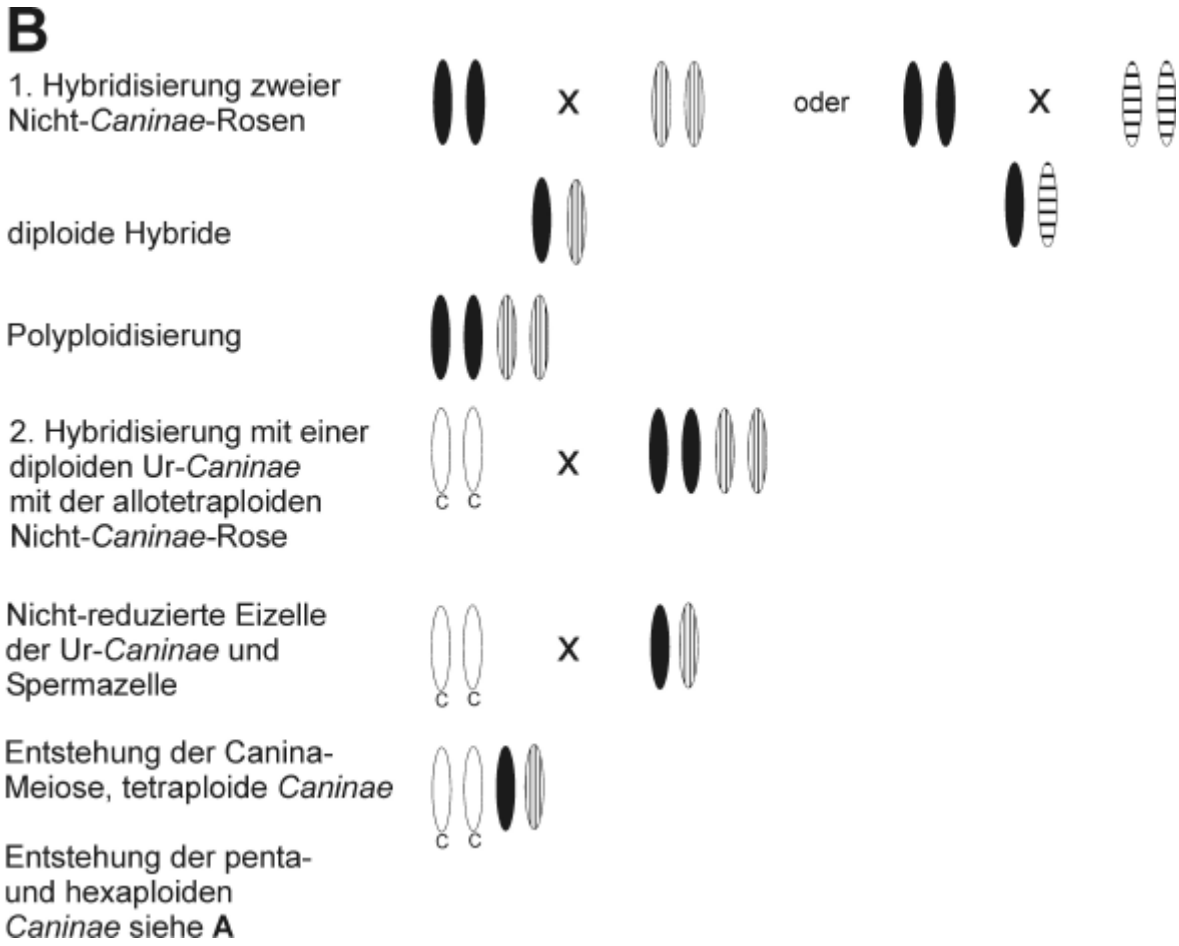


Abb. 2: Schema zur hypothetischen Entstehung der *Caninae* und der Canina-Meiose. Die Genome sind nur durch ein einzelnes Chromosom dargestellt. Das Ur-*Caninae*-Genom ist weiß und mit einem „C" gekennzeichnet. Die verschiedenen Nicht-*Caninae*-Genome sind durch unterschiedlich gemusterte Chromosomen dargestellt (schwarz, längs- und quergestreift). Das Ur-*Caninae*-Genom liegt in allen *Caninae* diploid vor und bildet die Bivalente in der Meiose (Nybom et al. 2004). **A:** Entstehung der *Caninae* ausgehend von einer interspezifischen triploiden Hybride, die die Canina-Meiose durch partielle Endomitose entwickelt (modifiziert nach Nybom et al. 2004, Manuskript I: Ritz et al. 2005). **B:** Entstehung der *Caninae* ausgehend von einer Hybridisierung einer unreduzierten Eizelle der *Caninae* und einer Spermazelle einer allotetraploiden Nicht-*Caninae*.

der Gattung *Rosa* als auch innerhalb der *Caninae* schlecht aufgelöst. Die bisher publizierten molekularen Phylogenien der Gattung *Rosa* lassen ebenfalls keine eindeutige Gliederung zu (*mat*K: Matsumoto et al. 1998 und Wu et al. 2001; *trn*L-*trn*F Region: Starr & Bruneau 2002; RFLP der Organellen-DNA: Matsumoto et al. 1997 und Matsumoto et al. 2000).

In der nrITS-Phylogenie erscheinen die Sektionen *Indicae* und *Synstylae* als Schwestergruppen zu den Hundsrosen, in der *atp*B-*rbc*L-Phylogenie erscheinen sie innerhalb der *Caninae*. Diese Ergebnisse widersprechen den morphologischen Daten. Die charakteristischen Merkmale der *Synstylae* und *Indicae,* ein verwachsenes Griffelbündel und ungeteilte Kelchblätter, treten in den *Caninae* nicht auf. Die monotypische Sektion

Rosa besitzt neben den *Caninae* als einzige geteilte Kelchblätter. Sie ist in der *atp*B-*rbc*L-Phylogenie innerhalb der *Caninae* zu finden, in der nrITS-Phylogenie ist sie jedoch eine Schwestergruppe von Vertretern der Sektionen *Pimpinellifoliae* und *Cinnamomeae*. Die *mat*K-Phylogenie von Matsumoto et al. (1998) weist auf eine enge Verwandtschaft der *Caninae*, *Synstylae*, *Indicae* und *Gallicanae (Rosa)* hin, da diese Sektionen als ein Monophylum erscheinen. Zielinski (1985) vermutete aufgrund von ihm nicht genannter morphologischer Merkmale, dass *Synstylae* und *Indicae* verwandtschaftlich *Rosa canina* nahe stehen.

Die Variabilität des *canina*-ITS-Typs ist nicht ausreichend, um die phylogenetischen Beziehungen innerhalb der *Caninae* aufzudecken. Die *Caninae* erscheinen in der *atp*B-*rbc*L-Phylogenie nicht als monophyletische Gruppe, sondern bilden ein Monophylum mit den Sektionen *Synstylae*, *Indicae* und *Rosa*. Das ist eher in der schlechten Auflösung des Markers begründet als in einer möglichen Polyphylie der *Caninae*. Der kernkodierte *canina*-ITS-Typ, der die Ur-*Caninae* repräsentiert, ist monophyletisch, und auch die Chloroplasten müssen von den Ur-*Caninae* stammen. Ich halte für sehr unwahrscheinlich, dass es mehrere verschiedene Gruppen von Ur-*Caninae* gegeben hat, die das komplexe System der Canina-Meiose mehrfach unabhängig voneinander entwickelten. Allerdings ist nichts darüber bekannt, von wie vielen Genen die Canina-Meiose gesteuert wird und wie viele Mutationsschritte nötig sind, um die Canina-Meiose zu ermöglichen. Da die Canina-Meiose während der der Mikro-und Megasporogenese auf sehr unterschiedliche Weise abläuft, gehe ich davon aus, dass es sich um es sich um ein komplexes Multigensystem handeln muss.

In der *atp*B-*rbc*L-Phylogenie werden die Arten der *Caninae* in Vertreter mit duftlosen Drüsen (Subsektion *Caninae*, Subsektion *Trachyphyllae* H.CHRIST) und duftenden Drüsen (Subsektion *Rubigineae* H.CHRIST und *Vestitae* H.CHRIST) aufgespaltet. Die beiden zuletzt genannten Subsektionen unterscheiden sich durch den Besitz von fruchtig duftenden Drüsen (Subsektion *Rubigineae*) bzw. harzig duftenden Drüsen (Subsektion *Vestitae*). Sie erscheinen im Stammbaum aber nicht als getrennte Gruppen. Die geringe Variabilität der DNA-Marker innerhalb der *Caninae* ist einerseits durch ihr vermutlich geringes Alter verständlich. Andererseits können ständige intrasektionelle Hybridisierungsereignisse eine divergente Evolution der *Caninae* verhindern. Im folgenden Kapitel zeige ich, dass die intrasektionelle Hybridisierung in den *Caninae* tatsächlich eine bedeutende Rolle gespielt hat und eventuell gegenwärtig noch spielt.

7.4. Intrasektionelle Hybridisierung der *Caninae* und Merkmalsvererbung

Die Merkmalsvererbung in den *Caninae* ist matroklin, da bei den pentaploiden Arten 4/5 der kernkodierten Erbinformation von der Eizelle und nur 1/5 von der Spermazelle stammt. Die Auswirkung dieser Matroklinie habe ich an künstlich hergestellten intrasektionellen Hybriden der *Caninae* untersucht (Manuskript III: Ritz & Wissemann 2003a). Wie zu erwarten, verhielten sich die Mehrzahl der morphologischen Merkmale entsprechend dem oben genannten Schema. Alle Kreuzungen prägten hinsichtlich der Blattbehaarung, der Bedrüsung der Blätter und Fruchtstiele ausschließlich maternale Merkmale aus. Matrokline

Merkmalsausprägung stellte Wissemann (2000b) außerdem bei epikutikulären Wachsstrukturen, Werlemark et al. (1999) bei Fruchtknoten- und Kelchblattgröße, Kelchblattserratur und RAPD-Markern sowie Nybom et al. (2004) bei Mikrosatellitenmarkern fest.

Unerwartet war die Beobachtung, dass die den L/D-Typ bestimmenden Merkmale Kelchblattpersistenz und Durchmesser des Griffelkanales rein paternal vererbt wurden. In reziproken Kreuzungen zwischen einem L- und D-Typ-Elter wurde ausschließlich der paternale Merkmalszustand vererbt. Beispielsweise bringt ein Pollenelter mit engem Griffelkanal und abfallenden Kelchblättern Nachkommen mit engem Griffelkanal und abfallenden Kelchblättern hervor. Gustafsson (1944) beobachtete das gleiche Phänomen, zog aber keine Schlussfolgerungen zur Merkmalsvererbung. Dieses Vererbungsmuster ist formalgenetisch nicht zu erklären. Die möglichen Ursachen sind ausführlich in Manuskript III: (Ritz & Wissemann 2003a) diskutiert.

Paternale Vererbung von morphologischen Merkmalen wurde auch von Werlemark & Nybom (2001) an der Kreuzung *R. rubiginosa* x *R. sherardii* DAVIES beobachtet. Leider hatten Werlemark & Nybom (2001) weder eine reziproke Kreuzung dieser Hybride zur Verfügung noch spielen die Merkmale Kelchblattpersistenz und Griffelkanaldurchmesser in ihrer Untersuchung eine Rolle.

Unsere Beobachtungen zur Vererbung von morphologischen Merkmalen wirken sich stark auf das taxonomische Konzept der Sektion aus. Das aktuelle taxonomische System beruht auf einem synthetischen Modell (Christ 1873), bei dem jede Rosenart durch eine Kombination verschiedener miteinander korrelierter Merkmale charakterisiert ist. In diesem Modell spielen die L/D-Typen-Merkmale eine zentrale Rolle. Die hier untersuchten Hybriden entsprechen mit ihrer Kombination aus maternal vererbten Merkmalen (Blattbehaarung und Blattbedrüsung) und paternal vererbten Merkmalen (Kelchblattpersistenz und Griffelkanaldurchmesser) bereits beschriebenen Arten. Beispielsweise ist die Hybride *R. rubiginosa* x *R. canina* anhand vegetativer Merkmale nicht von der Mutterpflanze *R. rubiginosa* zu unterscheiden, hat aber abfallende Kelchblätter und einen engen Griffelkanal. Diese Kombination trifft genau auf *R. micrantha* BORRER ex SMITH zu. Die reziproke Hybride *R. canina* x *R. rubiginosa* ist durch die selben morphologischen Merkmale gekennzeichnet wie *R. dumalis* BECHST. In Anbetracht der Tatsache, dass der Reproduktionserfolg der Hybriden sich nicht von „reinen“ Arten unterscheidet (Manuskript III: Ritz & Wissemann 2003a), sind selbst Hybriden zwischen L- und D-Typen im Feld nicht von beschriebenen Arten zu unterscheiden. Es bleibt offen, ob diese Hybriden *micrantha*-ähnlich aussehen oder ob *Rosa micrantha* tatsächlich eine intrasektionelle Hybride ist. Handelt es sich bei diesen Arten um in der Vergangenheit entstandene und mittlerweile etablierte Hybriden oder entstehen diese gegenwärtig immer wieder neu? Die Entstehung solcher Hybriden ist möglicherweise ein seltenes Ereignis, weil der Anteil fertiler Samen nach einem Hybridisierungsereignis gering ist (Wissemann & Hellwig 1997). Aufschluss über diese Fragestellung soll eine Mikrosatelliten- und AFLP-Analyse geben, die im Rahmen weiterführender Arbeiten durchgeführt werden.

Im folgenden Kapitel wird die Auswirkung der retikulaten Evolution auf die Rosenpathogene der Gattung *Phragmidium* erläutert.

7.5. Rostpilze auf Hundsrosen

Rostpilze (Uredinales) sind obligate Pflanzenparasiten und durch Koevolutions- und Kospeziationsprozesse streng an bestimmte Wirtsfamilien gebunden (Dietel 1904; Savile 1979, 1990).
Die Gattung *Phragmidium* ist nahezu ausschließlich auf Vertretern der Unterfamilie *Rosoideae* verbreitet. Um zu prüfen, ob die Diversität und Radiation der *Caninae* sich auch in ihren Parasiten widerspiegelt, wurden die drei in Deutschland häufigsten Hundsrosen: *Rosa canina*, *R. corymbifera* und *R. rubiginosa* auf Rostbefall untersucht. Diese drei Rosenarten unterscheiden sich vor allem durch die Behaarung der Blattflächen: *Rosa canina* hat kahle, *R. corymbifera* behaarte und *R. rubiginosa* drüsige Blätter.
Von den vier Rosten, die auf einheimischen *Caninae* vorkommen (Gäumann 1959), fand ich nur zwei Arten: *Phragmidium mucronatum* und *P. tuberculatum* (Manuskript IV: Ritz et al. im Druck). Die Roste parasitieren auf den drei Rosenarten gleichermaßen. Beide Arten befielen *R. canina* am stärksten und *Rosa rubiginosa* am schwächsten, und keiner der beiden Roste zeigte einen stärkeren Befall an einer Rosenart als der andere. Zwischen den Rosten ist keine Nischendifferenzierung hinsichtlich dieser Wirte nachweisbar. Ähnlich weite Wirtsspektren fanden auch Savile & Urban (1982) und Urban & Marková (1984) für den Grasrost *Puccinia graminis* PERS. EX PERS. Es bleibt ungeklärt, ob der geringe Befall von *R. rubiginosa* mit der starken Bedrüsung der Blätter zusammenhängt. Experimente, bei denen Blättchen der drei Rosenarten mit den Rosten infiziert wurden, schlugen aufgrund der niedrigen Infektionsrate fehl. Das weite Wirtsspektrum der Arten und die fehlende Nischendifferenzierung widersprechen der Kospeziationshypothese von Phragmidien und den *Caninae*. Der hybridogene Ursprung der *Caninae* und die vermutlich andauernde intrasektionelle Hybridisierung verwischen diese Prozesse. Hybridisierungsereignisse innerhalb der Wirte können Brücken für Parasiten bilden, die es ihnen ermöglichen, sowohl die Elternarten als auch die interspezifischen Hybriden zu befallen (Floate & Whitham 1993).
Die verwandtschaftlichen Beziehungen von *Phragmidium tuberculatum* und *Phragmidium mucronatum* wurden durch eine phylogenetische Analyse mit der D1/D2 Region der nrLSU-Sequenzdaten der Gattung *Phragmidium* analysiert. Das überlappende Wirtsspektrum (Gäumann 1959, Manuskript IV: Ritz et al. Im Druck) und die große morphologische Ähnlichkeit beider Roste (Sydow & Sydow 1915) lassen eine enge Verwandtschaft der Arten vermuten. Erstaunlicherweise befindet sich nur *Phragmidium mucronatum* in einer monophyletischen Gruppe von Rosenrosten. *Phragmidium tuberculatum* ist eine Schwestergruppe zu Rosten, die auf *Rubus* und *Sanguisorba* parasitieren. In der Evolution dieser Art hat wahrscheinlich einen Wirtswechsel von diesem Verwandtschaftskreis zur Gattung *Rosa* stattgefunden. Ähnliche Vorgänge wurden auch in anderen Vertretern der Uredinales nachgewiesen (Savile 1990; Roy 2001; Jackson 2004). Dieser Wirtswechsel verhindert ebenso wie die Hybridisierung der Wirte Kospeziation zwischen Rosten und Rosen.

7.6. Hybridisierung als Evolutionsfaktor in der Sektion *Caninae*

Hybridisierung spielt neben der Canina-Meiose in der Evolution der Hundsrosen eine zentrale Rolle. Zum einen ist der gesamte allopolyploide Caninae-Komplex hybridogen entstanden und zum anderen scheint Hybridisierung auch innerhalb der *Caninae* häufig zu sein. Die Canina-Meiose stellt einen funktionell diploiden Zustand der permanent pentaploiden Rosen her und ermöglicht die sexuelle Reproduktion und das Überwinden der Hybridsterilität. Die allopolyploide Entstehung der *Caninae* hat neue Genotypen hervorgebracht. Diese hatten nach dem Rückzug des Inlandeises einen Selektionsvorteil gegenüber ihren Eltern. Ihre rasante Ausbreitung zeigt sich in der extremen Dominanz der *Caninae* in der mitteleuropäische Rosenflora. Die divergierende Evolution der *Caninae* wird wahrscheinlich durch intrasektionelle Hybridisierung gestört. Die komplette morphologische Übereinstimmung von beschriebenen Arten mit experimentell erzeugten Hybriden lässt ein beträchtliches Ausmaß von intrasektioneller Hybridisierung in der Vergangenheit und/oder Gegenwart vermuten. Der Faktor Hybridisierung beeinflusst nicht nur die Evolution der *Caninae* selbst, sondern verhindert auch Kospeziationsprozesse zwischen Hundsrosen und Rostpilzen der Gattung *Phragmidium*.

Rosen der Sektion *Caninae* sind ein gutes Beispiel dafür, dass Hybridisierung ein bedeutender Evolutionsfaktor (Arnold 1997) und nicht nur ein Hintergrundgeräusch der Evolution ist. Erkenntnisse aus dem Bereich der Genomik bestätigen eindrucksvoll, dass Polyploidisierungen, die unter anderem auf Hybridisierungsereignisse zurückzuführen ist, eine bedeutende Rolle nicht nur in der jüngeren Evolution (Neopolyploidie) sondern auch in der frühen Evolution (Paläopolyploidie) der Angiospermen spielen (Otto & Whitton 2000; Wendel 2000; Simillion et al. 2002; Blanc & Wolfe 2004). Hybridisierung wurde und wird in der Systematik stiefmütterlich behandelt, weil sie mit den klassischen v. a. von Zoologen geprägten Artkonzepten in starkem Konflikt steht. Nach dem biologischen Artkonzept sind Arten komplett reproduktiv isoliert und dürfen keine fertilen Nachkommen bilden (Dobzhansky 1937; Mayr 1942). Das phylogenetische Artkonzept basiert auf einer divergenten Evolution durch Aufspaltung von Arten, Retikulation ist nicht definiert (Hennig 1966; Cracraft 1989). Hybridisierung ist nicht zwangsläufig eine Nebenerscheinung nicht-abgeschlossener divergenter Evolution von Arten. Hybriden sind auch *per se* nicht weniger fit als ihre Elternarten. Die Evolution der *Caninae* zeigt beide Mechanismen: Hybridisierung ist ein Evolutionsfaktor, der einerseits die Evolution der Canina-Meiose induziert hat und damit zur Entstehung der *Caninae* geführt hat. Andererseits verhindert Hybridisierung eine divergente Evolution innerhalb der *Caninae*.

8. Zusammenfassung

Die Sektion *Caninae* der Gattung *Rosa* (Hundsrosen) ist eine hochpolymorphe und taxonomisch schwierig zu erfassende Gruppe. Die *Caninae* sind durch ihr in der Natur einzigartiges Meiosesystem gekennzeichnet. Die sogenannte Canina-Meiose erhält den meist pentaploiden somatischen Zustand durch die Bildung von tetraploiden Eizellen und haploiden Spermazellen. Diese Heterogamie lässt eine hybridogene Entstehung der Gruppe vermuten. Tatsächlich sind die *Caninae* Allopolyploide, was molekulargenetisch anhand der nicht-konzertierten nrITS-Region nachgewiesen wurde. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die *Caninae* durch mehrfache Hybridisierung aus vermutlich ausgestorbenen Ur-*Caninae* und Rosen anderer Sektionen entstanden sind. Die bisherige Forschung deutet auf das Vorkommen eines diploiden Ur-*Caninae*-Genomes hin, das an der Bivalentenbildung in der Canina-Meiose beteiligt sein muss. Die diploiden Ur-*Caninae* bildeten wahrscheinlich durch Hybridisierung mit Nicht-*Caninae*-Rosen einen Primärbastard, der die Canina-Meiose entwickelte und sich dadurch aus der Hybridsterilität rettete. Dieser Primärbastard nahm durch nachfolgende Hybridisierungen weitere Genome von Nicht-*Caninae* auf.

Molekulare Phylogenien der *Caninae* sind wenig aufgelöst und lassen keine genaue Gliederung innerhalb der Hundsrosen zu. Die Phylogenie anhand des Chloroplastenmarkers *atp*B-*rbc*L intergenic spacer trennt die *Caninae* in Vertreter mit duftenden Drüsen und in drüsenlose Vertreter. Die geringe Variabilität der molekularen Marker ist einerseits durch das geringe Alter der Gruppe begründet. Außerdem verhindert wahrscheinlich intrasektionelle Hybridisierung eine divergierende Evolution des *canina*-ITS-Typs. Einen weiteren Hinweis auf das Vorkommen von intrasektioneller Hybridisierung liefert die morphologische Untersuchung zur Merkmalsvererbung an künstlich hergestellten Hundsrosenhybriden. Die vegetativen Merkmale Blattbedrüsung und Blattbehaarung werden erwartungsgemäß matroklin vererbt, da 4/5 des Genoms von der Eizelle stammen Die paternale Vererbung der taxonomisch bedeutsamen Merkmale Griffelkanaldurchmesser und Kelchblattpersistenz ist formalgenetisch nicht zu erklären. Durch dieses Vererbungsmuster sind bestimmte Hybriden morphologisch nicht von beschriebenen Hundsrosenarten zu unterscheiden und wahrscheinlich mit ihnen identisch.

Hybridisierung beeinflusst nicht nur die Evolution der *Caninae* selbst, sondern verhindert vermutlich auch Koevolutions- und Kospeziationsprozesse von Rostpilzen der Gattung *Phragmidium* und Hundsrosen. Die beiden Rosenroste *Phragmidium mucronatum* und *P. tuberculatum* zeigen keine Nischendifferenzierung innerhalb von drei ausgewählten Hundsrosenwirten. Trotz dieses überlappenden Wirtspektrums und der morphologischen Ähnlichkeit der Pilze ist nur *P. mucronatum* mit anderen Rosenrosten verwandt, während für die Evolution von *P. tuberculatum* ein Wirtswechsel von *Rubus* bzw. *Sanguisorba* (Rosoideae, Rosaceae) anzunehmen ist.

Summary

Roses of sect. *Caninae* (dogroses) are a morphologically highly diverse and taxonomically challenging taxon. They are characterised by a unique meiosis system, the so called canina-meiosis. The pentaploid somatic status of the *Caninae* is maintained by the fusion of tetraploid egg cells and haploid sperm cells. This permanent anorthoploidy is supposed to have originated by hybridisation. The investigations the non-concerted nrITS sequences gave evidence for the allopolyploidy of dogroses.

This study shows that the *Caninae* arose by multiple hybridisation events of extinct Proto-*Caninae* and roses of other sections. The results suggest the existence of a diploid Proto-*Caninae* genome, which forms the bivalents during meiosis. I hypothesize that a diploid Proto-*Caninae* hybridised with a non-dogrose. The resulting hybrid individual developed the canina-meiosis to overcome sterility. This hybrid received further non-dogrose genomes by ongoing hybridisation events.

Molecular phylogenies of the *Caninae* are poorly resolved and do not allow a subsectional classification. The phylogeny based on the chloroplast *atp*B-*rbc*L intergenic spacer subdivides the *Caninae* in two clusters, one containing glandular and the other eglandular species. The low sequence polymorphism is probably caused by the young age of the *Caninae*. Furthermore, divergent evolution of the *canina*-ITS-type is probably prevented by intrasectional hybridisation events.

A morphological analysis of character inheritance in artificial dogrose hybrids gave evidence for hybridisation events among dogrose species. The vegetative characters the presence of glands and hairs of leaves were according to the canina-meiosis maternally inherited. However, the taxonomically important traits: diameter of the orifice and the persistence of sepals were paternally inherited, which cannot be explained by formal genetics. This pattern of character inheritance results in the total morphological identity of certain dogrose hybrids and described species of the *Caninae*.

Hybridisation does not only influence the evolution of the *Caninae*, but also prevents coevolution and cospeciation processes of dogroses with rust fungi of the genus *Phragmidium.* The rose rusts *Phragmidium mucronatum* and *P. tuberculatum* do not show any niche differentiation within three different dogrose species. Despite the overlapping host range and the strong morphological resemblance of two rusts they have no sister group relationship in an nrLSU based phylogeny. *P. mucronatum* belongs to a core rust clade whereas the ancestor of *P. tuberculatum* is supposed to have undergone a host jump from *Rubus* or *Sanguisorba* (Rosoideae, Rosaceae).

9. Referenzen

Ainouche, M. L. & Bayer, R. J. (1997): On the origins of the tetraploid *Bromus* species (section *Bromus*, Poaceae): insights from internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA. *Genome* **40** (5): 730-743.

Alvarez, I. & Wendel, J. F. (2003): Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molec. Phylogenet. Evol.* **29** (3): 417-434.

Arnold, M. L. (1997): *Natural hybridization and evolution*. Oxford University Press, New York, Oxford.

Bailey, C. D., Carr, T. G., Harris, S. A. & Hughes, C. E. (2003): Characterization of angiosperm nrDNA polymorphism, paralogy, and pseudogenes. *Molec. Phylogenet. Evol.* **29** (3): 435-455.

Baker, J. G. (1869): Monograph of British roses. *J. Linn. Soc* **11**: 197-243.

Baldwin, B. G., Sanderson, M. J., Porter, M. J., Wojciechowski, M. F., Campbell, C. S. & Donoghue, M. J. (1995): The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Ann. Missouri Bot. Gard.* **82**: 247-277.

Begerow, D., Bauer, R. & Oberwinkler, F. (1997): Studies in heterobasidiomycetes - Part 141 - Phylogenetic studies on nuclear large subunit ribosomal DNA sequences of smut fungi and related taxa. *Can. J. Bot.* **75** (12): 2045-2056.

Berres, M. E., Szabo, L. J. & McLaughlin, D. J. (1995): Phylogenetic relationships in auriculariaceous basidiomycetes based on 25S ribosomal DNA sequences. *Mycologia* **87** (6): 821-840.

Blackburn, K. & Harrison, J. H. W. (1921): The status of the British rose forms as determined by their cytological behaviour. *Ann. Bot.* **35** (138): 159-188.

Blackburn, K. B. (1925): Chromosomes and classification in the genus *Rosa*. *Am. Nat.* **59**: 200-204.

Blackhurst, H. T. (1948): Cytogenetic studies on *Rosa rubiginosa* and its hybrids. *Proc. Am. Soc. Hortic. Sci.* **52**: 510-516.

Blanc, G. & Wolfe, K. H. (2004): Widespread paleopolyploidy in model plant species inferred from age distributions of duplicate genes. *Plant Cell* **16** (7): 1667-1678.

Campbell, C. S., Wojciechowski, M. F., Baldwin, B. G., Alice, L. A. & Donoghue, M. J. (1997): Persistent nuclear ribosomal DNA sequence polymorphism in the *Amelanchier* agamic complex (Rosaceae). *Molec. Biol. Evol.* **14** (1): 81-90.

Christ, H. (1873): *Die Rosen der Schweiz.* Verlag H. Georg, Basel.

Christ, H. (1884): Allgemeine Ergebnisse aus der systematischen Arbeit am Genus *Rosa*. *Bot. Centralbl. 5. Jahrgang, Bd. XVIII* **10** (23): 310-318.

Cracraft, J. (1989): Speciation and its ontology: the empirical consequences of alternative species concepts for understanding patterns and processes of differentiation. S. 28-59 in: Otte, D. & Endler, J. A. (Hrsg.) *Speciation and its consequences*. Sunderland, Sinauer.

Crépin, F. (1869): *Primitiae Monographiae Rosarum. Matériaux pour servir á l'histoire des roses (Fasc. 1).* Annot-Braeckman, Gand.

Crépin, F. (1892): Tableau analytique des roses européene. *Bull. Soc. Roy. Bot. Belgique* **31** (2): 66-92.

Darlington, C. D. (1932): *Recent advances in cytology*. Churchill, London.

De Candolle, A. P. (1825): *Prodromus systematis naturalis regni vegetabilis*. Treuttel & Würtz, Paris.

Déséglise, A. (1877): *Catalogue Raisonné ou énumération méthodique des espéces du genre rosier pour l'Europe, l'Asie et l'Afrique spécialment les Rosiers de la France et de l'Angleterre*. Librairie de Ch. Mentz, Genf.

Dietel, P. (1904): Betrachtungen über die Verteilung der Uredineen auf ihren Nährpflanzen. *Centralbl. Bakteriol. Parasitenk., 2. Abth.* **12**: 218-234.
Dingler, H. (1907): Versuch einer Erklärung gewisser Erscheinungen in der Ausbildung und Verbreitung der wilden Rosen. *Mitt. Naturwiss. Vereins Aschaffenburg* **6**: 1-38.
Dingler, H. (1908): Neuere Beobachtungen in der Gattung *Rosa*. *Bot. Jahrb.* **40**: 100-108.
Dobzhansky, T. (1937): *Genetics and the origin of species*. Columbia University Press, New York.
Doebley, J. (2004): The genetics of maize evolution. *Ann. Rev. Genet.* **38**: 37-59.
Eigner, A. (1993): Große Sorgen um *Rosa mollis* auf der Geltinger Birk. *Kieler Not. Pflanzenk. Schleswig. Holst.* **22**: 30-31.
Eigner, A. & Wissemann, V. (1999): *Rosa* x *mangii,* eine neue intersektionelle Hybride charakterisiert durch morphologische und genetische Untersuchungen. *Haussknechtia* **7**: 35-40.
Elder, J. F. (1995): Concerted evolution of repetitive DNA sequences in eucaryotes. *Quart. Rev. Biol.* **70** (3): 297-230.
Erlanson, E. W. (1929): Cytological conditions and evidence for hybridity in North American wild roses. *Bot. Gaz.* **87** (4): 443-506.
Erlanson, E. W. (1938): Phylogeny and polyploidy in *Rosa*. *New Phytol.* **37** (1): 72-81.
Fagerlind, F. (1940): Sind die Canina-Rosen agamospermische Bastarde? *Svensk. Bot. Tidskr.* **34**: 334-354.
Fagerlind, F. (1944): Kompatibilität und Inkompatibilität in der Gattung *Rosa*. *Acta Horti Berg.* **13**: 274-302.
Fagerlind, F. (1948): Die Bastarde der canina-Rosen, ihre Syndese- und Formbildungsverhältnisse. *Acta Horti Berg.* **14**: 7-37.
Fagerlind, F. (1951): Compatibility, Eu- and Pseudoincompatibility in the genus *Rosa*. *Acta Horti Berg.* **15**: 1-38.
Falconer, D. S. & Mackay, T. F. C. (1975): *Introduction to quantitative genetics*. Longman, London.
Feuerhahn, B. & Spethmann, W. (1995): Kreuzungen bei Wildrosenarten. *Gehölzforschung* **3**.
Floate, K. D. & Whitham, T. G. (1993): The hybrid bridge hypothesis - host shifting via plant hybrid swarms. *Am. Nat.* **141** (4): 651-662.
Gäumann, E. (1959): *Die Rostpilze Mitteleuropas mit besonderer Berücksichtigung der Schweiz.* Kommissionsverlag Buchdruckerei Büchler & Co., Bern.
Graham, G. G. & Primavesi, A. L. (1993): *Roses of Great Britain and Ireland*. Botanical Society of the British Isles, London.
Grant, V. (1971): *Plant speciation*. Columbia University Press, New York, London.
Gustafsson, A. (1944): The constitution of the *Rosa canina* complex. *Hereditas* **30**: 405-428.
Gustafsson, A. & Håkansson, A. (1942): Meiose in some *Rosa*-hybrids. *Bot. Not.* **95**: 331-343.
Henker, H. (2000): *Rosa*. S. 1-108 in: Weber, H. E. (Hrsg.) *Gustav Hegi Illustrierte Flora von Mitteleuropa*. Berlin, Parey Buchverlag. 4.
Hennig, W. (1966): *Phylogenetic systematics*. University of Illinois Press, Urbana.
Hofacker, I., Fekete, M. & Stadler, P. F. (2002): Secondary structure prediction for aligned RNA sequences. *J. Molec. Biol.* **319** (5): 1059-1066.
Hurst, C. C. (1925): Chromosomes and characters in *Rosa* and their significance in the origin of species. S. 534-558 in: Hurst, C. C. (Hrsg.) *Experiments in Genetics*. Cambridge, Cambridge University Press. XLVI.
Hurst, C. C. (1928): Differential polyploidy in the genus *Rosa* L. *Z. Indukt. Abstammungs-Vererbungsl.* **46**: 46-47.

Jackson, A. P. (2004): A reconciliation analysis of host switching in plant-fungal symbioses. *Evolution* **58**: 1909-1923.

Keller, R. (1931): Synopsis Rosarum spontanearum Europae mediae. *Denkschr. Schweiz. Naturf. Ges.* **65**.

Klásteršk?, I. (1969): Die Problematik des *Rosa canina* L. - Komplexes in der Tschechoslowakei. *Mitt. Bot. Linz, 1974,* **6** (1): 65-74.

Klásteršk?, I. (1968): *Rosa* L. S. 25-32 in: Tutin, T. G., Heywood, F. H., Burges, N. A., Valentine, D. H., Walters, S. M. & Webb, D. A. (Hrsg.) *Flora Europaea*. Cambridge, University Press. 2.

Linnaeus, C. (1753): *Species Plantarum*, Holmiae.

Ma, Y., IslamFaridi, M. N., Crane, C. F., Ji, Y., Stelly, D. M., Price, H. J. & Byrne, D. H. (1997): *In situ* hybridization of ribosomal DNA to rose chromosomes. *J. Hered.* **88** (2): 158-161.

Maier, W., Begerow, D., Weiß, M. & Oberwinkler, F. (2003): Phylogeny of the rust fungi: an approach using nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Can. J. Bot.* **81**: 12-23.

Matsson, R. (1912): Till fragan om rosornas befruktning. *Svensk Bot. Tidskr.* **6** (3): 589-606.

Matsumoto, S., Kouchi, M. & Fukui, H. (2000): Phylogenetic analyses of the subgenus *Eurosa* using the ITS nrDNA sequence. *Acta Hort.* **521**: 193-202.

Matsumoto, S., Kouchi, M., Yabuki, J., Kusunoki, M., Ueda, Y. & Fukui, H. (1998): Phylogenetic analyses of the genus *Rosa* using the *mat*K sequence: molecular evidence for the narrow genetic background of modern roses. *Sci. Hort.* **77**: 73-82.

Matsumoto, S., Wakita, H. & Fukui, H. (1997): Molecular classification of wild roses using organelle DNA probes. *Sci. Hort.* **68**: 191-196.

Mayr, E. (1942): *Systematics and the origin of species*. Columbia University Press, New York.

Millan, T., Osuma, F., Cobos, C. & Torres, A. M. (1996): Using RAPDs to study phylogenetic relationships in *Rosa*. *Theor. Appl. Genet.* **92**: 273-277.

Nybom, H., Carlson-Nilsson, U., Werlemark, G. & Uggla, M. (1997): Different levels of morphometric variation in three heterogamous dogrose species (*Rosa* Sect. *Caninae*). *Plant Syst. Evol.* **204**: 207-224.

Nybom, H., Esselink, G. D., Werlemark, G. & Vosman, B. (2004): Microsatellite DNA marker inheritance indicates preferential pairing between two highly homologous genomes in polyploid and hemisexual dog-roses, *Rosa* L. sect. *Caninae* DC. *Heredity* **92** (3): 139-150.

Otto, S. P. & Whitton, J. (2000): Polyploid incidence and evolution. *Ann. Rev. Genet.* **34**: 401-437.

Rehder, A. (1949): *Bibliography of cultivated trees and shrubs hardy in the cooler temperate regions of the northern hemisphere*. Otto Koeltz Science Publishers, Jamaica Plain, Massachusetts.

Reichert, H. (1998a): Beobachtungen und Versuche zur Fortpflanzung der Apfelrose, *Rosa villosa* L. (*R. pomifera* J.Herrmann). *Abh. Delattinia* **24**: 159-166.

Reichert, H. (1998b): Die zwei Wuchstypen bei Rosen der Sektion *Caninae* und ein Vorschlag für eine Kurzbezeichnung derselben. *Acta Rhodologica* **1**: 29-35.

Ritland, C. E., Ritland, K. & Straus, N. A. (1993): Variation in the ribosomal internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2) among 8 taxa of the *Mimulus-guttatus* species complex. *Molec. Biol. Evol.* **10** (6): 1273-1288.

Ritz, C. M., Maier, W. F. A., Oberwinkler, F. & Wissemann, V. (im Druck): Different evolutionary histories of two *Phragmidium* species infecting the same dogrose hosts. *Mycol. Res.*

Ritz, C. M., Schmuths, H. & Wissemann, V. (2005): Evolution by reticulation: European dogroses originated by multiple hybridization across the genus *Rosa*. *J. Hered.* **96**: 4-14.

Ritz, C. M. & Wissemann, V. (2003a): Male correlated non-matroclinal character inheritance in reciprocal hybrids of *Rosa* section *Caninae* (DC) Ser. (Rosaceae). *Plant Syst. Evol.* **241** (3-4): 213-221.

Ritz, C. M., Zimmermann, N. F. A. & Hellwig, F. H. (2003b): Phylogeny of subsect. *Meleuphorbia* (A.Berger) Pax & Hoffm. (*Euphorbia* L.) reflects the climatic regime in South Africa. *Plant Syst. Evol.* **241** (3-4): 245-259.

Roy, B. A. (2001): Patterns of association between crucifers and their flower-mimic pathogens: host jumps are more common than coevolution and speciation. *Evolution* **55** (1): 41-53.

Sang, T., Crawford, D. J. & Stuessy, T. F. (1995): Documentation of reticulate evolution in peonies (*Peonia*) using internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA - implications for biogeography and concerted evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92** (15): 6813-6817.

Savile, D. B. O. (1979): Fungi as aids in higher plant classification. *Bot. Rev.* **45** (4): 377-503.

Savile, D. B. O. (1990): Coevolution of Uredinales and Ustilaginales with vascular plants. *Rept. Tottori Mycol. Inst.* **28**: 15-24.

Savile, D. B. O. & Urban, Z. (1982): Evolution and ecology of *Puccinia graminis*. *Preslia* **54**: 97-104.

Schlotterer, C. & Tautz, D. (1994): Chromosomal homogeneity of *Drosophila* ribosomal DNA arrays suggests intrachromosomal exchanges drive concerted evolution. *Current Biol.* **4** (9): 777-783.

Schwertschlager, J. (1915): Beobachtungen und Versuche zur Biologie der Rosenblüte und Rosenbefruchtung. *Ber. Bayer. Bot. Ges.* **15**: 1-16.

Seringe, N. C. (1818): Allgemeine Betrachtungen über die Rosen. *Mus. Naturgesch. Helv. Bot. Abt.* **1**: 1-8.

Simillion, C., Vandepoele, K., Van Montagu, M. C. E., Zabeau, M. & Van de Peer, Y. (2002): The hidden duplication past of *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **99** (21): 13627-13632.

Soltis, P. S., Plunkett, G. M., Novak, S. J. & Soltis, D. E. (1995): Genetic variation in *Tragopogon* species - additional origins of the allotetraploids *T. mirus* and *T. miscellus* (Compositae). *Am. J. Bot.* **82** (10): 1329-1341.

Soltis, P. S. & Soltis, D. E. (1991): Multiple origins of the allotetraploid *Tragopogon mirus* (Compositae) - rDNA evidence. *Syst. Bot.* **16** (3): 407-413.

Starr, J. & Bruneau, A. (2002): Phylogeny of *Rosa* L. (Rosaceae) based on *trn*L-F intron and spacer sequences. 1. ASPT Colloquium: Rosaceae phylogeny: current knowledge, problems and prospects, http://www.2202.botanyconference.org/cgi-bin/new-view02.pl.

Stebbins, G. L. (1951): *Variation and evolution in plants*. Columbia University Press, New York.

Strasburger, E. (1904): Die Apogamie der Eualchemillen und allgemeine Gesichtspunkte, die sich aus ihr ergeben. *Jahrb. Wiss. Bot.* **41** (1): 88-161.

Suh, Y., Thien, L. B., Reeve, H. A. & Zimmer, E. A. (1993): Molecular evolution and phylogenetic implications of internal transcribed spacer sequences of ribosomal DNA in Winteraceae. *Am. J. Bot.* **80** (9): 1042-1055.

Sydow, P. & Sydow, H. (1915): *Monographia Uredinearum. Volumen III*. Gebrüder Borntraeger, Leipzig.

Täckholm, G. (1920): On the cytology of the genus *Rosa*. A preliminary note. *Svensk Bot. Tidskr.* **14** (2-3): 300-311.

Täckholm, G. (1922): Zytologische Studien über die Gattung *Rosa*. *Acta Horti Berg.* **7**: 97-381.

Urban, Z. & Marková, J. (1984): Ecology and evolution of *Puccinia graminis* Pers. *Cesk. Mykol.* **38** (65-95).

Vargas, P., McAllister, H. A., Morton, C., Jury, S. L. & Wilkinson, M. J. (1999): Polyploid speciation in *Hedera* (Araliaceae): Phylogenetic and biogeographic insights based on chromosome counts and ITS sequences. *Plant Syst. Evol.* **219**: 165-179.

Weiss, M. & Oberwinkler, F. (2001): Phylogenetic relationships in Auriculariales and related groups - hypotheses derived from nuclear ribosomal DNA sequences. *Mycol. Res.* **105**: 403-415.

Wendel, J. F. (2000): Genome evolution in polyploids. *Plant Molec. Biol.* **42** (1): 225-249.

Werlemark, G. (2000): Evidence of apomixis in hemisexual dogroses, *Rosa* section *Caninae*. *Sex. Plant Reprod.* **12** (6): 353-359.

Werlemark, G., Uggla, M. & Nybom, H. (1999): Morphological and RAPD markers show a highly skewed distribution in pair of reciprocal crosses between hemisexual dogrose species, *Rosa* sect. *Caninae*. *Theor. Appl. Genet.* **98**: 557-563.

Werlemark, G., Nybom, H., Olsson, A. & Uggla, M. (2000): Variation and inheritance in hemisexual dogroses, *Rosa* section *Caninae*. *Biotechnol. & Biotechnol. Eq.* **14**: 28-31.

Werlemark, G. & Nybom, H. (2001): Skewed distribution of morphological character scores and molecular markers in three interspecific crosses in *Rosa* section *Caninae*. *Hereditas* **134** (1): 1-13.

White, T. J., Lee, S. & J., T. (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. S. 315-322 in: Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. & White, J. W. (Hrsg.) *PCR protocols. A guide to methods and applications.* New York, Academic Press.

Wissemann, V. (1999): Genetic constitution of *Rosa* sect. *Caninae* (*R. canina, R. jundzilli*) and sect. *Gallicanae* (*R. gallica*). *J. Appl. Bot* **73**: 191-196.

Wissemann, V. (2000a): Molekulargenetische und morphologisch-anatomische Untersuchungen zur Evolution und Genomzusammensetzung von Wildrosen der Sektion *Caninae* (DC.) Ser. *Bot. Jahrb. Syst.* **122** (3): 357-429.

Wissemann, V. (2000b): Epicuticular wax morphology and the taxonomy of *Rosa* (section *Caninae*, subsection *Rubiginosae*). *Plant Syst. Evol.* **221**: 107-112.

Wissemann, V. (2002): Molecular evidence for allopolyploid origin in the *Rosa canina*-complex (Rosaceae, Rosoideae). *J. Appl. Bot.* **76**: 176-178.

Wissemann, V. (2003a): Conventional taxonomy of wild roses. S. 111-117 in: Roberts, A., Debener, T. & Gudin, S. (Hrsg.) *Encyclopedia of Rose Science*. London, Academic Press.

Wissemann, V. (2003b): Hybridization and the evolution of the nrITS spacer region. S. 57-71 in: Sharma, A. K. & Sharma, A. (Hrsg.) *Plant Genome: Biodiversity and evolution*. Enfield (USA), Science Publishers, Inc. 1 part A.

Wissemann, V. & Hellwig, F. H. (1997): Reproduction and hybridisation in the genus *Rosa* section *Caninae* (Ser.) Rehd. *Bot. Acta* **110**: 251-256.

Wissemann, V. & Hellwig, F. H. (1998): Ist die Pollenqualität in der Gattung *Rosa*, Sektion *Caninae* Indikator für eine hybridogene Entstehung dieser Sektion? *Acta Rhodologica* **1**: 43-50.

Wissemann, V. & Ritz, C. M. (2005): The genus *Rosa* (Rosoideae, Rosaceae) revisited: molecular analysis of nrITS-1 and *atp*B-*rbc*L intergenic spacer (IGS) versus conventional taxonomy. *Bot. J. Linn. Soc.* **147**: 275-290.

Wu, S., Ueda, Y., Nishihara, S. & Matsumoto, S. (2001): Phylogenetic analysis of Japanese *Rosa* species using DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacers (ITS). *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* **76** (2): 127-132.

Wulff, H. D. (1954): Über das spontane Auftreten einer Canina-Meiosis bei der Mikrosporogenese der diploiden *Rosa ruga* Lindl. *Oesterr. Bot. Z.* **101**: 539-557.

Zielinski, J. (1985): Studia nad rodzajem *Rosa* L. Systematyka sekcji *Caninae* DC. em Christ. *Arboretum Kórnickie Rocznik* **30**: 3-109.

Anhang

Abb. 1 (Manuskript I):

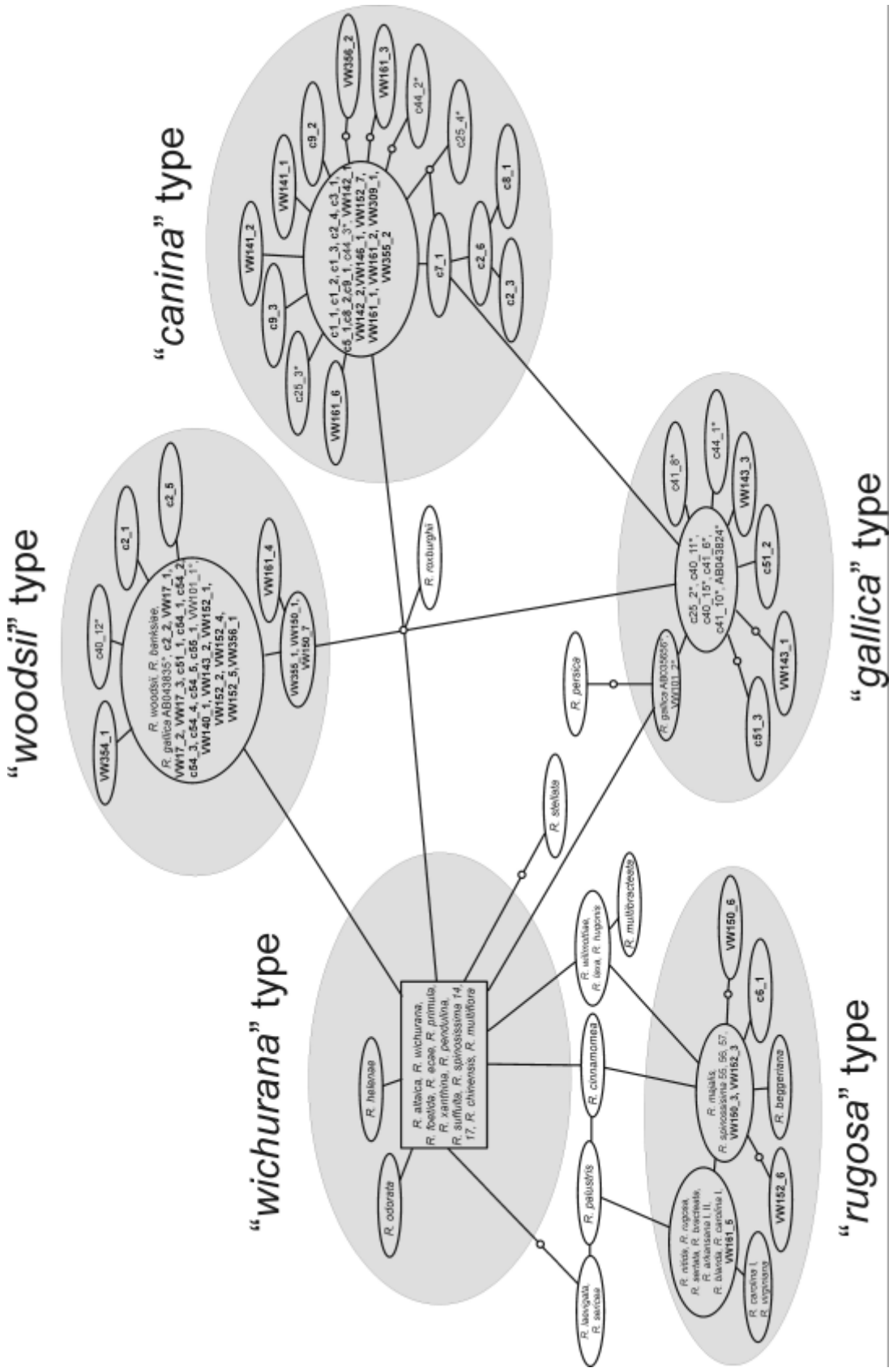
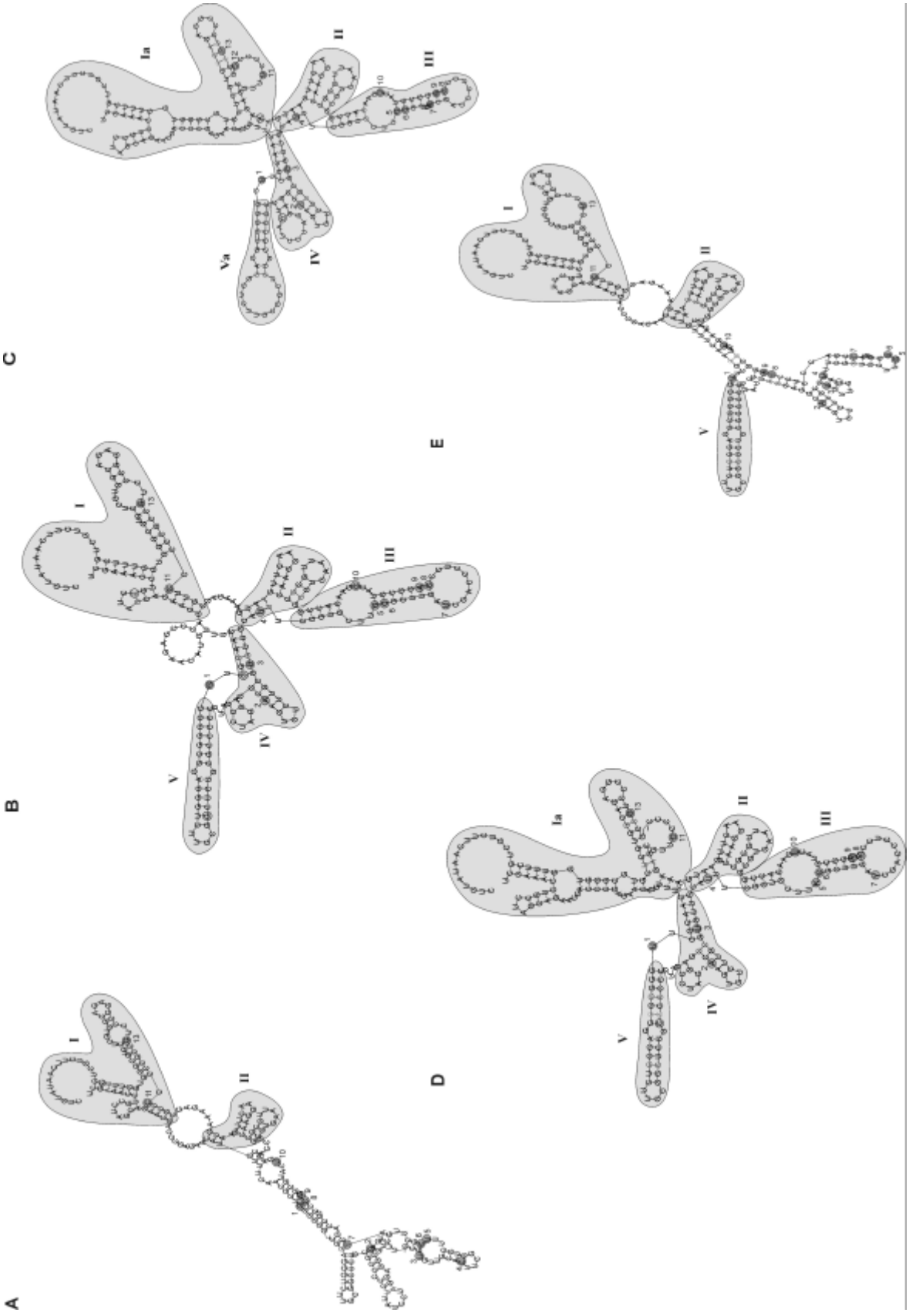


Abb. 3 (Manuskript I):



Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Spezielle Botanik unter Anleitung von Prof. Dr. F. Hellwig angefertigt.

Mein herzlichster Dank gilt:

Dr. Volker Wissemann für die Möglichkeit, in seinem DFG-Projekt arbeiten zu dürfen, für sein stets großes Interesse an meiner Arbeit, für die Einführung in die Hundsrosenproblematik und in die komplizierte Bestimmung der Pflanzen, für viele unentbehrlichen Ratschläge und spannende Diskussionen, für seine große Geduld sowie für jede Menge Tee, Kuchen und andere Aufmunterungen.

Prof. Dr. F. Hellwig dafür, dass ich im Institut für Spezielle Botanik arbeiten durfte, für viele anregende Diskussionen und Ratschläge und für die wissenschaftliche Motivation.

Prof. G. Theißen für die Möglichkeit in den Laboren des Lehrstuhls für Genetik die Klonierungen zusammen mit der unverzichtbaren Hilfe von Monika Völkel durchzuführen und dafür, dass er immer ein offenes Ohr für meine „Hundsrosensorgen“ hatte, und mir viele wertvolle Tipps und Anregungen vermittelt hat.

Prof. Dr. K. Bachmann und Heike Schmuths dafür, dass ich mit ihnen zusammen am IPK Gatersleben meine Sequenzdaten auswerten durfte und für das Korrekturlesen des Publikationsmanuskriptes und viele wertvolle Hinweise.

Prof. Dr. V. Hemleben dafür, dass ich sie in Tübingen besuchen konnte und sie sich Zeit genommen hat, mit mir über ITS-Evolution und Entstehung von Hundsrosen zu diskutieren und für die wertvollen Ratschläge, die daraus hervorgegangen sind.

Prof. Dr. F. Oberwinkler, für die Möglichkeit einen Teil der Rostsequenzierungen im Labor des Instituts für Spezielle Botanik / Mykologie in Tübingen durchzuführen und für viele wertvolle Ratschläge.

Wolfgang Maier, für die ausdauernde Hilfe bei den Laborversuchen für die Rostsequenzen, für die große Geduld und den Langmut bei der Korrektur unserer gemeinsamen Veröffentlichung, für sein exzellentes Auge zur Rostbestimmung, für viele tief greifende und anregende Diskussionen und für die herzliche Aufnahme und Unterbringung in Tübingen.

Dr. F. Eggeling für die Möglichkeit meine Einzellpollenkornversuche im Institut für Humangenetik in Jena durchzuführen. Susanne Michel und Bettina Schimmel für die unersetzliche Hilfe bei der Bedienung der wunderbaren Mikroskope.

Katrin Lehmann für die nette und lustige Begleitung auf unseren gemeinsamen Sammelreisen.

Nadine Drechsler und Rainer Melzer für engagierte ihre Hilfe beim Sequenzieren und Mikroskopieren.

Ludwig Martins und Jörn Hentschel für die anregenden Diskussionen über phylogenetische Rekonstruktion im Allgemeinen und „MrBayes“ im Speziellen.

Stefan Arndt für eine wirklich angenehme Zimmergemeinschaft, für viele gute Tipps und Ratschläge, und zwar nicht zur Promotion, für jede Menge Nervennahrung und viele schöne gemeinsame Familienwochenenden.

Sämtlichen Mitarbeitern des Instituts für das angenehme Arbeitsklima und für viele Hilfen und Anregungen

Prof. Dr. R. Gradstein für die Möglichkeit, die Hybridrosensammlung von Dr. V. Wissemann im Botanischen Garten in Göttingen unterzubringen und für die Möglichkeit dort zu arbeiten.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Finanzierung des Forschungsprojektes. „Radiation, Genese biologischer Diversität und Interaktion im Coevolutionssystem Rosen, Rostpilze, gallbildende Insekten“ (wi20/28-1) und damit für die Finanzierung meiner Stelle.

Dem Europarosarium Sangerhausen und der Rosensammlung Kassel-Wilhelmshöhe für die Bereitstellung von Pflanzenmaterial.

Der VDR-Stiftung Europarosarium Sangerhausen für die finanzielle Unterstützung der Laborarbeiten.

Den Mitgliedern des Arbeitskreises Wildrosenfreunde für die freundliche Unterstützung meiner Arbeit und für die Hilfe beim Auffinden geeigneter Hundsrosenpopulationen.

Meinen Eltern und meinem Bruder für ihr Verständnis und ihre Unterstützung.

Schließlich meinem Mann Markus für die geduldige Hilfe bei vielen statistischen Problemen, für sein stets geduldiges Zuhören und für seine vielen Ermutigungen und meiner Tochter Henriette für die nötige Ablenkung und Freude.

Lebenslauf

Name	Christiane Maria Ritz, geb. Scholz
Geburtsdatum	23.03.1978
Geburtsort	Karl-Marx-Stadt, jetzt Chemnitz
Familienstand	verheiratet, ein Kind

Schulbildung

1984-1992	Polytechnische Oberschule Fritz Schmenkel bzw. Oberschule Schönau in Chemnitz
1992-1996	Johann-Wolfgang-von-Goethe-Gymnasium in Chemnitz Abschluss: Abitur (Note: 1,0)

Universitätsausbildung

1996-2002	Biologie Studium (Biologie, Diplom) an der Technischen Universität Dresden
2001-2002	externe Diplomarbeit am Institut für Spezielle Botanik an der Friedrich-Schiller-Universität Jena mit dem Titel: „Molecular, morphological and anatomical investigations on the phylogeny of the *Meleuphorbia*-complex of the genus *Euphorbia* L.“ (Betreuer: Prof. F. H. Hellwig)
2002	Diplomabschluss (Note: 1,0)
2002-2005	Promotionsstudium am Institut für Spezielle Botanik der Friedrich -Schiller-Universität Jena mit dem Thema „Evolution von Wildrosen“

Berufstätigkeit

2002-2004	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Spezielle Botanik im DFG Projekt: „Evolution von Wildrosen I“ des DFG-Schwerpunktprogramms: Radiationen-Genese biologischer Diversität
April 2004- September 2004	Elternzeit
ab Oktober 2004	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Spezielle Botanik im DFG Projekt: „Evolution von Wildrosen II“ des DFG-Schwerpunktprogramms: Radiationen - Genese biologischer Diversität

Praktika

1999 Queen Sirikit Botanic Garden, Chiang Mai, Thailand (2 Monate)

2000 Illinois State University, Dept. of Biology, Evolutionary Systematics (Lab D. Byers), Illinois, USA (2 Monate)

Ort, Datum Christiane Ritz

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass mir die geltende Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist und ich die vorliegende Arbeit selbst angefertigt habe. Alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen habe ich in meiner Arbeit angegeben. Bei der Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes haben mich die in der Danksagung auf Seite 92 der Dissertation genannten Personen unterstützt. Ferner erkläre ich ehrenwörtlich, für die Anfertigung der Arbeit keinen Promotionsberater in Anspruch genommen zu haben, und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten zu haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Dissertation habe ich bisher nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung vorgelegt. Auch habe ich weder diese Dissertation noch eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht.

Jena, den 6. April 2005

Christiane Ritz