

# **Spontane Hybridisierung von Hundsrosen (*Rosa* Sekt. *Caninae*) – Häufigkeit und Konsequenzen**

**Dissertation  
zur Erlangung des  
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

Naturwissenschaftliche Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität  
Halle-Wittenberg

vorgelegt von

Herrn Veit Herklotz

Geb. am 15.10.1982 in Dresden

Gutachter:

1. Prof. Dr. Karsten Wesche
2. Prof. Dr. Martin Röser
3. Prof. Dr. Volker Wissemann

Halle (Saale), 23.10.2018  
Datum der Verteidigung

**Copyright**

Chapters 2.2 to 2.5 have been published in international journals. Only the publishers and the authors have the right for publishing and using the presented materials. Any re-use of the presented materials should require permissions from the publishers and the authors.

*»Was sich der Kerl nicht alles ausdenkt. Man is in einer Sorge mitm Divisionsgericht, und der Mistkerl da hat mir gestern, wie man uns zum Verhör geführt hat, lang und breit erklärt, was das is, die Rose von Jericho.«*

Jaroslav Hašek , Die Abendteuer des braven Soldaten Schwejk, Übers. Grete Reiner, Reinbek 1960 (dt. Erstausgabe 1926), S. 272

## Inhaltsverzeichnis

<i>Summary</i> .....	VIII
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>IX</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>X</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Polyploidie.....	1
1.2 Polyploidie und die Evolution der Angiospermen .....	4
1.3 Dynamik allopolyploider Genome.....	7
1.4 Polyploidie in Populationen .....	9
1.5 Das Modell Hundsrosen ( <i>Rosa</i> L. Sekt. <i>Caninae</i> (DC.) Ser.) .....	12
1.6 Zielstellung.....	15
<b>2 Kumulativer Abschnitt</b> .....	<b>17</b>
2.1 Übersicht zu den Manuskripten.....	17
2.2 <b>Manuskript I</b> .....	20
Herklotz, V., Ritz, C.M. (2017) Multiple and asymmetrical origin of polyploid dog rose hybrids ( <i>Rosa</i> L. sect. <i>Caninae</i> (DC.) Ser.) involving unreduced gametes. <i>Annals of Botany</i> 120, 209–220.	
2.3 <b>Manuskript II</b> .....	33
Herklotz, V., Mieder, N., Ritz, C. M. (2017) Cytological, genetic and morphological variation in mixed stands of dogroses ( <i>Rosa</i> L. sect. <i>Caninae</i> (DC.) Ser.) in Germany with a focus on the hybridogenic <i>R. micrantha</i> Sm. <i>Botanical Journal of the Linnean Society</i> 184, 254–271.	
2.4 <b>Manuskript III</b> .....	52
Herklotz, V., Kovařík, A., Lunerová, J., Lippitsch, S., Groth, M., Ritz, C. M. (2018) The fate of ribosomal RNA genes in spontaneous polyploid dogrose hybrids ( <i>Rosa</i> L. sect. <i>Caninae</i> (DC.) Ser.) exhibiting non-symmetrical meiosis. <i>The Plant Journal</i> 94, 77–90.	

---

2.5 <b>Manuskript IV</b> .....	67
Vogt, J.C., Herklotz, V., Ritz, C.M. (2015) Epigenetic Patterns in Genetically Imbalanced Polyploid Dog Rose Hybrids ( <i>Rosa</i> L. sect. <i>Caninae</i> (DC.) Ser.) Revealed by cDNA–Amplified Fragment Length Polymorphisms and Methylation-Sensitive Amplified Polymorphisms. <i>International Journal of Plant Sciences</i> , 176(5), 433–445.	
<b>3 Zusammenfassende Diskussion</b> .....	<b>81</b>
3.1 Evolution der Hundsrosen und Aspekte ihrer reziproken Entstehung .....	81
3.2 Die Canina-Meiose: Parental fixierte Vererbung oder hybridogen erweiterte Rekombination .....	87
3.3 Selektive Kompensation asymmetrischer Allopolyploidie .....	98
3.4 Taxonomie der Hundsrosen .....	102
3.5 Diskussion verwendeter Methoden .....	106
3.5.1 <i>Populationsgenetik und Morphometrie</i> .....	106
3.5.2 <i>Evolution ribosomaler DNA und Epigenetik</i> .....	111
<b>4 Ausblick</b> .....	<b>114</b>
<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>116</b>
<b>Danksagung</b> .....	<b>130</b>
<b>Erklärung über den persönlichen Anteil an den Publikationen</b> .....	<b>132</b>
<b>Lebenslauf</b> .....	<b>134</b>
<b>Eidesstattliche Erklärung</b> .....	<b>137</b>

## *Summary*

*Dogroses are allopolyploids with mostly odd somatic chromosome sets (5x) which are maintained by the fusion of monoploid sperm and tetraploid egg cells. During the unique canina-meiosis two chromosome sets form bivalents, while the remaining univalents were exclusively transmitted by the egg cell. It is supposed that dogrose species hybridise frequently among each other, however, genetic data were anecdotal so far. In this thesis, the frequency of hybrid formation between the subsection Caninae and Rubigineae as well as the genomic and transcriptomic consequences of these hybridisation events were investigated.*

*Based on microsatellites it could be demonstrated that hybrids between both subsections originated spontaneously in natural populations. However, hybrid establishment was biased towards the involvement of non-reduced egg cells of subsect. Rubigineae. These hybrids could morphologically differentiated to some extent by multivariate analyses.*

*The composition, inheritance and expression of ribosomal RNA genes (rDNA) in the subsections and their hybrids were studied with high-throughput sequencing and fluorescence in-situ hybridisation (FISH). Rosa canina (Caninae) contained predominantly Canina ribotypes, and co-localised 18S/5S rDNA loci occurred on bivalents; the rDNA of R. inodora (Rubigineae) was dominated by the Rubiginosa-type and co-localised 18S/5S rDNA loci occurred on univalents. These differences in rDNA composition support the hypothesis of polyphyletic formation of the subsections and thus of the canina-meiosis. The loci were additively inherited to the hybrids, however, the Canina type was dominantly expressed. The methylation and expression patterns were also mostly additively inherited to the hybrids, but organ-specific differences were detected.*

**Keywords:** *Rosa canina, canina-meiosis, hybridisation, polyploidy*

## Zusammenfassung

Hundsrosen sind Allopolyploide mit meist ungeradem somatischem Chromosomensatz ( $5x$ ), der durch die Verschmelzung monoploider Sperma- und tetraploider Eizellen aufrechterhalten werden kann. Während der einzigartigen Canina-Meiose bilden zwei Chromosomensätze Bivalente, die restlichen Univalente werden nur über die Eizellen weitergegeben. Es wird vermutet, dass Hundsrosenarten häufig miteinander hybridisieren, die Datengrundlage dazu ist aber anekdotisch. In dieser Arbeit wurde sowohl die Häufigkeit der Hybridbildung zwischen den Subsektionen *Caninae* und *Rubigineae* als auch die genomischen und transkriptomischen Konsequenzen dieser Hybridisierungsereignisse untersucht.

Anhand von Mikrosatelliten konnte dargestellt werden, dass Hybriden der beiden Subsektionen spontan in natürlichen Populationen entstehen, aber vor allem unter Beteiligung nicht-reduzierten Eizellen der *Rubigineae* gebildet wurden. Diese Hybriden konnten in multivariaten Analysen nur teilweise morphologisch differenziert werden.

Die Zusammensetzung, Vererbung und Expression ribosomaler RNA-Gene (rDNA) in den Subsektionen und ihrer Hybriden wurde mit Hochdurchsatzsequenzierungen und Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) untersucht. In *R. canina* (*Caninae*) dominierten Canina-Ribotypen und kolokalisierte 18S/5S rDNA Loci traten auf Bivalenten auf; die rDNA von *R. inodora* (*Rubigineae*) wurde vom Rubiginosa-Typ bestimmt und die kolokalisierten 18S/5S rDNA Loci befanden sich auf den Univalenten. Diese Unterschiede in der Zusammensetzung der rDNA unterstützen die Hypothese der polyphyletischen Entstehung der Subsektionen und damit auch der Canina-Meiose. Die Loci wurden additiv an die Hybriden vererbt, allerdings wurde der Canina-Typ dominant exprimiert. Die Methylierungs- und Expressionsmuster wurden ebenfalls zumeist additiv an die Hybriden vererbt, es traten aber organspezifische Unterschiede auf.

**Schlüsselwörter:** *Rosa canina*, Canina-Meiose, Hybridisierung, Polyploidie

## Abkürzungsverzeichnis

AFLP	<i>amplified fragment-length polymorphism</i>
agg.	Aggregat
AMOVA	<i>analysis of molecular variance</i>
bp	<i>base pair</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
FLI	Leibniz-Institut für Alternsforschung - Fritz-Lipmann-Institut
kb	<i>kilo base</i>
MAC-PR	<i>microsatellite allele counting peak ratios</i>
MRPP	<i>multiple response permutation procedures</i>
MSAP	<i>Methylation Sensitive AFLP</i>
NGS	<i>next generation sequencing</i>
NOR	<i>nucleolus organizer region</i>
<i>nrITS-1</i>	<i>nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
RAPD	<i>randomly amplified polymorphic DNA</i>
rDNA	ribosomale DNA
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
<i>s.l.</i>	<i>sensu lato</i>
<i>s.str.</i>	<i>sensu stricto</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
SSR	<i>simple sequence repeats</i>
TCT	Thymin-Cytosin-Thymin-DNA-Sequenz
WGD	<i>whole genome duplication</i>

# 1 Einleitung

## 1.1 Polyploidie

Polyploidie wird als wichtiges Merkmal der chromosomalen Evolution vieler eukariotischer Organismen angesehen (Otto & Whitton 2000; Mable 2003; Gregory & Mable 2005; Albertin & Marullo 2012). Neue Technologien zur Genomsequenzierung und die darauf aufbauenden bioinformatischen Analysen zeigten, dass *whole genome duplication* (WGD), also Polyploidie, teilweise mehrfach in der Evolutionsgeschichte vieler Eukaryoten vorkam (Amores *et al.* 1998; Postlethwait *et al.* 1998; Dehal & Boore 2005; Aury *et al.* 2006; Holland *et al.* 2008; Van de Peer *et al.* 2009; McGrath & Lynch 2012; Hollister 2015). Solche urzeitlichen Genomduplikationen werden auch als Paläopolyploidien bezeichnet. Diese evolutionär signifikanten WGDs sind weit verbreitet in Pflanzen und wurden auch in deren basalen Linien gefunden (Otto & Whitton 2000; Van de Peer *et al.* 2009, 2017; Jiao *et al.* 2011; Hollister 2015; Ruprecht *et al.* 2017). Rezente Polyploidien sind ebenfalls weit verbreitet und treten auf in Hefen (Campbell *et al.* 2016), Protisten (Sleigh 1991), Asco- und Basidiomyceten (Albertin & Marullo 2012; Campbell *et al.* 2016), Algen, Moosen, Farnen und höheren Pflanzen (Wyatt *et al.* 1988; Bischler & Boisselier-Dubayle 2000; Kapraun 2005; Wood *et al.* 2009; Husband *et al.* 2013), sowie in Wirbel- und wirbellosen Tieren (Dowling & Secor 1997; Gallardo *et al.* 1999; Gregory & Mable 2005).

Grant (1981) bezeichnete das Vorhandensein von drei oder mehr Chromosomensätzen in einem Organismus als Polyploidie. Der Zustand in welchem einzelnen Chromosomen oder Chromosomensegmente unter- oder überrepräsentiert sind, wird als Aneuploidie bezeichnet (Grant 1981). Polyploidie kann über verschiedene Wege entstehen:

(1) Somatische Genomduplikation kann in Pflanzen und Tieren auftreten und wird durch einen Fehler in der Mitose verursacht (Otto & Whitton 2000). Bilden

sich auf diesem Weg unterschiedliche Ploidiestufen in verschiedenen Zellen eines Organismus, wird dies als Endopolyploidie bezeichnet.

(2) Die Bildung nicht reduzierter Gameten (Keimbahnpolyploidie) gilt als primärer Mechanismus bei der Polyploidisierung in Tieren und Pflanzen (Harlan 1975; Dowling & Secor 1997; Ramsey & Schemske 1998; Brownfield & Köhler 2011; Mable *et al.* 2011; Albertin & Marullo 2012; Mason & Pires 2015). Fehler in der Meiose führen dabei zu Nicht-Reduktion der Gameten. Aus Fertilisation dieser  $2n$ -Gameten können polyploide Organismen hervorgehen. Wenn nicht reduzierte Keimzellen ( $1n = 2x$ ) mit haploiden ( $1n = 1x$ ) Gameten befruchtet werden, können triploide Nachkommen ( $2n = 3x$ ) entstehen. Alternativ können Triploidien auch ohne Beteiligung von nicht reduzierten Gameten ausgebildet werden, wenn Kreuzungen von diploiden ( $2n = 2x$ ) mit tetraploiden ( $2n = 4x$ ) Individuen stattfinden. Triploide Organismen sind, wenn sie lebensfähig sind, meist steril, da in der Meiose die Parallelkonjugation homologer Chromosomen gestört ist (Ramsey & Schemske 1998). Manche dieser Organismen vermögen sich apomiktisch (Winkler 1908) fortzupflanzen oder durch Rückkreuzung wieder diploide Nachkommen zu bilden. Apomixis nach Winkler (1908) umfasst Agamospermie, vegetative Vermehrung, Apogamie und Parthenogenese. Kadereit *et al.* (2014) fassen ebenfalls Agamospermie und vegetative Vermehrung unter Apomixis zusammen.

Die „triploide Brücke“ bezeichnet einen Prozess zur Bildung stabilisierter Tetraploider ( $2n = 4x$ ), bei dem die Produktion von nicht reduzierten Gameten Voraussetzung ist (Ramsey & Schemske 1998, 2002; Husband 2000). Zum einen ist bei der Entstehung eines triploiden Organismus aus diploiden Eltern die Fertilisation eines nicht reduzierten Gameten notwendig. Zum anderen muss dieser triploide Organismus selbst nicht reduzierte Gameten produzieren, welche wiederum mit einer haploiden Keimzelle fertilisiert werden. Der Weg über eine triploide Zwischenstufe wird von einigen Autoren als sehr bedeutend für die Etablierung von stabilen Polyploidien eingeschätzt (Harlan 1975; Ramsey & Schemske 1998; Husband 2004; Parisod *et al.* 2010). In Pflanzen wurden

viele verschiedene Mechanismen zur Bildung nicht reduzierter Gameten beobachtet (Brownfield & Köhler 2011; Mason & Pires 2015). Die Fertilisation nicht reduzierter Eizellen ist vielfach ursächlich für Polyploidisierung (Otto & Whitton 2000; Alves *et al.* 2001; Ramsey 2007). Genauso können aber auch nicht reduzierte Pollen bei Pflanzen vorkommen (Ramsey & Schemske 1998), wogegen diploide Spermazellen bei Tieren seltener erfolgreich sind (Otto & Whitton 2000; Mason & Pires 2015).

(3) Desweiteren konnte auch Polyspermie bei Tieren und Pflanzen beobachtet werden (Suarez *et al.* 1992; Ramsey & Schemske 1998; Otto & Whitton 2000; Vigfússon 2009; Toda & Okamoto 2016). Polyspermie ist die Fertilisation einer Eizelle durch mehrere Spermazellen, die zu lebensfähigen Polyploiden führen kann.

Bei Tieren führt Polyploidie häufig zu schweren Missbildungen oder zu nicht lebensfähigen Nachkommen, was unter anderem ein Folge von physiologisch bedingten Störungen in der Embryogenese ist (Mable 2004). Bereits Muller (1925) merkte an, dass in vielen Tieren das Geschlecht chromosomal determiniert ist (Diözie) und Polyploidie wahrscheinlich die Entwicklung und Fertilität eines der Geschlechter stört. Es ist nicht die tierische Diözie *per se*, die die Fähigkeit für Polyploidisierung begrenzt, sondern Diözie in Verbindung mit einem genetisch degenerierten Geschlechtschromosom (XY/ZW), welches eine Gendosiskompensation erfordert (Orr 1990; Collares-Pereira *et al.* 2013). Tatsächlich ist Polyploidie in Tieren häufig mit parthenogenetischer Reproduktion (Jungfernzeugung) assoziiert (Otto & Whitton 2000). Die meisten Pflanzen besitzen dagegen beide Geschlechter in einem Individuum. Für Pflanzen scheinen multiplizierte Genome generell weniger problematisch zu sein (Otto & Whitton 2000; Mable 2004).

Polyploidie wird traditionell in zwei Formen unterteilt: Auto- und Allopolyploidie (Kihara & Ono 1926). Autopolyploidie wird für Polyploidien verwendet, die aus einzelnen Populationen, zwischen Ökotypen oder Rassen einer Art hervorgingen (Clausen *et al.* 1945; Grant 1953). Allopolyploidie beschreibt eine Form von

Polyploidie, bei der additiv aus verschiedenen Arten stammende Chromosomensätze in einem Organismus vervielfacht vorliegen. Dabei können Arten nicht nur nach dem Grad der pre- und/oder postzygotischen Isolation, dem biologischen Artkonzept (Mayr 1942, 1982), definiert sein (Ramsey & Schemske 1998). Bei Pflanzen finden meist morphologische und/oder phylogenetische Artkonzepte Anwendung (Grant 1981; Wheeler & Meier 2000; Wiley & Mayden 2000). Die Einteilung in Auto- oder Allopolyploidie birgt daher ein gewisses Konfliktpotential (Tate *et al.* 2005; Soltis & Soltis 2009; Doyle & Sherman-Broyles 2017). Es ist immer von der taxonomischen Auffassung des Autors abhängig, ob die polyploidiesierenden Vorläuferspezies zu einer Art gehören oder nicht. Neben der Einteilung nach dem Modus der Herkunft von Polyploidie (intra- oder interspezifisch) können auch zytologisch-genetische Kriterien gelten (Parisod *et al.* 2010). Ramsey & Schemske (2002) erwarten für Allopolyploide unter anderem Bivalente in deren Meiose und disomische Vererbung. Autopolyploide haben nach zytologisch-genetischen Kriterien multivalente Chromosomen (Stebbins 1947), nicht-präferenzierte Chromosomenpaarung und multisomische Vererbung. Es ist bekannt, dass Autopolyploidie und Allopolyploidie Endpunkte eines evolvierenden genetischen Kontinuums repräsentieren (Stebbins 1947). Zwischenformen werden als segmentale Allopolyploide bezeichnet und weisen eine Mischung von disomischer und multisomischer Vererbung auf (Soltis *et al.* 2016; Doyle & Sherman-Broyles 2017).

## 1.2 Polyploidie und die Evolution der Angiospermen

In Angiospermen ist Polyploidie nahezu ubiquitär und große phylogenetische Linien beinhalten rezente Polyploidien (Wood *et al.* 2009; Husband *et al.* 2013; Soltis, Visger, *et al.* 2014; Barker *et al.* 2016; Soltis & Soltis 2016; Soltis *et al.* 2016). In Gymnospermen ist Polyploidie dagegen eher selten (Ahuja 2005; Wood *et al.* 2009; Husband *et al.* 2013). Unter Verwendung von Chromosomenzählungen und verschiedener Hypothesen, die die Trennlinie

zwischen diploid und polyploid erklären, wurde versucht die Häufigkeit von rezenten Polyploiden in Angiospermen zu schätzen. Stebbins (1950, 1971) schätzte, dass ~30–35% der Angiospermen polyploid seien. Soltis & Soltis (2012) vermuteten zwischen 30% und 80% der Angiospermen seien rezente Polyploide. Über die Sinnhaftigkeit, strikt in Autopolyploidie und Allopolyploidie einzuteilen und deren Häufigkeit zu quantifizieren, gibt es verschiedene Meinungen (Barker *et al.* 2016; Doyle & Sherman-Broyles 2017; Spoelhof *et al.* 2017). Ramsey & Schemske (1998) schätzten, dass Autopolyploidie und Allopolyploidie mit ähnlichen Raten auftreten. Barker *et al.* (2016) veröffentlichten Ergebnisse einer Metanalyse über die relative Häufigkeit von Auto- und Allopolyploidie, um die unterschätzte Menge an Autopolyploidien neu zu bewerten (Soltis *et al.* 2007; Spoelhof *et al.* 2017). Sie ermittelten, dass 24% der untersuchten Gefäßpflanzen polyploid sind, wobei 13% Autopolyploide und 11% Allopolyploide waren (Barker *et al.* 2016). Chromosomenspaltung und –fusion ist Teil der Karyotypenevolution und hat verschiedene Pflanzenlinien signifikant geprägt. Daher kann es partiell schwierig sein, Ploidiestufen ausschließlich von zytologischen Daten abzuleiten (z.B. Harpke *et al.* 2015). Interspezifisch können Genomgrößen von Pflanzen sehr verschieden sein (Dodsworth, Leitch, *et al.* 2015). Zu erklären ist das hauptsächlich mit Polyploidie, aber auch durch veränderliche Anteile an *Repeat*-Motiven, wie rDNA oder transponierenden Elementen (Hancock 2002; Leitch & Leitch 2008; Soltis *et al.* 2015).

Trotz deutlicher Hinweise auf alternierender WGDs in der evolutionären Historie der Blütenpflanzen (Wendel 2015) gibt es dennoch, entsprechend ihrer Chromosomen(basis)zahl und Genkopien, „diploide“ Zytotypen. *Genome downsizing* und Diploidisierung sind die Prozesse die wiederkehrende WGDs ermöglichen, ohne potentielle Nachteile von Polyploidie (hohe Chromosomenzahl, große Genome, riesige Anzahl an Genkopien) zu akkumulieren (Wendel 2015; Soltis *et al.* 2016). Diploidisierung bedeutet nicht, dass ein ursprünglicher Zustand wiederhergestellt wird. Der prinzipielle Mechanismus des *genome downsizing* läuft über illegitime Rekombination und

homologe intra-strang Rekombination ungleicher *Repeat*-Elemente ab (Devos *et al.* 2002; Soltis *et al.* 2015). Das führt zum Verlust repetitiver Sequenzen und verkleinert das Genom (Soltis *et al.* 2015). Die allermeisten der duplizierten Gene gehen als Pseudogene (*gene silencing*) auf Grund eines verminderten Selektionsdrucks verloren (Lynch & Conery 2000). Es existieren aber auch Mechanismen, die duplizierte Genmodule erhalten und wahrscheinlich adaptive Sub- und Neofunktionalisierung begünstigen, was zu mehr Komplexität führt (Freeling & Thomas 2006; Freeling 2009; De Smet & Van de Peer 2012). Dadurch erweitern sich die genregulatorischen Möglichkeiten des polyploiden Organismus. Prozesse wie reziproker Genverlust und Subfunktionalisierung können über mehrere Millionen Jahre stattfinden und andauernd eine Artbildung über lange Zeiträume vorantreiben (Van de Peer *et al.* 2009; Soltis *et al.* 2015).

In der Vergangenheit wurde viel darüber debattiert, ob Polyploidie Evolution und Artbildung voran treibt oder keinen langzeitlichen Einfluss hat (Stebbins 1950; Wagner 1970; Stebbins 1971; Levin 1983; Otto & Whitton 2000; Van de Peer *et al.* 2009; Soltis *et al.* 2009; Heslop-Harrison 2012; McGrath & Lynch 2012; Soltis, Segovia-Salcedo, *et al.* 2014; Soltis, Visger, *et al.* 2014; Soltis & Soltis 2016; Zhan *et al.* 2016; Ruprecht *et al.* 2017). Viele Argumente sprechen dafür, dass Genomduplikationen gerade dann evolutionär erfolgreich sind, wenn drastische Umweltveränderungen stattfinden (Comai 2005; te Beest *et al.* 2012; Madlung 2013; Vanneste *et al.* 2014). Einige Autoren postulieren, dass Polyploidie die Wahrscheinlichkeit des Aussterbens verringert, insbesondere durch eine erhöhte Redundanz, reduziertes Risiko für Mutationen und erhöhte Adaptions- und somit Evolutionsraten (Fawcett *et al.* 2009, 2013; Van de Peer *et al.* 2009; te Beest *et al.* 2012). Soltis & Soltis (2016) zeigten, dass bestimmte Schlüsselinnovationen im Zusammenhang mit vergangenen WGDs stehen. Diversifikation als Folge von WGDs manifestiert sich durch ein gesteigertes genetisches Potential zu biochemischen, physiologischen, morphologischen und ökologischen Vorteilen (Soltis, Liu, *et al.* 2014; Soltis *et al.* 2015; Soltis & Soltis

2016). Es finden sich starke Korrelationen zwischen Kladen mit hoher Artenvielfalt bzw. hohen Diversifikationsraten und dem Vorkommen von Paläopolyploidien (Cui *et al.* 2006; Fawcett *et al.* 2009; Soltis *et al.* 2009). Schranz *et al.* (2012) stellte die Hypothese „*WGD Radiation Lag-Time Model*“ auf. Sie basiert auf der Beobachtung, dass Diversifikationsraten anscheinend nach WGDs ansteigen. Die Diversifikation und Aufspaltung beginnt aber erst nach einer *lag*-Phase die mehrere Millionen Jahre andauern kann (Schranz *et al.* 2012; Tank *et al.* 2015). Dies deutet darauf hin, dass WGDs Diversifizierung fördern, sie aber nicht bedingungslos verursachen (Tank *et al.* 2015).

Andere Studien zeichnen dagegen ein Bild von Polyploidie als evolutionäre Sackgasse (Wagner 1970; Stebbins 1971) oder allgemein als nicht beständig seiend (Mayrose *et al.* 2011, 2015; Arrigo & Barker 2012). Es wurde auch die Hypothese aufgestellt, dass Polyploidie (und gesteigerter Genomgröße im Allgemeinen) nachteilig sein könnte wegen des erhöhten Nährstoffbedarfs (P, N) für die Synthese zusätzlicher DNA (Leitch & Leitch 2008; Šmarda *et al.* 2013; Guignard *et al.* 2016). Bei zunehmendem DNA-Gehalt vergrößert sich der Nucleus sowie das Zellvolumen nicht proportional (Melaragno 1993; Comai 2005). Ein differentielles Wachstum der Chromatin- gegenüber den oberflächlichen ER-Membran-Komponenten des Zellkerns könnte zu einem Dosisungleichgewicht führen, was regulatorisch negative Auswirkungen hätte (Comai 2005).

### **1.3 Dynamik allopolyploider Genome**

Polyploidisierung infolge von Hybridisierung (Allopolyploidie) ist ein weit verbreitetes Phänomen (Soltis & Soltis 2009; Soltis, Visger, *et al.* 2014; Barker *et al.* 2016). Ein Vorteil von Allopolyploiden (AABB) im Vergleich zu homoploiden Hybriden (AB) ist die sofortige Bereitstellung von homologen Chromosomenpaaren für eine regulär verlaufende Meiose (Ramsey & Schemske 2002). Damit wird eine zumindest partielle Fruchtbarkeit der Neoallopolyploiden gewährleistet. Neu entstandene Allopolyploide zeigen aber auch anormale

Mitosen und Meiosen, infolge inkorrektter Paarung beider Subgenome während der Zellteilung. Homeologe Chromosomen können durch inkorrekte Paarung den normalen Ablauf der Meiose stören und Multivalente und Univalente bilden (Comai 2000; Moore 2002; Grandont *et al.* 2013; De Storme & Mason 2014). Dies kann zu nicht reduzierten  $2n$  Gameten führen (Ramsey & Schemske 1998; Grandont *et al.* 2013).

Mikroskopisch sichtbar auf den Chromosomen ist die *nucleolus organizer region* (NOR), der Lokus der ribosomalen Gene (rDNA). Der rDNA-Lokus codiert ribosomale 18S, 5.8S und 26S rRNA-Gene (35S rDNA), welche als *tandem arrays* mit zahlreichen Kopien organisiert sind und in vielen zytogenetischen und phylogenetischen Studien Verwendung fanden (Rogers & Bendich 1987; Neves *et al.* 2005; Poczai & Hyvönen 2010). Wie in anderen *multi copy* Genfamilien, wird die Sequenzhomogenität der rDNA durch konzertierte Evolution erhalten. Prozesse wie Rekombination und Genkonversion tragen konzertierte Evolution (Liao 1999; Feliner & Rosselló 2012). Die rDNA in Allopolyploiden ist im Vergleich zu der ihrer diploiden Vorläufer-Arten sehr dynamisch hinsichtlich ihrer Sequenzvariabilität und Genomlokationen (Volkov *et al.* 2007). Die rDNA-*Repeats* können durch Rekombination homogenisiert werden (Matyášek *et al.* 2012). Aber auch unabhängige nicht-konzertierte Evolution wurde beschrieben, bei der eine rDNA-Homogenisierung ausblieb (Hřibová *et al.* 2011; Khaitová *et al.* 2014). Zudem kann sich die Anzahl der rDNA-*Loci* in Neopolyploiden verändern (Kovařík, Dadejova, *et al.* 2008; Renny-Byfield *et al.* 2011).

Ausgelöst durch die Interferenz der stammelterlichen Genome, bedingen *Genome downsizing* und die darauffolgende Diploidisierung gravierende genomische und transskriptomische Veränderungen. Das ist insbesondere assoziiert mit der Reduktion der Chromosomenzahl und kann komplexe chromosomale Neuorganisation beinhalten (Mandáková *et al.* 2012). Diese reichen vom Verlust einzelner Chromosomen oder Chromosomenteile über Genverluste und Genstilllegung (*gene silencing*) bis hin zu Sub- oder

Neofunktionalisierung homeologer Gene, insbesondere genomischer Neuorganisation repetitiver DNA-Elemente und epigenetischer Modifikation (Comai 2000, 2005; Chen 2007; De Smet & Van de Peer 2012; Weiss-Schneeweiss *et al.* 2013; Renny-Byfield & Wendel 2014; Soltis *et al.* 2015). Diese Prozesse setzen sofort nach der Allopolyploidisierung ein und werden auch als „*genomic shock*“ bezeichnet (McClintock 1984). Außerdem wird auch vom „*transcriptomic shock*“ gesprochen, der die Genexpression und DNA-Methylierungsmuster als epigenetische Auswirkung beschreibt (Buggs *et al.* 2011; Soltis *et al.* 2015).

#### 1.4 Polyploidie in Populationen

Durch Allopolyploidie katalysierte Artenstehung setzt eine Serie von Ereignissen mit vermeintlich geringer Wahrscheinlichkeit voraus. Dazu gehören die Bildung nicht reduzierter Gameten, Hybridisierung, Etablierung und Fortbestand der Neo-Allopolyploiden (Levin 1975; Ramsey & Schemske 1998, 2002). Umweltstress scheint die Häufigkeit der Bildung nicht reduzierter Gameten zu begünstigen (Ramsey & Schemske 1998; Brownfield & Köhler 2011; De Storme & Geelen 2013; Mable 2013; Madlung 2013). Interspezifische Hybriden produzieren häufiger als ihre Stammeltern nicht reduzierte Gameten (Ramsey & Schemske 1998; Mason & Pires 2015). Hybridisierung kann als Reproduktion zwischen genetisch verschiedenen Populationen definiert werden (Barton & Hewitt 1985). Verschiedene Szenarien können als Ergebnis der Hybridisierung auftreten: (1) Kurzzeitige Persistenz als Folge von Sterilität oder ungünstiger demographischer Situation [*minority cytotype disadvantage* (Levin 1975)]. Damit gilt dieses Szenario als tatsächliche evolutionäre Sackgasse. (2) Entstehung von Hybridschwärmen, die verzögerte Homogenisierung ungleicher Linien abbilden und/oder lokale Introgression selektiv favorisierter Allele stimulieren und somit Artgrenzen verwischen lassen. (3) Der Ursprung einer neuen Hybridspezies, entweder mit gleicher Ploidiestufe (homoploid) oder

inklusive Polyploidisierung (allopolyploid) (Levin 1975; Arnold 1992; Arnold & Hodges 1995; Abbott *et al.* 2013; Soltis 2013).

Allopolyploide entstehen häufiger durch multiple, polytope als durch einzelne, monotope Hybridisierungsereignisse (Soltis & Soltis 2000; Weiss-Schneeweiss *et al.* 2013). Zur reproduktiven Isolation und damit zur Artbildung können entstandene Barrieren beitragen, die Genfluss und Introgression begrenzen (Wu 2001; Via 2009). Neben geographischer Isolation (Allopatrie) ist die offensichtlichste Unterbrechung des Genflusses eine chromosomale Inkompatibilität bedingt durch die Folgen der Allopolyploidisierung (Grant 1981; Husband 2000). Zu diesen zählen reziproken Genverlust oder *silencing* duplizierter Gene/Genome entsteht (Van de Peer *et al.* 2009). Durch diese Mechanismen der reproduktiven Isolation ist auch eine sympatrische Artdifferenzierung Neo-Allopolyploider möglich (Soltis & Soltis 2009; Soltis 2013).

Postzygotische Isolation ist oft unvollständig und natürliche Populationen beinhalten häufig mehrere verschiedene Zytotypen, was evolutionäre Divergenz als Prozess abbildet (Abbott *et al.* 2013; Liu *et al.* 2015). Es kann auch eine asymmetrische Hybridisierungsrichtung und deren resultierenden Zytotypen bevorteilt sein (Tiffin *et al.* 2001; Laport *et al.* 2016). Finden sich unterschiedliche Zytotypen in gemischten Populationen, im gleichen Habitat und/oder der gleichen ökologischen Nische, können für Polyploide nachteilige Effekte auftreten (Madlung *et al.* 2005). Die geringere Abundanz polyploider Zytotypen in gemischten Populationen verringert die Wahrscheinlichkeit erfolgreicher sexueller Fortpflanzung, da paarungskompatible Genome seltener sind. Dies führt zur sogenannten *minority cytotype disadvantage* (Levin 1975; Otto & Whitton 2000). Wege diesen Minderheitennachteil zu umgehen, sind eine gesteigerte Klonalität (Apomixis) oder eine teilweise invasive Kolonisation allopatrischer Habitate und Adaption an neue ökologische Nischen (te Beest *et al.* 2012; Husband *et al.* 2013; Ramsey & Ramsey 2014). Deshalb finden sich vielfach geographische Zytotypenverteilungen (Ramsey & Schemske 2002).

Allopolyploide können bei Umweltstress häufiger entstehen und bedingt durch den gesteigerten Anteil genetischer Ressourcen, diesen zum Teil auch besser bewältigen. Das kann erklären, warum viele rezente Polyploide in extremer Umwelt wie der Arktis vorkommen (Soltis *et al.* 2015). Der Erfolg allopolyploider Pflanzen hängt von einer fixierten Heterosis, neuer Genkombination und Pufferung negativer Allele ab (Comai 2005).

In stabilen Ökosystemen mit hoch angepassten Inhabern existierender Nischen sind neu entstandene Allopolyploide möglicherweise nicht im Stande zu konkurrieren, da ihre Fitness durch genomische Interferenz und einem möglichen *minority cytotype* Effekt herabgesetzt ist (Ramsey & Schemske 2002; Mallet 2007; Van de Peer *et al.* 2009). Dies gilt insbesondere in Bezug auf ihre diploiden Vorfahren. Für etablierte Allopolyploide wurde vielfach eine Nischenverschiebung postuliert (Levin 1975, 2003). Der Fortbestand von polyploiden Linien kann begünstigt werden, wenn Polyploide der Konkurrenz entkommen, indem sie in unbesetzte Nischen ausweichen. Verschiedene Allopolyploide zeigen aber eine zumindest teilweise geographische Sympatrie und abiotische Nischenüberlappung mit einem ihrer Vorläufer (Glennon *et al.* 2014; Marchant *et al.* 2016). Modellierungen von Fowler & Levin (2016) konnten zeigen, dass die Parameter Populationsgröße, individuelle Fruchtbarkeit und Nischendifferenzierung, sowie Selbstungsraten zur Überwindung des *minority cytotype disadvantage* den größten Einfluss auf den Etablierungserfolg von Neo-Allopolyploiden haben. Mikroklimatische Faktoren können ebenfalls eine Rolle bei der Etablierung spielen (Parisod & Broennimann 2016; Segraves 2017). Ebenso können Polyploidien die Wechselwirkungen mit anderen Organismen, wie Bestäuber, Herbivoren oder Pathogenen beeinflussen und gleichzeitig die Ökologie dieser Arten verändern (Segraves & Anneberg 2016).

### 1.5 Das Modell Hundsrosen (*Rosa* L. Sekt. *Caninae* (DC.) Ser.)

Rosen sind ein prominentes Beispiel für die komplexe Evolution in Polyploiden. Die Systematik der Gattung *Rosa* L. basiert auf Rehder (1940) mit Aktualisierungen nach Henker (2000), Wissemann (2003) und McNeill et al. (2006). Die morphologisch basierte Klassifizierung der Gattung *Rosa* ist nur zum Teil durch phylogenetische Untersuchung gestützt (Wissemann & Ritz 2005; Bruneau et al. 2007; De Riek et al. 2013; Fougère-Danezan et al. 2015; Zhu et al. 2015). Die Gattung *Rosa* wird in vier Untergattungen gegliedert. Die bedeutendste und größte Untergattung *Rosa* wird wiederum in 10 Sektionen unterteilt. Die Sektion *Caninae* (DC.) Ser. (Hundsrosen *s.l.*) ist in mehrere Subsektionen geordnet und beinhaltet ausnahmslos polyploide Arten ( $2n = 4x-8x = 28-56$ ) (Klásterská 1969; Klásteršká & Klásteršky 1974; Končalová & Klásterský 1978; Małecka & Popek 1982, 1984; Pachel 2011). Die Gattung *Rosa* ist ein holoarktisches Florenelement der Nordhemisphäre (eine Ausnahme mit *R. abyssinica* R.Br. in Ostafrika), wobei die ca. 60 Arten der Sektion *Caninae* hauptsächlich in Europa und Westasien verbreitet sind (Henker 2000; Kurtto et al. 2004). Hundsrosen sind Sträucher und kommen an offeneren Standorten mit schwach sauren bis schwach basischen, meist kalkhaltigen Böden vor (Henker 2000). Die Taxonomie der Hundsrosen gilt als schwierig, da korrelierte morphologische Merkmale zur Artbestimmung verwendet werden (Christ 1873; Keller 1931; Henker 2000; Wesenberg et al. 2015). Zudem sind Hundsrosen zu Apomixis und Selbstung befähigt (Werlemark 2000), sowie zu häufiger inter- und intrasektioneller Hybridbildung (Henker 2000).

Spezies der beiden Subsektionen *Caninae* (Hundsrosen *s.str.*) und *Rubigineae* H. Christ (Weinrosen) dienen als Modellorganismen in der vorliegenden Arbeit. Innerhalb der Subsektion *Rubigineae* können Morphotypen mit runder Blättchenbasis und drüsigem Blütenstiel als *Rosa rubiginosa* Aggregat zusammengefasst werden (Christ 1873; Henker 2000). Abgrenzend dazu existieren *Rubigineae*-Morphotypen mit spitzwinkliger Blättchenbasis und unbedrüsestem Blütenstiel, die das *Rosa elliptica* Aggregat bilden. Die

untersuchten Arten werden der Reihenfolge nach in L-Typ (lat. *laxus* = locker), L/D-Typ (intermediär zwischen L- und D-Typ) und D-Typ (lat. *densus* = dicht) eingeteilt (Reichert 1998; Henker 2000). Das *R. rubiginosa* Aggregat umfasst die Arten *R. rubiginosa* L., *R. gremlii* (Christ) Gremlí und *R. micrantha* Sm. und das *R. elliptica* Aggregat beinhaltet *R. elliptica* Tausch, *R. inodora* Fr. und *R. agrestis* Savi. Von der Subsektion *Caninae* waren die Arten *R. canina* L., *R. subcanina* (Christ) Vuk. und *R. dumalis* Bechst. mit unbehaarter Blättchenunterseite, sowie *R. corymbifera* Borkh. und *R. subcollina* (Christ) Vuk. mit behaarter Blättchenunterseite Gegenstand der Studien. Bestimmungsrelevante Merkmale der aufgeführten Arten finden sich in *Figure 1* im Manuskript II (Herklotz *et al.* 2017). Varietäten wurden dort nur teilweise berücksichtigt (z.B. *R. canina* var. *andegavensis* (Bast.) Desp.).

Hundsrosen sind allopolyploid und ihr hybridogener Ursprung mit anderen Sektionen geht von einer vermutlich ausgestorbenen diploiden Ur-Hundsrose aus (Wissemann & Hellwig 1998; Wissemann 2000; Ritz *et al.* 2005). Gemeinsames Merkmal der *Caninae* ist unter anderem eine einzigartige Meiose. Eine balancierte Heterogamie, die auch als Canina-Meiose bezeichnet wird, ermöglicht den meist pentaploiden Hundsrosen ( $2n = 5x = 35$ ) trotz ungeradem Chromosomensatz sexuelle Fortpflanzung (Täckholm 1920, 1922; Blackburn & Harrison 1921). Mit einer chromosomalen Basiszahl von  $x = 7$  rekombinieren während der meiotischen Syndese nur 14 homologe Chromosomen, was eine Bivalentenbildung (Diakinese) von 2 Subgenomen bewirkt. Die restlichen (14–)21(–49) Chromosomen verbleiben entsprechend der somatischen Ploidiestufe ungepaart als Univalente.

In der Mikrosporogenese werden monoploide Pollen ( $1n = 1x = 7$ ) mit einem Bivalenten-Chromosomensatz gebildet. Während die Bivalente in der Anaphase I zu den Polen wandern, verbleiben die Univalente in der Äquatorialebene und werden in Chromatiden gespalten. Die durchgängig verlangsamte Migration der Univalenten-Chromatiden führt dazu, dass sie in der Telophase I die Pole nicht erreichen. In der Anaphase II wandern je 7

Bivalente-Chromatiden zu den tetradischen Polen. Die Univalente-Chromatiden sind irregulär innerhalb der jeweiligen parallelen Platte verteilt. Das führt zur Bildung von Telophasen-Kernen, welche Bivalente und teilweise auch Univalente enthalten, sowie zusätzlichen Zwergkernen die nur Univalente-Genomanteile einschließen. Laut Täckholm (1920, 1922) sind nur Pollen, die ausschließlich Bivalente besitzen lebensfähig. Mikrosporen mit Anteilen von Univalenten degenerieren. Der Anteil an fertilen Pollen liegt in Hundsrosen wahrscheinlich daher bei ~10% (Herklotz & Ritz 2014).

Die Megasporogenese in der Sektion *Caninae* zeichnet sich dadurch aus, dass in der Metaphase I die Univalente mikropylar zur Äquatorialebene (oberhalb) ausgerichtet sind. Die Bivalente migrieren in der Anaphase I regulär zu den Polen. Nur der mikropylare Teil, mit Bivalenten und Univalenten, entwickelt sich zur Eizelle weiter. Die Ploidie der Eizellen ( $1n = 3x-7x = 21-49$ ) hängt vom ausgehenden somatischen Zustand ab. Bei einer pentaploiden Hundsrose ( $2n = 5x = 35$ ) entstehen tetraploide Eizellen ( $1n = 4x = 28$ ). Die Canina-Meiose ist ein hemisexueller Vorgang, weil sie gleichermaßen sexuelle Rekombination (Bivalente) und apomiktische Vererbung kombiniert (Nybom *et al.* 2004, 2006). Durch die Heterogamie und die daraus resultierende betont matroklone Vererbung (exklusiv maternal vererbte Univalente) ähneln die Nachkommen bei Hundsrosen stark dem mütterlichen Elter. Nybom *et al.* (2004) stellten die Hypothese auf, dass immer dieselben Genome Bivalente bilden und vererbt werden, wohingegen die Kombination mit unterschiedlichen Univalenten-Subgenome die verschiedenen Spezies definieren. Dies führte unter anderem zu der Folgerung, die Bivalente repräsentierten ein diploides Genom einer ausgestorbenen oder verschollenen Ur-Canina (Ritz *et al.* 2005; Nybom *et al.* 2006; Kovařík, Werlemark, *et al.* 2008).

Hundsrosen sind keine klassischen Modellorganismen. Die besondere Vererbung durch die Canina-Meiose vereint rekombinatorische Aspekte polyploider Genome (Bivalente) und einen statischen Zustand nicht-rekombinativer Genome (Univalente). Die *Caninae* sind durch urzeitliche Allopolyploidisierung

entstanden und es findet rezente Hybridisierung statt. Das bietet eine einzigartige Möglichkeit, die genetischen und epigenetischen Konsequenzen einer nicht-balancierten elterlichen Konstitution bei polyploider Hybridisierung zu erforschen.

## 1.6 Zielstellung

**Manuskript I** Für die Hybridentstehung innerhalb der Sektion *Caninae* sollte geklärt werden, ob Hybriden sich unabhängig voneinander etablieren (*polytopic origin*) oder ob es einzelne Hybridisierungsereignisse mit anschließender Verbreitung gab (*monotopic origin*). Mit Ploidiestufen- und Mikrosatelliten-Analysen habe ich gemischte Populationen über eine große geografische Distanz untersucht. Es wurde die Häufigkeit reziproker Hybriden quantifiziert. Die Frequenz von Neo-Allopolyploidie unter Beteiligung nicht reduzierter Gameten war dabei von besonderem Interesse.

**Manuskript II** Die schwierige Taxonomie der Hundsrosen ist bedingt durch ihre allopolyploide Evolution, die Canina-Meiose und durch häufige Hybridbildung. Es wurde nach morphologischen Merkmalen gesucht, um die Ploidiestufen bzw. Hybriden eindeutig unterscheiden zu können. Untersucht wurden gemischte Populationen in Deutschland. Zytologische, genetische und morphologische Analysen sollten mit der aktuellen Taxonomie verglichen werden.

**Manuskript III** Es wurde nach Unterschieden in rekombinierenden und nicht-rekombinierenden Chromosomen zwischen den beiden Subsektionen gesucht. Die zytologische Charakterisierung von rDNA-Loci in Mitose und Meiose, sowie eine quantitative Analyse von *nrITS-1*-Typen sollten die unterschiedlichen allopolyploiden Ursprünge beider Subsektionen aufzeigen. Die Effekte von Hybridisierung auf das Verhalten der rDNA und die Expression unterschiedlicher Ribotypen in Hybriden wurden untersucht.

**Manuskript IV** Eine additive Vererbung epigenetischer Muster im Kontext der Canina-Meiose, lässt ein Verhältnis von maternal : paternal = 4 : 1 vermuten ( $2n = 5x$ ). Diese Hypothese sollte gegen die einer Verschiebung in Richtung eines der Eltern und/oder einer hybridspezifische Veränderung getestet werden. Zudem stellte sich die Frage nach organspezifischer Expression und den epigenetischen Einfluss auf morphologische Merkmale. Es wurden DNA-Methylierung und Genexpression in reziproken Hybriden und deren potentiellen Elternarten untersucht.

## 2 Kumulativer Abschnitt

### 2.1 Übersicht zu den Manuskripten

**1. Herklotz, V., Ritz, C.M. (2017) Multiple and asymmetrical origin of polyploid dog rose hybrids (*Rosa* L. sect. *Caninae* (DC.) Ser.) involving unreduced gametes. *Annals of Botany* 120, 209–220.**

In dieser Studie wurde die spontane Hybridisierung zwischen Arten der beiden Subsektionen *Caninae* und *Rubigineae* untersucht. Mit Hilfe von Mikrosatelliten und Ploidiestufenbestimmungen wurden hybridogene Individuen aus gemischten Populationen in Mittel- und Südosteuropa identifiziert. Statistische Analysen zeigten, dass Hybriden in der Subsekt. *Rubigineae* häufiger vorkommen und aus nicht reduzierten Gameten hervorgingen.

Auf zwei Sammelreisen wurde ich jeweils von Samantha Kühnel und Stefan Dorf begleitet. Der größte Teil der Laborarbeit und alle statistischen Analysen wurden von mir durchgeführt. Diana Altmann, Nadine Mieder und Stefan Dorf haben im Rahmen von Qualifizierungsarbeiten einen Teil der Daten generiert. Christiane Ritz und ich haben die Studie geplant und die Methode zur Identifikation von Hybriden entwickelt. Das Manuskript wurde im Wesentlichen von mir verfasst.

**2. Herklotz, V., Mieder, N., Ritz, C. M. (2017) Cytological, genetic and morphological variation in mixed stands of dogroses (*Rosa* L. sect. *Caninae* (DC.) Ser.) in Germany with a focus on the hybridogenic *R. micrantha* Sm. *Botanical Journal of the Linnean Society* 184, 254–271.**

Morphologische Merkmale wurden mit Hilfe von statistischen Methoden mit genetischen und zytologischen Daten in Kontext gesetzt. Es wurde ein Teildatensatz, der im Manuskript I veröffentlichten Mikrosatelliten und Ploidiestufen verwendet. Es ließen sich Subsektionen und die Aggregate der *Rubigineae* differenzieren. Die derzeit akzeptieren Kleinarten konnten weder

morphologisch noch genetisch eindeutig unterschieden werden. Die Ergebnisse deuten auf morphologische Unterschiede zwischen hexaploiden Hybriden und nicht-hybridogenen Pentaploiden im *R. rubiginosa* Aggregat hin.

Die morphologischen Untersuchungen, Ploidiestufenbestimmungen und Diskriminanzanalysen hat Nadine Mieder durchgeführt. Ich habe die Mikrosatelliten-Daten generiert und Teile der multivariaten Statistik durchgeführt. Die univariaten Statistiken zur Morphometrie wurden von Christiane Ritz bearbeitet. Die Planung und das Design der Studie, sowie das schriftliche Manuskript wurden von mir und Christiane Ritz bearbeitet.

**3. Herklotz, V., Kovařík, A., Lunerová, J., Lippitsch, S., Groth, M., Ritz, C. M. (2018) The fate of ribosomal RNA genes in spontaneous polyploid dogrose hybrids (*Rosa* L. sect. *Caninae* (DC.) Ser.) exhibiting non-symmetrical meiosis. *The Plant Journal* 94, 77–90.**

In dieser Publikation wurden die Unterschiede zwischen den Subsektionen und deren rezenten Hybriden in den Genen der ribosomalen RNA (rDNA) untersucht. Es wurden zytologische, genetische und epigenetische Daten, inklusive Illumina®-Sequenzen analysiert. Die Ergebnisse zeigen Lokus-Stabilität und intra-NOR-Homogenität. Zwischen den einzelnen rDNA-Loci konnte dagegen nicht konzertierte Evolution belegt werden. Zudem unterstützen die Ergebnisse die Hypothese einer unabhängigen Entstehung der asymmetrischen Canina-Meiose in beiden Subsektionen.

Die zytologischen Untersuchungen haben ich und Jana Lunerová durchgeführt. Marco Groth (FLI, Jana) oblag das Sequenzieren und *pre-processing* der *nrITS-1*-Amplicons. Die Arbeiten zur Klonierung und Sanger-Sequenzierung wurden von Susan Lippitsch durchgeführt. Aleš Kovařík und Christiane Ritz haben diese Studie angeregt. Die genomischen Illumina®-Daten wurden von Aleš Kovařík bearbeitet. Desweiteren wurde von ihm das Manuskript korrigiert, ergänzt und verbessert. Ich habe die Auswertung und quantitative Analyse der gesamten Sequenzdaten durchgeführt und den Hauptteil des Manuskriptes verfasst.

**4. Vogt, J.C., Herklotz, V., Ritz, C.M. (2015) Epigenetic patterns in genetically imbalanced polyploid dog rose Hybrids (*Rosa* L. sect. *Caninae* (DC.) Ser.) revealed by cDNA–Amplified Fragment Length Polymorphisms and Methylation-Sensitive Amplified Polymorphisms, *International Journal of Plant Sciences*, 176(5), 433–445.**

Die epigenetischen Veränderungen in spontan entstandenen Hybriden waren Gegenstand dieser Studie und wurden mit dominant vererbten Markern untersucht. Entsprechend der asymmetrischen Canina-Meiose wurden maternal betonte Methylierungs- und Expressionsmuster gefunden. Ein *silencing* der paternal vererbten Genomteile konnte nicht beobachtet werden. Die Expressionsmuster unterschieden sich organspezifisch. Epigenetische Daten korrelierten stärker mit morphologischen Merkmalen als mit genetischen Markern.

Die gesamte Laborarbeit, exklusive der Mikrosatelliten, sowie die Auswertung der AFLP-Fragmente wurde von Janina Vogt durchgeführt. Ich habe die Daten statistisch analysiert. Die Studie wurde von Christiane Ritz geplant. Das Manuskript wurde von mir und Christiane Ritz verfasst.

## 2.2 Manuskript I

Herklotz, V., Ritz, C.M. (2017) Multiple and asymmetrical origin of polyploid dog rose hybrids (*Rosa* L. sect. *Caninae* (DC.) Ser.) involving unreduced gametes. *Annals of Botany* 120, 209–220.

**Background and Aims** Polyploidy and hybridization are important factors for generating diversity in plants. The species-rich dog roses (*Rosa* sect. *Caninae*) originated by allopolyploidy and are characterized by unbalanced meiosis producing polyploid egg cells (usually 4x) and haploid sperm cells (1x). In extant natural stands species hybridize spontaneously, but the extent of natural hybridization is unknown. The aim of the study was to document the frequency of reciprocal hybridization between the subsections *Rubigineae* and *Caninae* with special reference to the contribution of unreduced egg cells (5x) producing 6x offspring after fertilization with reduced (1x) sperm cells. We tested whether hybrids arose by independent multiple events or via a single or few incidences followed by a subsequent spread of hybrids.

**Methods** Population genetics of 45 mixed stands of dog roses across central and south-eastern Europe were analysed using microsatellite markers and flow cytometry. Hybrids were recognized by the presence of diagnostic alleles and multivariate statistics were used to display the relationships between parental species and hybrids.

**Key Results** Among plants classified to subsect. *Rubigineae*, 32% hybridogenic individuals were detected but only 8% hybrids were found in plants assigned to subsect. *Caninae*. This bias between reciprocal crossings was accompanied by a higher ploidy level in *Rubigineae* hybrids, which originated more frequently by unreduced egg cells. Genetic patterns of hybrids were strongly geographically structured, supporting their independent origin.

**Conclusions** The biased crossing barriers between subsections are explained by the facilitated production of unreduced gametes in subsect. *Rubigineae*. Unreduced egg cells probably provide the highly homologous chromosome sets

required for correct chromosome pairing in hybrids. Furthermore, the higher frequency of *Rubigineae* hybridization probably influenced by abundance effects because the plants of subsect. *Caninae* are much more abundant and thus provide large quantities of pollen. Hybrids are formed spontaneously, leading to highly diverse mixed stands, which are insufficiently characterized by the actual taxonomy.

## 2.3 Manuskript II

Herklotz, V., Mieder, N., Ritz, C. M. (2017) Cytological, genetic and morphological variation in mixed stands of dogroses (*Rosa* L. sect. *Caninae* (DC.) Ser.) in Germany with a focus on the hybridogenic *R. micrantha* Sm. *Botanical Journal of the Linnean Society* 184, 254–271.

### Abstract

Polyploid, hemisexual dogroses are known for their complicated reticulate evolutionary history and their ongoing hybridization events that challenge taxonomic concepts. We investigated how spontaneous hybrids between subsections *Rubigineae* and *Caninae* can be identified by cytological, genetic and morphological analyses and how they fit into the current taxonomic treatment. We sampled plants from mixed stands of both subsections in Germany and performed morphological measurements. We compared the morphological data with data from flow cytometry and microsatellite analyses compiled from a previous study based on a much wider sampling. Most of the investigated plants were pentaploid, but some species were composed of tetra- and hexaploid individuals co-occurring with the pentaploids. In Germany, all hexaploid plants were of hybridogenic origin and they were more frequently found in south-western Germany. Genetic and morphological data differentiated clearly between subsections and between informal aggregates of subsection *Rubigineae*. However, the currently accepted microspecies could be neither genetically nor morphologically unambiguously recognized. In contrast, multivariate analyses of genetic and morphological data distinguished between hexaploid and pentaploid cytotypes of the *R. rubiginosa* aggregate. The hexaploid hybridogenic individuals, mostly identified as *R. micrantha*, were characterized by more hairs and fewer glands on the leaflets and a smaller angle of the lamina base, characters typical for the paternal parent of subsection *Caninae*.

## 2.4 Manuskript III

Herklotz, V., Kovařík, A., Lunerová, J., Lippitsch, S., Groth, M., Ritz, C. M. (2018) The fate of ribosomal RNA genes in spontaneous polyploid dogrose hybrids (*Rosa* L. sect. *Caninae* (DC.) Ser.) exhibiting non-symmetrical meiosis. *The Plant Journal* 94, 77–90.

### SUMMARY

Dogroses represent an exceptional system for studying the effects of genome doubling and hybridization: their asymmetrical meiosis enables recombination in bi-parentally inherited chromosomes but prevents it in maternally inherited ones. We employed fluorescent in situ hybridization, genome skimming, amplicon sequencing of genomic and cDNA as well as conventional cloning of nuclear ribosomal DNA in two phylogenetically distinct pentaploid ( $2n = 5x = 35$ ) species, *Rosa canina* and *Rosa inodora*, and their naturally occurring reciprocal hybrids, *Rosa dumalis* (5x) and *Rosa agrestis* (5x, 6x). Both progenitor species differed in composition, meiotic behaviour and expression of rDNA loci: *R. canina* (five 18S and 5–8 5S loci) was dominated by the Canina ribotypes, but *R. inodora* (four 18S loci and 7–8 5S loci) by the Rubiginosa ribotype. The co-localized 5S/18S loci occurred on either bivalent-forming (*R. canina*) or univalent-forming (*R. inodora*) chromosomes. Ribosomal DNA loci were additively inherited; however, the Canina ribotypes were dominantly expressed, even in genotypes with relatively low copy number of these genes. Moreover, we observed rDNA homogenization towards the paternally transmitted Canina ribotype in 6x *R. agrestis*. The here-observed variation in arrangement and composition of rDNA types between *R. canina* and *R. inodora* suggests the involvement of different genomes in bivalent formation. This results supports the hypothesis that the asymmetrical meiosis arose at least twice by independent ancient hybridization events.

## 2.5 Manuskript IV

Vogt, J.C., Herklotz, V., Ritz, C.M. (2015) Epigenetic Patterns in Genetically Imbalanced Polyploid Dog Rose Hybrids (*Rosa* L. sect. *Caninae* (DC.) Ser.) Revealed by cDNA–Amplified Fragment Length Polymorphisms and Methylation-Sensitive Amplified Polymorphisms. *International Journal of Plant Sciences*, 176(5), 433–445.

**Premise of research.** Spontaneous hybrids between species of *Rosa* sect. *Caninae* represent a unique example to study the genetic and epigenetic consequences of an imbalanced parental contribution to polyploid hybrids.

Due to the unique canina meiosis, pentaploid or hexaploid dog rose hybrids contain a single subgenome transmitted by the haploid pollen grain of the paternal species and four to five subgenomes transmitted by the tetraploid or pentaploid egg cell of the maternal species. During this study, we investigated epigenetic changes in spontaneous reciprocal hybrids between the subsections *Caninae* and *Rubigineae* compared to their parental species in a natural population in eastern Germany.

**Methodology.** For investigating epigenetic patterns, we applied cDNA–amplified fragment length polymorphisms (AFLPs) and methylation-sensitive amplified polymorphisms (MSAPs). Additionally, we analyzed microsatellite data and measured morphological characters.

**Pivotal results.** In line with expectations deduced from the genetic composition of the pentaploid and hexaploid hybrids, we observed a maternal bias of DNA methylation and expression patterns. We did not detect silencing of the respective paternal subgenomes. However, the percentage of paternally expressed fragments differed between plant organs. We found a higher number of paternally expressed fragments in sepals compared to leaves, suggesting that the parental genetic information underwent a rapid subfunctionalization in recently formed hybrids. Moreover, epigenetic data obtained from cDNA-AFLPs

and MSAPs correlated stronger with morphology than with genetic data, based on microsatellites.

**Conclusions.** The genetic contribution of subgenomes is strongly biased toward the maternal parent in dog rose hybrids, leading to a nearly apomictic mode of inheritance. However, we found that the underrepresented paternal genome is not silenced but transcribed and differentially expressed between plant organs. The correlation between epigenetic data and morphological data implies that the probably fast-evolving epigenetic changes have a major impact on dog rose phenotypes and may affect the establishment of hybrids in natural populations.

### 3 Zusammenfassende Diskussion

#### 3.1 Evolution der Hundsrosen und Aspekte ihrer reziproken Entstehung

Plastidphylogenien klassifizierten die Subsektionen *Caninae* und *Rubigineae* in unterschiedliche Linien innerhalb der Gattung *Rosa* (Wissemann & Ritz 2005; Bruneau *et al.* 2007; Fougère-Danezan *et al.* 2015; Zhu *et al.* 2015). Die hier gezeigten Mikrosatellitendaten (Manuskript I, Herklotz & Ritz 2017) stützen diese Befunde wie auch die Ergebnisse von De Riek *et al.* (2013), die anhand von AFLPs ebenfalls die beiden Subsektionen separieren konnten.

Die Präsenz von bis zu fünf hochfrequenten *nrITS-1*-Ribotypen in den *Amplicons* (Manuskript III, Herklotz *et al.* 2018) bestätigen eine nicht konzertierte inter-NOR-Evolution und den hybridogenen Ursprung der Sektion *Caninae* (Ritz *et al.* 2005; Kovařík, Werlemark, *et al.* 2008; Zhang, Esselink, *et al.* 2013; Fougère-Danezan *et al.* 2015). Die vergleichsweise geringe Anzahl an Polymorphismen (SNPs) in den *nrITS-1*-Typen könnte durch die relativ kurze evolutionäre Zeit von 6,3 Millionen Jahren (Fougère-Danezan *et al.* 2015) seit der Entstehung der Sektion *Caninae* erklärt werden. Die ungleiche Homogenisierung zu Canina-Ribotypen in *R. canina* und zum Rubiginosa-Typ in *R. inodora* und *R. rubiginosa* legen eine divergente evolutionäre Historie der beiden Subsektionen nahe. Basierend darauf und wegen der festgestellten strukturellen Unterschiede zweier Bivalenten-Chromosomen (18S/5S Kolokalisierung) in *R. canina* und *R. inodora*, formulierten wir in Manuskript III (Herklotz *et al.* 2018, *Figure S8*) die Hypothese, dass *Caninae* und *Rubigineae* zwar dieselben Vorläuferspezies haben, aber aus reziproken Hybridisierungsereignissen entstanden sind. Das steht im Gegensatz zu vorangegangenen Hypothesen die davon ausgehen, dass immer dasselbe diploide Ur-Canina-Genom Bivalente bildet und vererbt wird (Ritz *et al.* 2005; Nybom *et al.* 2006; Kovařík, Werlemark, *et al.* 2008). Die Konsequenz einer polytopen Entstehung wäre dann, dass sich die Canina-Meiose mehrfach unabhängig

voneinander entwickelte. Demnach könnten diese unabhängig entstandenen Formen der heterogametische Canina-Meiose leicht unterschiedlich ablaufen aber letztendlich zu hoch ähnlichen Ergebnissen führen. Die Beobachtungen von Täckholm (1920, 1922) und Blackburn & Harrison (1921) sind nicht detailliert genug, um diese Vermutung zu bestätigen.

In *R. hybrida*, welche aus 7–14 Spezies hervorging, können sich mehrere unterschiedliche Chromosomen randomisiert in der Meiose paaren (Bourke *et al.* 2017). Kreuzungen von Rosen anderer Sektionen scheinen ebenfalls zu einer spontanen canina-ähnlichen Meiose befähigt zu sein (Wulff 1954a, 1954b, 1954c). Das rückt die Frage nach der evolutionären Bedeutung balancierter Heterogamie in ein neues Licht. Anscheinend können Vorgänge wie die Canina-Meiose leichter entstehen als vermutet. Für *Onosma* wird postuliert, dass die in der Gruppe typische asymmetrische Heterogamie, vermittelt durch Allopolyploidie, mehrfach und unabhängig entstanden ist (Kolarčik *et al.* 2014). Das triploide Gras *Andropogon ternatus* (Spr.) Nees ( $2n = 3x = 30$ ) ist ein weiteres Beispiel für eine asymmetrische Meiose, die eine permanente ungerade Ploidiestufe erhält (Norrman & Quarín 1987). *Andropogon ternatus* stabilisiert seine Triploidie durch Weitergabe eines Genoms auf die Eizelle ( $1n = 1x = 10$ ) und zweier Genome auf die Spermazelle ( $1n = 2x = 20$ ) (Norrman & Quarín 1987). Dabei bilden sich zweikernige Proto-Gameten in der Mikrosporogenese, welche bei der Fertilisation favorisiert werden. Eine ähnliche Situation wäre bei der Entstehung der Caninae-Megasporogenese vorstellbar. Bei den mutmaßlich tetraploiden Vorläuferspezies der Subsekt. *Caninae* und *Rubigineae* (Manuskript III, Herklotz *et al.* 2018, *Figure S8*) stellen die entstandenen Meiosen eine Kompensation asymmetrischer Allopolyploidie dar. Circa 20% der gesamten *nrITS-1*-Haplotypen aus der *Amplicon*-Sequenzierung sind *Singletons* oder habe eine geringe Kopienanzahl (Manuskript III; Herklotz *et al.* 2018, *Figure S6*). Unter ihnen, sowie bei den konventionellen Klonen (Manuskript III, Herklotz *et al.* 2018) finden sich auch Haplotypen der jeweiligen komplementären Subsektion (z.B. Rubiginosa-Typ in *R. canina*).

Diese könnten Artefakte oder aber Signaturen von vergangenen Hybridisierungen bzw. Reste unvollständiger konzertierter Evolution sein (Volkov *et al.* 2007). Dabei ist zu betonen, dass sich diese konzertierte Evolution auf Intralokus- und intrachromosomaler rDNA-Homogenisierung bezieht. Bei einer unabhängigen und reziproken Entstehung der beiden Subsektionen ist außerdem eine wiederholte (Rück)Kreuzung sehr wahrscheinlich. Es sind auch intra-NOR-Polymorphismen oder Extra-NOR-Translokationen vorstellbar (Dubcovsky & Dvorak 1995; Buckler & Holtsford 1996; Delany & Krupkin 1999).

Aus den Daten der *Amplicon*-Sequenzierung geht hervor, dass die nukleoläre Dominanz des Rubiginosa-Typs in *R. inodora* (100% cDNA-*Amplicon*-Haplotypen) auch durch dessen genomische Quantität bedingt ist (93% gDNA-*Amplicon*-Haplotypen, Manuskript III, Herklotz *et al.* 2018, *Figure* 5c, d). Gleiches gilt für die Canina-Typen in *R. canina* (Manuskript III, Herklotz *et al.* 2018, *Figure* 5). Dieser hohe Anteil an Canina- bzw. Rubiginosa-Haplotypen im Genom lässt vermuten, dass rDNA-*arrays* auch auf Univalenten-Genomteilen in spezifische Richtung homogenisiert wurden. Verschiedene evolutionäre Rückkreuzungsszenarien mit den Spezies der Donorgenome (Ritz *et al.* 2005) wären eine alternative Erklärung. Die Präsenz weiterer *nrITS-1*-Typen zeigt aber auch, dass die Homogenisierung der rDNA nicht vollständig ist (nicht-konzertierte Evolution). Theoretisch ständen bei einer pentaploiden Hundsrose nur 40% des Genoms (14 Bivalente) bzw. 2 NORs auf den Bivalenten für eine rDNA-Homogenisierung zur Verfügung, da diese meiotisch rekombinieren können. Konzertierte Evolution und rDNA-Homogenisierung geschieht in evolutionären Zeiträumen wie es für *Nicotiana* und *Gossypium* dargestellt wurde (Wendel *et al.* 1995; Kovarik *et al.* 2004). Nach 6,3 Millionen Jahren, also seit der Aufspaltung in die Subsektionen *Caninae* und *Rubignieae* (Fougère-Danezan *et al.* 2015), welche allopolyploidiebedingt unterschiedliche rDNAs beinhalten (Ritz *et al.* 2005), ist möglicherweise die rDNA-Homogenisierung noch nicht abgeschlossen. Für die relativ junge tri-genomische Allopolyploide *Cardamine* ×

*schulzii*, welche erst Ende des 19. Jahrhunderts entstand, wird hingegen eine sehr frühzeitige rDNA-Homogenisierung vermutet (Zozomová-Lihová *et al.* 2014). Einige Kulturformen des allotetraploiden *Brassica napus* L. zeigen wiederum kaum homogenisierte rDNA-arrays (Sochorová *et al.* 2017). Lange Generationszeiten, wie es bei Hundsrosen der Fall ist, können die Geschwindigkeit der Homogenisierung senken (Eickbush & Eickbush 2007). Genkonversion als nicht reziproker Transfer von Sequenzen zwischen inter- oder intrachromosomalen Genorten und ungleiches *crossing-over* zwischen Tochterchromatiden gelten als Mechanismen für die Homogenisierung der rDNA-arrays und deren konzertierte Evolution (Schlötterer & Tautz 1994; Eickbush & Eickbush 2007). Dass rRNA-Gene auf nicht-homologen Chromosomen liegen, verhindert nicht deren konzertierte Evolution (Eickbush & Eickbush 2007). Es wird vermutet, dass die Lokalisation der rDNA nahe dem Telomer, wie es in Hundsrosen der Fall ist (Manuskript III, Herklotz *et al.* 2018), die Wahrscheinlichkeit erhöht mit nicht-homologen Chromosomen zu interagieren (Wendel 2000; Kovarik *et al.* 2004). Zytologisch können solche Interaktionen als NOR-Fusionen sowohl in Meiosen als auch in Mitosen beobachtet werden (Abbildung 1b, d). Die eigentliche Rekombination (*cross-over*) findet in der Interphase statt. Zudem scheinen epigenetische Modifikation und transkriptionale Aktivität, mikroskopisch sichtbar als dekondensierte rDNA (Manuskript III, Herklotz *et al.* 2018, *Figure S2*), die Möglichkeit für Rekombination und Genkonversion zu erhöhen (Lim *et al.* 2000; Kovarik *et al.* 2004; Zozomová-Lihová *et al.* 2014).

Wären Univalenten-Genomteile der Hundsrosen nicht in Rekombination und konzertierte Evolution eingebunden, würden Prozesse die zum *genome downsizing* führen verlangsamt oder teilweise entkoppelt sein. Rekombinationsvermittelte *Deletion* von Repeatmotiven sind wichtige Wege Genome zu verkleinern (Comai 2000; Devos *et al.* 2002; Soltis *et al.* 2015). Wenn Univalente nicht rekombinieren würden, dann müssten sich „Junk“-DNA-Sequenzen anreichern, weil *Deletion* von Repeatmotiven weitestgehend unterbleibt. Wäre diese der Fall, dann sollten Genomgrößen zwischen Arten und

Individuen stark variieren und auch tatsächliche Aneuploidien häufiger vorkommen. Trotz teilweise schlechter CV-Werten in der FCM (Manuskript I, Herklotz & Ritz 2017) kann davon aber nicht ausgegangen werden (Täckholm 1920, 1922; Klášterská 1969; Klášterská & Klášterský 1974). Illegitime interchromosomale Rekombination und homologe intra-strang Rekombination ungleicher *Repeat*-Elemente wie Retrotransposons, DNA-Transposons oder *Simple Repeats* (Comai 2000; Devos *et al.* 2002; Soltis *et al.* 2015) könnten generelle Mechanismen sein, die die Genomgröße der Hundsrosen konstant halten. NGS-Analysen mit **RepeatExplorer** (Novak *et al.* 2013) weisen zunächst auf keine wesentlichen Unterschiede in der Zusammensetzung von Repeat-Elementen zwischen *R. canina*, *R. corymbifera*, *R. inodora* und weiteren Rosen anderer Sektionen hin (Herklotz *et al.* unveröffentlicht). Hier würde eine Phylogenie auf Basis von repetitiven Elementen (Dodsworth, Chase, *et al.* 2015) weitere Erkenntnisse liefern. Prinzipiell wissen wir allerdings viel zu wenig über die Chromosomenevolution in Hundsrosen und deren genomische und zytologische Charakterisierung wird noch viele Jahre der Forschung in Anspruch nehmen.

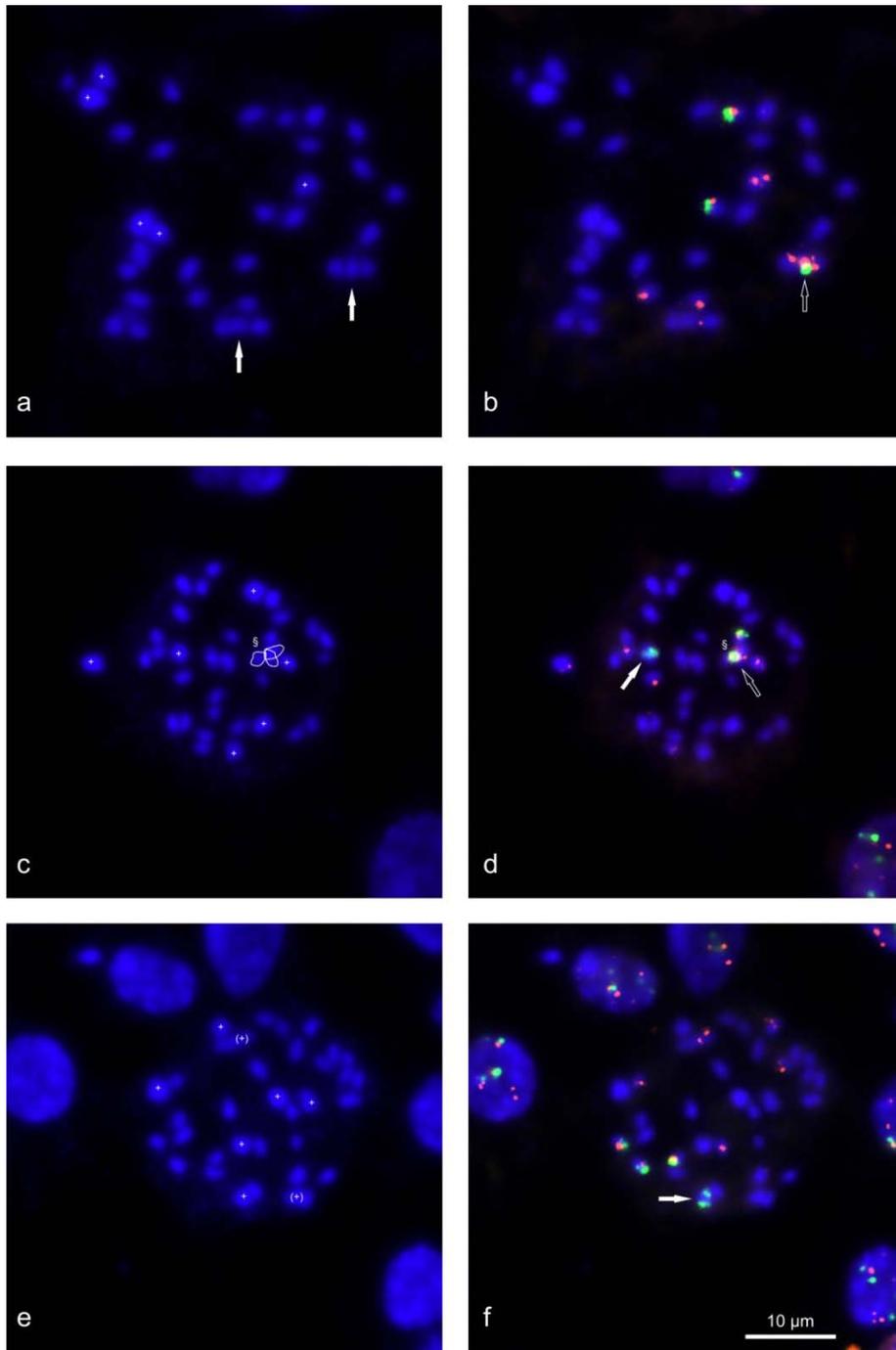


Abbildung 1. Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) mit 18S rDNA (grün) und 5S rDNA (rot) von Diakinesen in der Mikrosporogenese der hexaploiden *R. agrestis* ( $2n = 6x = 42$ ), welche auch in Manuskript III und IV untersucht wurde (Vogt *et al.* 2015; Herklotz *et al.* 2018). Gegengefärbt wurde mit DAPI. **a** Fünf eindeutig zu identifizierende Bivalente (markiert mit weißem Kreuz) und zwei mögliche Trivalente (Pfeile). **b** FISH-Analyse der Platte in a. Der nichtgefüllte Pfeil markiert eine potentielle NOR-Fusion bei Trivalenten **c** Diakinese mit sechs Bivalenten (markiert mit weißem Kreuz). Die weiß umrandeten Chromosomen bilden ein Trivalent (§). **d** FISH-Analyse der Platte in c. Der Pfeil markiert Bivalente Chromosomen mit singulärem 18S rDNA Lokus und der nichtgefüllte Pfeil eine potentielle NOR-Fusion bei Trivalenten (§) **e** Sechs eindeutig zu identifizierende Bivalente (markiert mit weißem Kreuz) und zwei potentiell Bi- oder Trivalente (geklammertes Kreuz). **f** FISH-Analyse der Platte in e. Der Pfeil markiert ein Bivalent mit singulärem 18S rDNA Lokus.

### 3.2 Die Canina-Meiose: Parental fixierte Vererbung oder hybridogen erweiterte Rekombination

Trotz der evolutionären Relevanz von Polyploidie sind die exakten Mechanismen und zellulären Prozesse bei der Entstehung von Polyploiden noch nicht verstanden. Wie verschieden die Chromosomensätze der Univalenten und Bivalenten zwischen den Subsektionen der Hundsrosen sind und welche hybridogen übertragen werden, ist nicht bekannt. Es wird lediglich anhand anekdotischer Mikrosatellitendaten vermutet, dass immer dieselben Chromosomensätze von Pollen übertragen werden und diese die Bivalenten repräsentieren (Nybom *et al.* 2004; Nybom *et al.* 2006; Ritz & Wissemann 2011). Die im Manuskript I (Herklotz & Ritz 2017) identifizierten diagnostischen Allele entsprechen partiell denen anderer Arbeiten (Ritz & Wissemann 2011; Herklotz & Ritz 2014). Allerdings konnten in Herklotz & Ritz (2014) die auf die *Rubigineae*-Hybriden übertragenen diagnostischen *Caninae*-Allele nicht den paternalen Bivalenten zugeordnet werden. Mikrosatellitendaten für den Locus *RhEO506* von Pollen aus einer Dichtegradientenzentrifugation zeigen, dass fast ausschließlich das nicht-diagnostische I-Allel bei *R. canina* und das diagnostische D-Allel bei *R. inodora* amplifiziert wurde (Abbildung 2). Die gleichen Allele wurden auch mit *microsatellite allele counting peak ratios* (MAC-PR, Esselink *et al.* 2004) den Bivalenten zugeordnet (Herklotz & Ritz 2014). Diese beiden Allele repräsentieren sehr wahrscheinlich die jeweiligen Bivalenten-Genome. Überprüfen ließe sich diese Hypothese mit einer statistischen Analyse von scheinbarer Allelhäufigkeit und deren Kombination gegen einen randomisierten Datensatz.

Übertragen auf den großen Datensatz in Manuskript I (Herklotz & Ritz 2017), wo im Locus *RhEO506* das I-Allel (245 bp) zwar sehr häufig aber kein diagnostisches Allel der *Rubigineae*-Hybriden war, vermute ich, dass *Rubigineae* mit Univalenten-Genomteilen der *Caninae* fertilisiert wurden. Diese Hypothese wird auch durch das Vererbungsmuster der 18S/5S-kolokalisierten rDNA-Chromosomen bestärkt (Manuskript III, Herklotz *et al.* 2018). Alternativ

könnten die übertragen Chromosomen in der vorangegangenen Meiose doch gepaart und damit Bivalente gebildet haben. Das würde aber bedeuten, dass entgegen den Ergebnissen der *MAC-PR* und den Daten der Dichtegradientenzentrifugation (Abbildung 2) nicht immer dieselben Chromosomen Bivalente bilden.

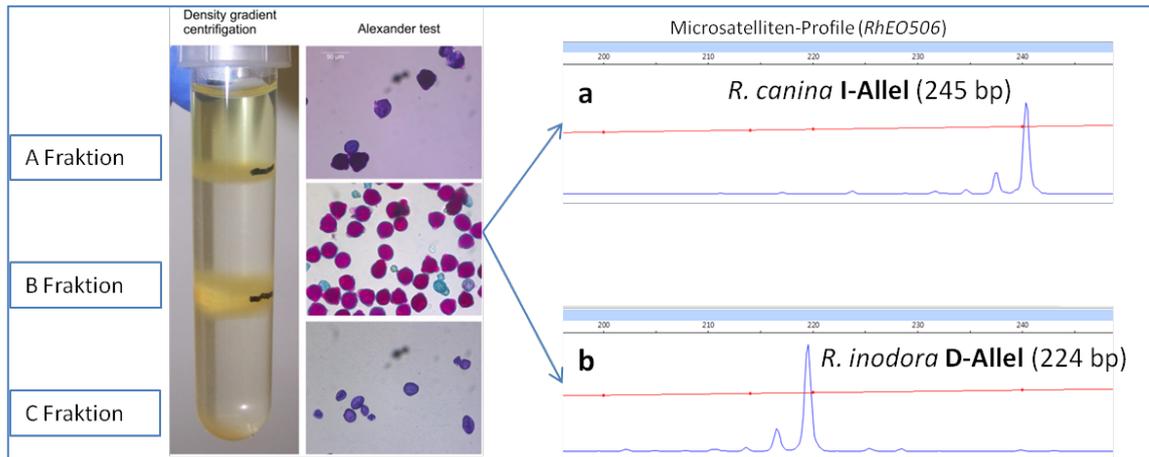


Abbildung 2. Dichtegradientenzentrifugation von Pollen, fraktioniert in drei Phasen (Herklotz et al. unveröffentlicht). Der anschließende Alexander-Test (Alexander 1980) färbte fertile Pollen rot und degenerierte in grün bis lila. Die Amplifikation des Mikrosatelliten *RhEO506* von Pollen-DNA aus der Fraktion B zeigte nur ein Allel, welches vermutlich das jeweilige Bivalenten-Genom von *R. canina* (a) bzw. *R. inodora* (b) repräsentiert.

Das D-Allel (224 bp) aus den *Rubigineae* wurde als diagnostisch für *Caninae*-Hybriden klassifiziert (Manuskript I, Herklotz & Ritz 2017, *supplement Table S2*). Demnach könnten die homoploiden  $5x$  *Caninae*-Hybriden zwei unterschiedliche Bivalenten-Chromosomensätze haben. Verschiedene Bivalenten-Chromosomensätze könnten die Fertilität der  $5x$  *Caninae*-Hybriden herabsetzen und deren selektive Benachteiligung oder zumindest deren geringere Abundanz erklären. Ob das die Meiose beeinträchtigt und welche Chromosomen in homoploiden Primärhybriden tatsächlich meiotisch paaren, sollte Gegenstand weiterer zytologischer Forschung sein.

Univalenten-Chromosomensätze, die auf nicht reduzierte Eizellen der *Rubigineae* übertragen werden, könnten post-zygotisch weniger genomische und transkriptomische Interferenzen verursachen, weil sie bereits im Donor nicht rekombinierten und möglicherweise partiellem *silencing* und *down regulation* unterlagen. Hinweise auf *silencing* und *down regulation* der

Univalenten in Hundsrosen gibt es in Studien zur rDNA (Khaitová et al. 2010, 2014, Manuskript III, Herklotz et al. 2018). Allgemein wurde präferierter Genverlust und genomische Dominanz eines Elterngenoms in vielen Allopolyploidien beobachtet (Tate 2006; Matyášek et al. 2007; Woodhouse et al. 2010, 2014; Wang et al. 2013).

Selektiv begünstigt könnten Hybriden sein, die aus einer nicht reduzierten Eizelle mit einer bereits funktionierenden genetischen Konstitution (homologer Bivalente) hervorgingen und einen zusätzlichen hybridogenen Univalenten-Chromosomensatz beinhalten. Das würde die fortlaufende evolutionäre Historie der *Caninae s.l.* abbilden, welche aus multiplen Hybridisierungsereignissen entstanden sind (Ritz et al. 2005; Kovařík, Werlemark, et al. 2008; Zhang, Esselink, et al. 2013; Fougère-Danezan et al. 2015). Dennoch wird ein zusätzlicher Univalenten-Chromosomensatz Effekte haben.

Wie in Manuskript IV (Vogt et al. 2015) gezeigt werden konnte, sind Gene der Univalenten-Genomteile keineswegs inaktiv. Expressionsmuster (cDNA-AFLP) aus den Sepalen der Hybriden zeigen zu gleichen Anteilen maternale und paternale Fragmente an (Manuskript IV, Vogt et al. 2015, Figure 1E, F). Die phänotypische Ausprägung der Kelchblatthaltung deutet aber auf eine rein paternale Vererbung des Merkmals hin (Ritz & Wissemann 2003). Dieses Phänomen könnte mit genomischer Prägung (*genomic imprinting*) erklärt werden, demzufolge die paternal vererbten Allele zur Ausbildung der Kelchblatthaltung aktiver sein könnten (Pires & Grossniklaus, 2014; Manuskript IV, Vogt et al., 2015). In anderen Organen überwiegen erwartungsgemäß maternal transkribierte Elemente (4:1 in 5x Hybriden, 5:1 im 6x Hybrid). Ergebnisse von Khaitová et al. (2010) weisen jedoch auf ein *silencing* einiger univalenter rDNA-Loci hin. Ebenfalls wurde eine stärkere Methylierung in *Rubigineae*-Genomen gefunden, was auf ein mögliches Gen-*silencing* hindeutet (Rapp & Wendel 2005).

Die genetische Komposition und Expression der *nrITS-1*-Ribotypen unterscheidet sich zwischen den Elternarten *R. canina* und *R. inodora*

(Manuskript III, Herklotz *et al.* 2018, *Figure 5*). Basierend auf NGS-Daten von *nrITS-1*-Amplicons aus genomischer DNA und cDNA konnten wir zeigen, dass in *R. canina* Ribotypen der Canina-Gruppe am häufigsten vorkamen (73%) und diese exklusiv transkribiert wurden (Manuskript III, Herklotz *et al.* 2018, *Figure 5a, b*). Dagegen dominierte der Rubiginosa-*nrITS-1*-Ribotyp in *R. inodora* (93%) und wurde ausschließlich exprimiert (100%, Manuskript III, Herklotz *et al.* 2018, *Figure 5c, d*). In den genomischen Amplicons der hybridogenen  $5x$  *R. dumalis* (*Caninae*  $\times$  *Rubigineae*) wurden 25% Rubiginosa-*nrITS-1*-Ribotypen detektiert (Manuskript III, Herklotz *et al.* 2018, *Figure 5e*), was in etwa dem erwarteten 4:1 Vererbungsmuster entspricht. In den cDNA-Amplicons von *R. dumalis*, welche die Transkription reflektieren, wurden dagegen nur 1,2% Rubiginosa-Typen gefunden (Manuskript III, Herklotz *et al.* 2018, *Figure 5f*). Diese Ergebnisse lassen auf ein *silencing* der nrRNA-Gene auf dem paternal (von *R. inodora*) vererbten Bivalenten-Chromosomensatz schließen. Das steht im Kontrast zu den Ergebnissen der cDNA-AFLPs (Manuskript IV, Vogt *et al.* 2015). Eine Homogenisierung, also konzertierte Genomevolution, in Richtung der Canina-Ribotypen war aber nicht festzustellen. Ein mögliche Erklärung könnten fehlende Homologien der beiden Bivalenten-Chromosomensätze in der homoploiden Hybride *R. dumalis* sein.

Erstaunlicherweise zeigt sich in der allopolyploiden  $6x$  *R. agrestis* (*Rubigineae*  $\times$  *Caninae*), welche homologe Bivalente besitzen sollte, eine nukleare Dominanz und eine Homogenisierung in Richtung der Canina-Ribotypen (Manuskript III, Herklotz *et al.* 2018, *Figure 5g*). Entsprechend der diagnostischen Mikrosatelliten-Allele könnten Univalenten-Genomteile des *Caninae*-Pollenelterns auf die  $6x$  *R. agrestis* übertragen worden sein (siehe oben). Um eine Homogenisierung zu bewerkstelligen, müssten Univalente aber rekombinieren. Nybom *et al.* (2006) sahen Hundsrosen als quasi diploidisiert an, wobei Univalente als „Passagiergenome“ bezeichnet wurden. Die hier gezeigten Ergebnisse stützen eine Passivität der Univalenten-Genome nicht (Manuskript IV, Vogt *et al.* 2015, Manuskript III, Herklotz *et al.* 2018). Möglicherweise sind

die einzelnen Subgenome der Hundsrosen ähnlicher als angenommen oder es gibt noch unbekannte zytologische Mechanismen, die Rekombination und Homogenisierung ermöglichen. Beispielsweise könnte durch kompensierte Aneuploidie (Chester *et al.* 2012; De Storme & Mason 2014) ein homeologes gegen ein homologes *NOR*-Chromosom ausgetauscht worden sein, was in den FISH-Analysen nicht auffallen würde. Illegitime Rekombination und inäquales Crossing-over (Smith 1976) von homeologen Chromosomen(segmenten) bzw. rDNA-Loci können ebenfalls stattfinden, wie es in *R. rugosa* und *R. multiflora* innerhalb von *TIR-NBS-LRR*-Genen gefunden wurde (Terefe-Ayana *et al.* 2012). Die von mir beobachteten meiotischen NOR-Fusionen (Abbildung 1b, d) in der 6x *R. agrestis* zeigen eine Interaktion von rDNA-Loci, wodurch Homogenisierung der Univalenten-NORs prinzipiell möglich wäre. Bourke *et al.* (2017) benutzen eine hochauflösende *linkage map* homologer Chromosomen von tetraploiden *R. hybrida* um zu demonstrieren, dass sowohl elternspezifische Paarung homologer Chromosomen als auch tetrasomisches Meioseverhalten vorkommt. Demnach könnten Rekombinationen zwischen Bivalenten- und Univalenten-Genomteilen in Hundsrosen nicht unwahrscheinlich sein. Kovařík *et al.* (2008) leiteten eine mögliche Rekombination von Univalenten aus der geringen Sequenzdiversität von *nrITS-1*-Typen ab. Viele Studien zu natürlichen Neo-Allopolyploiden legen nahe, dass diese eine andauernde Phase von Aneuploidien und genomischer Neuorganisation durchlaufen bevor sich genomische Stabilität einstellt (Chester *et al.* 2012; De Storme & Mason 2014). Bei der homoploiden Hybride *R. agrestis* (5x) deuten 13 von 18 Klonen mit Canina-Ribotyp auf dessen nukleare Dominanz hin (Manuskript III, Herklotz *et al.* 2018, Figure 6b). Eine Homogenisierung könnte, ähnlich wie bei *R. dumalis*, durch fehlende Homologie der unterschiedlichen Bivalenten-Chromosomensätze unterbunden worden sein.

Prinzipiell wären auch nicht reduzierte 2x Pollen mit einem Bivalenten- und einem Univalenten-Donor-Genom bei der allopolyploiden Hybridbildung der 6x *R. agrestis* möglich (Abbildung 3). In den populationsgenetischen Daten sind

folgende allelische Phänotypen (*RhEO506*) häufig vorhanden: BDFI (*Rubigineae*), ACEI (*Caninae*) und BDEFI (*Rubigineae* × *Caninae*, 6x Hybride) (Manuskript I, Herklotz & Ritz 2017, *supplement Table S2*). Hypothetisch würde aus einem somatischen Genotyp **BDDFI** (Herklotz & Ritz 2014) einer *Rubigineae* eine reduzierte Eizelle **BDFI** werden (Abbildung 3). Diese könnte mit einem 2x Pollen **IE** einer *Caninae* ACE**II** fertilisiert werden und dann den hexaploiden Hybriden **BDEFII** bilden (Abbildung 3). Das würde eine Verschiebung der Bivalenten-Allele bzw. -Genome von DD auf II bedeuten. Nur nahezu gleiche Subgenome könnten derart ausgetauscht werden. Dagegen spricht, dass in Herklotz und Ritz (2014) mit der *MAC-PR* Methode (Esselink *et al.* 2004) der Genotyp **BDDEFI** in hybridogenen 6x *R. agrestis* ermittelt wurde. Inwieweit die Mikrosatelliten-Allele tatsächlich an einzelne Subgenome gekoppelt sind ist nicht bekannt.

Vergrößerte Pollenkörner sind ein Indiz für Polyploidie (Ramsey & Schemske 1998; Crespel *et al.* 2006; Ramsey 2007; Pecrix *et al.* 2011; De Storme *et al.* 2013) und wurden auch von mir in *R. canina* beobachtet (Herklotz *et al.* unveröffentlicht, Abbildung 4). Nybom *et al.* (2006) zeigten an synthetischen Hundsrosen-Hybriden eine Fertilisation durch nicht reduzierte Eizellen und durch 2x Pollen. Anhand von Mikrosatelliten-Daten wurde vermutet, dass eine künstliche Hybride (*R. rubiginosa* × *R. micrantha*) wahrscheinlich aus nicht reduzierten 2x Pollen hervorging (Ritz & Wissemann 2011). Dokumentierte Hybridisierung mit nicht reduzierten Gameten beider Geschlechter gibt es bspw. für *Cardamine* (Mandáková *et al.* 2013). Allopolyploidien mit nicht reduzierten Pollen wurden beschrieben für *Populus* (Müntzing 1936; Bradshaw & Stettler 1993), *Alstroemeria* (Ramanna *et al.* 2003) oder *Brassica* (Mason *et al.* 2011).

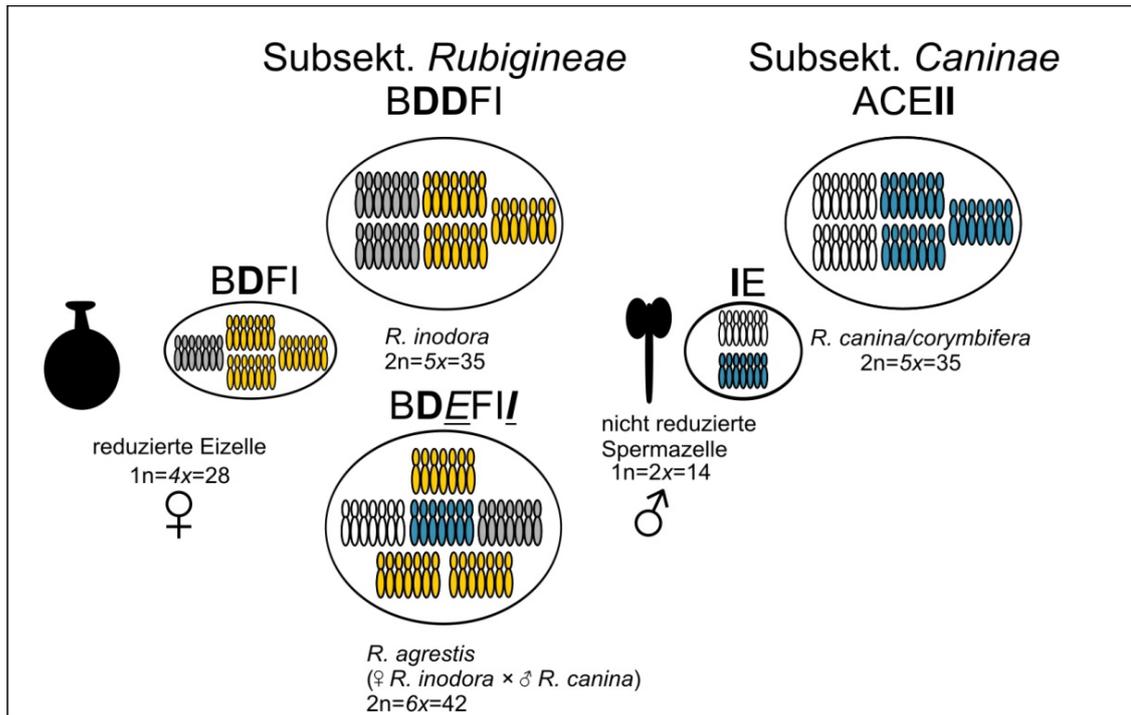


Abbildung 3. Hypothetisches Schema zur Entstehung der allopolyploiden  $6x$  *R. agrestis* (*Rubigineae* × *Caninae*) unter Beteiligung eines nicht reduzierten  $2x$  Pollen. Die mutmaßlichen Allelkonfigurationen im Locus *RhEO506* sind mit Großbuchstaben dargestellt. Fettgedruckte Allele repräsentieren Bivalenten-Genome und unterstrichen-kursive Allele zeigen die hybridogen übertragene Subgenome durch einen nicht reduzierten *Caninae*-Pollen an.



Abbildung 4. Potentiell diploides Pollenkorn (Pfeil) und zwei durchschnittlich große Pollenkörner von *R. canina*, beobachtet unter einem Lichtmikroskop (Leica®) bei 400facher Vergrößerung. Die Pollen wurden mit Alexander-Test gefärbt (Alexander 1980).

Die untersuchten Meiosen in Manuskript III (Herklotz et al. 2018, *Figure 3*) zeigen Diakinesen in der Pollenentwicklung von *R. canina* und *R. inodora*. In beiden Spezies finden sich jeweils zwei Markerchromosomen, die kolokalisiert 18S/5S rDNA Loci tragen. In *R. canina* bilden diese homologe Bivalente,

wohingegen sie in *R. inodora* als Univalente vorliegen. Karyotypisch sehen sich diese Chromosomen sehr ähnlich. Ich postuliere, dass diese Markerchromosomen in *R. inodora* auch homolog sind und denselben Ursprung haben wie jene in *R. canina*, aber in *R. inodora* keine Bivalenten bilden. Sie könnten sogar ein diploides Vorläufergenom der *Caninae s.l.* repräsentieren. Entsprechend der Mikrosatellitenkonstitution eines nicht reduzierten Pollens IE (Abbildung 3), wäre es vorstellbar, dass  $2x$  Pollen von *R. canina* einen Bivalenten-Chromosomensatz (mit 18S/5S Markerchromosom) und einen zusätzlichen Univalenten-Chromosomensatz übertragen. In Mitosen der hybridogenen  $6x$  *R. agrestis* wurden jedoch nicht drei, sondern nur zwei 18S/5S-Kolokalisierungen gefunden (Manuskript III; Herklotz et al. 2018, *Figure 2*). Dadurch erscheint der Hybridisierungsweg über nicht reduzierte  $2x$  Pollen als unwahrscheinlich.

Häufiger beschrieben sind Allopolyploidien in Verbindung mit nicht reduzierten Eizellen (Soltis & Soltis 2000; Weiss-Schneeweiss *et al.* 2013). Auch bei der Verschmelzung einer nicht reduzierten Eizelle des *Rubigineae*-Elter (BDDFI) mit einem  $1x$  Pollen würden drei Chromosomen mit kolokalisierten 18S/5S rDNA Loci in der FISH-Analyse der  $6x$  *R. agrestis* zu finden sein (Manuskript III, Herklotz et al. 2018, *Figure 7a*). In diesem Szenario würde der  $1x$  Pollen ein Bivalenten-Genom (I) inklusive eines 18S/5S Markerchromosoms übertragen, weil in der Diakinese von *R. canina* (Manuskript III, Herklotz et al. 2018, *Figure 3a*) zwei 18S/5S Markerchromosomen Bivalente bildeten.

Besser erklären lassen sich die zwei 18S/5S-Markerchromosomen in den *Rubigineae*-Hybriden (Manuskript III; Herklotz et al. 2018, *Figure 2d, e*), wenn ein Univalenten-Chromosom(ensatz) mit singulären 18S rDNA Locus durch den Pollen übertragen wurde. Nachträglich konnte ich Diakinesen in der  $6x$  *R. agrestis* beobachten und damit zeigen, dass wie in *R. inodora* (Manuskript III, Herklotz et al. 2018, *Figure 3b*) zwei Chromosomen mit singulärem 18S rDNA Locus Bivalente bilden (Abbildung 1d, f). Interessanterweise tauchen in der Diakinese der  $6x$  *R. agrestis* drei Markerchromosomen mit 18S/5S

kolokalisierten rDNA Loci auf. Eine mögliche Erklärung wäre, dass sich Blütengewebe (Diakines, Abbildung 1f) und Wurzelspitzen (Mitose, Manuskript III, Herklotz et al. 2018, *Figure 2e*) hinsichtlich der rDNA-Komposition unterscheiden. Wahrscheinlicher ist aber ein methodischer Hintergrund, da die 5S-rDNA-Loci sehr klein und vielfach schwer zu detektieren sind. Bei *in-situ* Hybridisierungen auf Chromosomenpräparaten aus Wurzelspitzen gibt es häufig starke Hintergrundsignale der Fluoreszenzfärbung. Dadurch könnten FISH-Ergebnisse fehlinterpretiert worden sein und eine 18S/5S-Kolokalisation fehlen. Die Chromosomenpräparation aus Blütengeweben wurde erst später etabliert und Blütenteile scheinen dafür geeigneter als Wurzelspitzen zu sein. Sollten tatsächlich drei Markerchromosomen mit 18S/5S kolokalisierten rDNA-Loci in 6x *R. agrestis* vorhanden sein, vereinfacht sich die Interpretation der Vererbungsmuster. Es würde die Hypothese der Übertragung **eines** Bivalenten-Chromosomensatzes inklusive 18S/5S-Kolokalisation durch einen 1x Pollen von *R. canina* favorisieren (Manuskript III, Herklotz et al. 2018, *Figure 7a*).

Außerdem wurden Multi- bzw. Trivalente in Diakinesen der 6x *R. agrestis* beobachtet (Abbildung 1a, c). Durch die potentielle Homologie der Subgenome der *Caninae s.l.* und die hybridogene Konstitution der 6x *R. agrestis* (BDDEFI) ist ein irreguläres Meioseverhalten nicht unwahrscheinlich. Weitere Untersuchungen der meiotischen Mikrosporogenese in *R. inodora* und *R. agrestis* (6x) zeigten vielfach Anomalien, wie Exklusionen einzelner Chromosomen oder mutmaßlich ganzer Chromosomensätze (Abbildung 5). Auch Pollen mit Chromosomen aus verschiedenen Subgenomen wären bei derart irregulären Meiosen denkbar. Zugrunde liegen könnten dabei Mechanismen, die zu einer kompensierten Aneuploidie führen wie im tetraploiden *Tragopogon miscellus* oder in künstlichem allohexaploidem Weizen (Chester et al. 2012; Zhang, Bian, et al. 2013; De Storme & Mason 2014). In Verbindung mit der Canina-Meiose würde die Komplexität solcher Vorgänge jedoch zunehmen, da die Subgenome der *Caninae s.l.* sehr ähnlich sein können und dadurch

prinzipiell Chromosomen zwischen fünf verschiedenen Subgenomen getauscht werden könnten.

Die Bildung von Tetravalenten in der Meiose und anschließender tetrasomischer Vererbung wurden in einer Vielzahl von autopolyptoiden Spezies beobachtet (De Storme & Mason 2014). Die potentielle oder partielle Homologie der einzelnen Subgenome der Hundsrosen, oder zumindest ihre mögliche Kompatibilität, und ihre limitierte postzygotische Isolation beschreiben sehr eindrucksvoll die Probleme bei der Differenzierung zwischen Auto- und Allopolyploidie (Tate *et al.* 2005; Doyle & Sherman-Broyles 2017). Nach Ramsey & Schemske (2002) sind Multivalente und nicht-präferenzierte Chromosomenpaarung zytologische Kriterien für Autopolyploidie. Die Vererbung in Hundsrosen folgt einer Mischung von disomischer und multisomischer Vererbung (Soltis *et al.* 2016; Doyle & Sherman-Broyles 2017). Ich würde daher dafür plädieren, Hundsrosen nach zytologischen Kriterien zumindest als segmentale Allopolyploide zu bezeichnen.

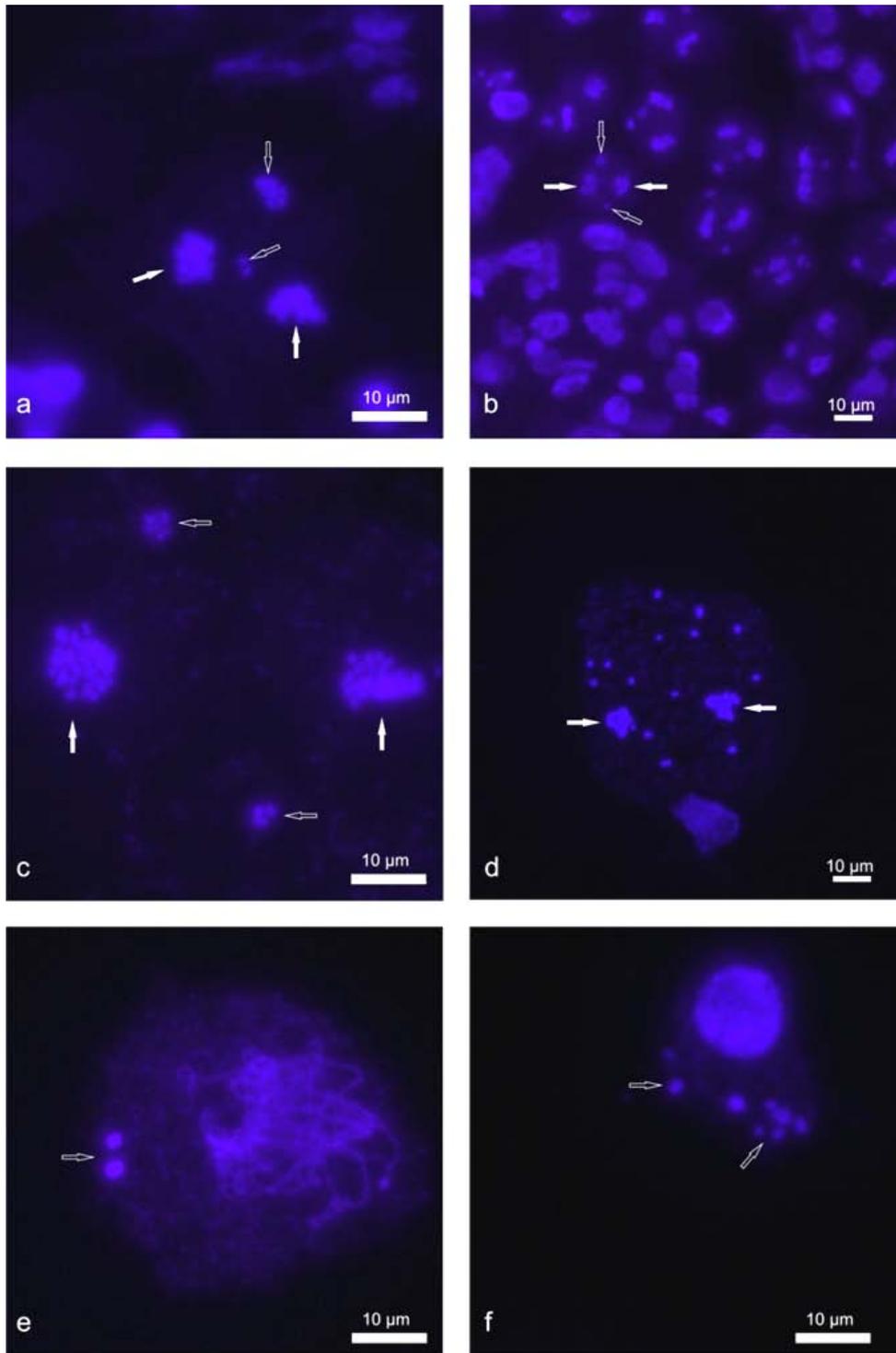


Abbildung 5. Mikroskopie irregulärer Meiosestadien der Mikrosporgenese in *R. inodora* (**a**, **b**) und der *6x R. agrestis* (**c-f**) angefärbt mit DAPI. **a** Anaphase I mit Bivalenten-Chromosomen und Univalenten-Chromatiden an den beiden Spindelpolen (gefüllte Pfeile) und in der Äquatorialebene verblieben Chromosomen (leere Pfeile). **b**, **c** Anaphase I von Pollenmutterzellen (PMC) mit Bivalenten-Chromosomen und Univalenten-Chromatiden an den Polen (gefüllte Pfeile) und aus der Teilung ausgeschlossenen Chromosomen in der Äquatorialebene. **d** Anaphase I mit Bivalenten-Chromosomen und Univalenten-Chromatiden (gefüllte Pfeile) und in der Platte verteilten Chromosomen (leere Pfeile). **e** Prophase I und Interphasenkern (**f**) mit vorzeitig kondensierten Chromosomen (leere Pfeile).

### 3.3 Selektive Kompensation asymmetrischer Allopolyploidie

Ein hybridogener Ursprung der Sektion *Caninae* und ihrer Vertreter, ebenso wie häufige rezente Hybridisierungsereignisse wurden seit langem postuliert (Christ 1873; Täckholm 1920, 1922; Keller 1931). Diese Hypothese untermauerten molekulare Studien an einzelnen Populationen (Schanzer & Vagina 2007; Schanzer & Kutlunina 2010; Ritz & Wissemann 2011; Kellner *et al.* 2012; Herklotz & Ritz 2014). In der vorliegenden Arbeit wurde mit populationsgenetischen Methoden das Vorkommen spontaner Hybriden bei Hundsrosen untersucht (Manuskript I, Herklotz & Ritz 2017). Es konnte gezeigt werden, dass spontane Hybridisierung bei Hundsrosen stattfindet. Dabei entstehen Hybriden unabhängig voneinander immer wieder neu (*polytopic origin*). Dies begünstigt möglicherweise ihren Fortbestand, da Hybriden mit monotypem Ursprung (z.B. *Spartina anglica*, Raybould *et al.* 1991) trotz ihres teilweise invasiven Charakters schon rein statistisch benachteiligt sind.

Der Fortbestand multipel entstandener Hybriden unterliegt der Selektion (Ramsey & Schemske 2002; Segraves 2017). Die im Manuskript I (Herklotz & Ritz 2017) beschriebene asymmetrische, zu Gunsten der *Rubigineae*-Hybriden verschobene Hybridisierungsrichtung könnte Ausdruck von Selektion sein. An künstlich erzeugten homoploiden *Helianthus*-Hybriden wurde gezeigt, dass Selektion bei unabhängig erzeugten Linien zu ähnlicher genomischer Konstitution führte (Rieseberg *et al.* 1996). Ob die zu Gunsten der *Rubigineae* verschobene Hybridisierungsrichtung (Manuskript I, Herklotz & Ritz 2017) in Zusammenhang mit einer gerichteten Selektion steht, wäre eine Fragestellung für zukünftige Forschung. Die höhere Abundanz der *Caninae* und das damit einhergehende Überangebot an *Caninae*-Pollen könnte auch die asymmetrische, zu Gunsten der *Rubigineae*-Hybriden verschobene Hybridisierungsrichtung erklären. Ergebnisse, die auf einen Abundanzeffekt bei asymmetrischer Introgression hinweisen gibt es beispielsweise für *Eucalyptus* und *Morus* (Burgess *et al.* 2005; Field *et al.* 2011). Mercure & Bruneau (2008) erforschten in Nordamerika spontane Hybriden zwischen der diploiden *R. rugosa* Thunb.

und *R. blanda* Ait. Sie beobachten ebenfalls eine asymmetrische Hybridisierungsrichtung, bei der *R. rugosa* als maternaler Elter favorisiert wurde. Eine umgekehrte Situation wurde bei Hybriden aus *R. mollis* Sm. und *R. rugosa* beobachtet (Kellner *et al.* 2012).

Generell können asymmetrischen Kreuzungsbarrieren mit prä- und postzygotischer Isolation erklärt werden (Tiffin *et al.* 2001). Bei Rosen ist präzygotische Isolation unwahrscheinlich, da ihre Blühphasen sehr lang sind und sich überschneiden. Zudem hybridisieren sie bekanntermaßen häufig (Henker 2000). Die *Rubigineae*-Hybriden sind, im Gegensatz zu den *Caninae*-Hybriden, vorwiegend aus nicht reduzierten Gameten entstanden, was eine Erhöhung der Ploidiestufe zur Folge hatte (Manuskript I, Herklotz & Ritz 2017). Die Effekte von Neo-Allopolyploidie, wie „*genomic shock*“, „*transcriptomic shock*“, Irritationen in Mitosen und Meiosen und Fertilitätsverlust (McClintock 1984; Buggs *et al.* 2011; De Storme & Mason 2014; Soltis *et al.* 2015) könnten durch die vorhandenen homologen Chromosomensätze (Bivalente) aus nicht reduzierten Gameten abgepuffert werden.

Es ist bekannt, dass bei Autopolyploiden keine solchen starken genomischen Effekte auftreten, weil homologe Chromosomen(sätze) verfügbar sind (Spoelhof *et al.* 2017). Allgemein wird für genetische Konstitutionen, die ähnlich asymmetrisch sind wie in Hundsrosen (z.B. *Onosma*), ein stabilisierender Effekt durch vorhandene Homologe vermutet (De Storme & Mason 2014; Kolarčik *et al.* 2014). Bei Hundsrosen handelt es sich um sogenannte „*asymmetrically compensating allopolyploids*“, wie es auch von *Leucopogon juniperinus* R.Br., *Andropogon ternatus* L. und der Gruppe *Onosma helvetica* Boiss. bekannt ist (Norrman & Quarín 1987; Greilhuber & Doležel 2009). Auch bei Vertebraten gibt es ähnliche Phänomene (z.B. Stöck *et al.* 2002).

Die genomischen und transkriptomischen Probleme, die durch Allopolyploidie hervorgerufen werden, wie z.B. „*genomic shock*“ und eine Veränderung der Gendosisbalance (Birchler *et al.* 2005) werden in „*asymmetrically compensating allopolyploids*“ nicht nur durch die asymmetrische meiotische Verteilung von

homologen und homeologen Chromosomen(sätzen) kompensiert. Es müssen weitere genregulatorische Mechanismen die asymmetrische Gendosis in diesen heterogametischen Allopolyploiden beeinflussen. Das kompensatorische Potential, welches durch die multiple hybridogene Entstehung der Hundsrosen (Ritz *et al.* 2005; Kovařík, Werlemark, *et al.* 2008; Zhang, Esselink, *et al.* 2013; Fougère-Danezan *et al.* 2015) vorhanden sein sollte, könnte auch rezente Hybridisierung in Hundsrosen vorteilhaft machen.

Ein weiteres Mittel um genomische und transkriptomische Irritationen zu reduzieren, ist die Hybridbildung unter Beteiligung von nicht reduzierten Gameten. Dadurch können homologe Chromosomen (Bivalente) aus einem Elter das Hybridgenom stabilisieren (De Storme & Mason 2014; Mason & Pires 2015). Die Produktion nicht reduzierter Gameten steigert sich, wenn die Selektion gegen genomische Stabilität von Gameten sinkt, wie es in Organismen mit asexueller Reproduktionsstrategie der Fall ist (Kreiner *et al.* 2017). Diese Aussage trifft in zweierlei Hinsicht auch auf Hundsrosen zu: Sie sind *semi*-apomiktisch, weil in der Canina-Meiose univalente Genomteile asexuell vererbt werden und ihre Pollenfertilität tatsächlich sehr gering ist (Herklotz & Ritz 2014). Homologe Chromosomensätze, die durch nicht reduzierte Gameten bei der Hybridisierung übertragen wurden, machen genomische Stabilität und sexuelle Fortpflanzung durch eine funktionierende Meiose wahrscheinlicher (De Storme & Mason 2014). In den *Rubigineae*-Hybriden sind diese homologen Chromosomensätze durch die Bivalenten repräsentiert und wurden durch die nicht reduzierte Eizelle übertragen. Ein selektiver Vorteil gegenüber Hybriden mit gleichbleibender Ploidiestufe, wie es vorwiegend bei den *Caninae*-Hybriden der Fall ist, wäre daher denkbar.

Die Bildung nicht reduzierter Gameten ist nicht nur von genetischen Faktoren abhängig, sondern auch von Umwelteinflüssen (De Storme & Mason 2014; Wang *et al.* 2017). Dabei scheint die Temperatur eine besondere Rolle zu spielen. Pecrix *et al.* (2011) zeigten für diploide Rosen einen gesteigerten Anteil an nicht reduzierten Pollen bei erhöhter Temperatur. Die Autoren vermuten

ebenfalls eine Temperatursensibilität in der Megasporogenese. Nachgewiesen wurden hitzebedingte  $2n$  Megasporen für *Populus* L. (Wang *et al.* 2012; Lu *et al.* 2013), *Eucommia ulmoides* Oliv. (Li *et al.* 2016) und *Medicago sativa* L. (Barcaccia *et al.* 1997). Auch ein Zusammenhang von kurz auftretenden Umweltextremen und der Bildung nicht reduzierter Gameten wird schon seit längerem vermutet (Hagerup 1931). Starke Schwankung bei abiotischen Umweltfaktoren werden auch in Verbindung gebracht mit dem häufigeren Auftreten von Polyploidien in temperierten, polaren und montanen Gebieten (Mable 2004).

Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass *Rubigineae* an warme und sonnenexponierte Standorte angepasst sind (Henker 2000) und womöglich auch deshalb vermehrt zur Bildung von nicht reduzierten Eizellen neigen. Ein Nord-Süd-Gradienten von hexaploiden *Rubigineae* konnte über ihre großräumige geographische Verbreitung im gesamten mittel- und südosteuropäischen Untersuchungsgebiet nicht gefunden werden (Manuskript I, Herklotz & Ritz 2017). Betrachtet man aber nur die deutschen Populationen, so zeigt sich ein deutlich stärkeres Auftreten in den wärmebegünstigteren südlichen Landesteilen (Manuskript II, Herklotz *et al.* 2017). Um die Hypothese einer Temperatursensibilität zu belegen, wäre ein Vergleich der Ploidiestufen in Abhängigkeit von Klimadaten der Mikrohabitate notwendig. Alternativ könnten die Mikrohabitate auch durch vegetationskundliche Untersuchungen und die Zeigerwerte der vorkommenden Arten charakterisiert werden.

Die genetischen und phänotypischen Veränderungen, die mit Allopolyploidisierung einhergehen, haben direkten Einfluss auf die Ökologie der neuen Linien (Segraves 2017) und können zu einer größeren biotischen und abiotischen Toleranz führen (Van de Peer *et al.* 2017). Nischendifferenzierung zwischen Elternarten und Neopolyploiden erhöht die Möglichkeit mit anderen neopolyploiden Individuen Nachkommen zu bilden, was als ein wesentlicher Faktor ihrer Etablierung verstanden wird (Barker *et al.* 2016). Theodoridis *et al.* (2013) zeigten beispielsweise eine ökologische Differenzierung zwischen

Vertretern unterschiedlicher Ploidiestufen bei *Primula* sect. *Aleuritia*. Entgegengesetzt einer erwarteten Nischenverschiebung zwischen Polyploiden und ihren diploiden Vorläuferspezies, zeigten Glennon *et al.* (2014) Muster von konservierten und verengten Nischen in Neopolyploiden. Marchant *et al.* (2016) fanden ebenfalls Sympatrie und Nischenüberlappung in Neoallopolyploiden. In Anbetracht der Verbreitung und Abundanz von Hundsrosen (Henker 2000; Kurtto *et al.* 2004), inklusive potentieller Spontanhybriden, gibt es keine klare Nischedifferenzierung zwischen den beiden Subsektionen. Klimatische Standortfaktoren der *Rubigineae* überschneiden sich mit denen der *Caninae* s. str., da beide an warmen sonnenexponierten Standorten vorkommen. Bei den *Caninae* s. str. kann man tendenziell aber eine größere Toleranz hinsichtlich des Standortklimas vermuten, da sie von trockenen sonnenexponierten bis frischen schattigen Standorten vorkommen und generell eine größere Abundanz und Verbreitung haben (Henker 2000). Insbesondere *R. canina* hat eine große genetische Diversität, ist mit Abstand die häufigste Hundsrose und in nahezu jeder Hundsrosenpopulation zu finden (Henker 2000; Jürgens *et al.* 2007; De Riek *et al.* 2013; Manuskript I, Herklotz & Ritz 2017). Ihr hohes ökologisches Adaptionspotential spricht für eine polyploidiebedingte Toleranzerweiterung (Van de Peer *et al.* 2017). Der hybridogene Ursprung und die unterschiedliche Kombination von Subgenomen in *Caninae* und *Rubigineae* könnten eine Rolle bei deren Toleranzspektren spielen. Bei den *Caninae* s. str. könnte ein möglicherweise methodisch unterschätzter homoploider Hybridanteil aus anderen (Sub)Sektionen von *Rosa* eine ökologische Differenzierung unbemerkt lassen (Manuskript I, Herklotz & Ritz 2017). Eindeutige Aussagen über die Ökologie von Hundsrosen und ihren Hybriden können letztendlich aber nur auf Basis belastbarer Daten geschehen.

### 3.4 Taxonomie der Hundsrosen

Die Sektion *Caninae* kann sowohl durch morphologische Merkmale charakterisiert werden, als auch durch die Canina-typische Meiose. Die

Ploidiestufe stellt ebenfalls ein Merkmal dar. In den hier untersuchten Subsektionen *Caninae* und *Rubigineae* war Pentaploidie ( $2n = 5x = 35$ ) vorherrschend, gefolgt von hexaploiden Zytotypen ( $2n = 6x = 42$ ) meist in Subsekt. *Rubigineae* und wenigen Ausnahmen von Tetraploidie ( $2n = 4x = 28$ ) in Subsekt. *Caninae* (Manuskript I, Herklotz & Ritz 2017). Morphologische Unterschiede können durch kleine genetische oder epigenetische Änderungen in wenigen Genen bedingt sein. Deshalb kann nicht erwartet werden, dass neutrale Mikrosatellitenmarker zwischen sehr eng verwandten Arten unterscheiden (Winfield *et al.* 2003). Weil auch Umweltfaktoren morphologische Merkmale beeinflussen können, sind phänotypische Variationen nicht immer direkt auf einen genetischen Hintergrund zurück zu führen (Nybom *et al.* 1997). Morphologisch und genetisch klar getrennt sind die beiden Subsektionen und innerhalb der *Rubigineae*, das *R. elliptica* Aggregat vom *R. rubiginosa* Aggregat (Manuskript I, Herklotz & Ritz 2017; Manuskript II, Herklotz *et al.* 2017). Die Eckarten *R. agrestis* und *R. micrantha*, welche sich in dem L-Typ zusammenfassen lassen (Reichert 1998; Henker 2000), können morphologisch und teilweise auch durch Mikrosatelliten und Ploidiestufen von den Arten des L/D- und D-Typs unterschieden werden. Unbefriedigend ist nur, dass die L-Typen-Arten *R. micrantha* und *R. agrestis*, wie auch die L/D-Typ-Art *R. inodora*, nicht-hybridogene Pentaploide und hexaploide Primärhybriden beinhalten. In *R. micrantha* wurden 52%, in *R. agrestis* und *R. inodora* jeweils 44% der Individuen als Hybriden klassifiziert. Für verschiedene Kleinarten und Varietäten liegen sehr wenige Daten vor. An dieser Stelle sei aber darauf hingewiesen, dass *R. canina* var. *andegavensis* hexaploid war und diagnostische Mikrosatellitenallele auf einen hybridogenen Einfluss der Subsektion *Rubigineae* hindeuten (Manuskript II, Herklotz *et al.* 2017, Herklotz *et al.* erweiterter Datensatz, unveröffentlicht)

Zwischen Arten des L/D- und D-Typs gab es keine signifikanten morphologischen und genetischen Unterschiede. Insbesondere das Merkmal Griffelkanal, welcher nach Henker (2000) maßgeblich bestimmungsrelevant ist,

unterscheidet nicht eindeutig zwischen L/D-Typ und D-Typ (Manuskript II, Figure 4G, Herklotz et al. 2017). Vielmehr ist es ein sukzessiver Übergang vom Griffelkanaldurchmesser um 1 mm (L/D-Typ) zu Durchmessern von >1,4 mm (D-Typ).

Haveman (2016) postulierte, dass Hagebuttenmerkmale nicht zum Abgrenzen von Arten geeignet sind, da sie paternal vererbt werden (Ritz & Wissemann 2003). Werden Hagebuttenmerkmale ausgeschlossen, welche nach Christ (1873) korreliert mit Wuchsformmerkmalen betrachtet werden sollen, ist eine Trennung in Arten auf dem Niveau von Henker (2000, 2011) nicht mehr möglich. Daher würde ich eine Betrachtung in Aggregaten favorisieren (Popek 2007). Solche Aggregate beinhalten dann aber unterschiedliche Ploidiestufen und Primärhybriden. Man könnte trotz morphologischer Variation bspw. von *R. canina* agg., *R. corymbifera* agg., *R. elliptica* agg. und *R. rubiginosa* agg. sprechen.

Behaarung auf der Rhachis und der Blättchenunterseite scheint ein maternal vererbtes Merkmal zu sein und könnte das haarlose *R. canina* agg. mit den Morphotypen von *R. canina*, *R. subcanina* und *R. dumalis* von einem behaarten *R. corymbifera* agg. abtrennen (*R. corymbifera*, *R. subcollina*, *R. caesia*). Aber auch für die Behaarung gibt es Übergänge, sodass eine Abgrenzung genau Definiert werden müsste.

Die in dieser Arbeit gesammelten Daten stützen zumindest eine arten-reduzierende Sichtweise im *R. rubiginosa* agg. Demnach könnte *R. gremlii* (L/D-Typ) mit dem D-Typ *R. rubiginosa* zusammen gelegt werden, was eine weitere Fassung der letztgenannten Art bedeutet. Bemerkenswerter Weise wurde in dieser Studie kein einziger *Rosa elliptica*-Morphotyp nach den verwendeten strikten Kriterien bestimmt (Henker 2000, Manuskript I, Herklotz & Ritz 2017). Entweder können die strikten Bestimmungskriterien nicht *R. elliptica* von *R. inodora* abgrenzen, oder es wurden tatsächliche keine *R. elliptica* gesammelt. In dem Fall, dass Bestimmungskriterien nicht trennen, wäre eine Zusammenlegung von L/D- und D-Typ im *R. elliptica* agg. zu befürworten. Da

aber L/D-Typ *R. inodora* als auch L-Typ *R. agrestis* einen erheblichen Anteil an Hybriden beinhalteten (beide 44%) und ihre Trennung durch Mikrosatellitendaten nicht gestützt ist, wäre auch hier über eine Zusammenlegung nachzudenken. Letztendlich würde dies das *R. elliptica* agg. auf eine Art *R. elliptica* reduzieren. Dafür fehlt allerdings noch eine solide Morphometrie der Gruppe.

Für andere Gruppen, wie in Subsektion *Caninae* (*R. dumalis*/*R. subcanina*, *R. caesia*/*R. subcollina*) oder in *Vestitae* ist eine analoge Zusammenführung von L/D- und D-Typ zwar naheliegend, kann aber durch keine Datengrundlage belegt werden. Allgemein erscheint mir die Unterscheidung des intermediären L/D-Typs in allen Hundsrosen als eigenes Taxon als nicht sinnvoll, da damit möglicherweise eine Symmetrie impliziert wird, die es natürlich gar nicht gibt. Die intermediären L/D-Typen als Primärhybriden zu sehen, entstanden aus Kreuzungen von L- und D-Typen-Arten, wie in *Roses of Great Britain and Ireland* (Graham & Primavesi 1993) halte ich ebenfalls für falsch, weil dabei die maternal betonte Vererbung der *Caninae* außer Acht gelassen wird. Zudem gibt es für diese Sichtweise keine genetischen Anhaltspunkte (Manuskript IV, Vogt et al. 2015, Manuskript I, Herklotz & Ritz 2017, Manuskript II, Herklotz et al. 2017).

### 3.5 Diskussion verwendeter Methoden

#### 3.5.1 Populationsgenetik und Morphometrie

Um genetische Muster über geographische Distanzen zu untersuchen, sollte ein möglichst großer Verbreitungsraum abgedeckt werden (Marks 1988). Für die vorliegende Arbeit wurden Hundsrosen aus den Subsektionen *Caninae* und *Rubigineae* in einem großen geographischen Areal gesammelt (Mittel- und Südosteuropa), was in etwa ihrem zentralen Verbreitungsgebiet entspricht (Kurtto *et al.* 2004). West- und nordeuropäische Populationen sowie Vorkommen in Südeuropa, Nordafrika und Teilen Vorder-, Zentral- und Nordasiens konnten leider nicht einbezogen werden. Die beprobte Anzahl an Individuen pro Standort war mit 15–20 optimal (Hale *et al.* 2012).

Auf Grund der großen Probenanzahl wurden Ploidiestufen mit Durchflusszytometrie (*FCM*) unter Verwendung einer diploiden Referenz (*Rosa arvensis* Huds.,  $2n = 2x = 14$ ) und DAPI-Färbung bestimmt. Das verwendete Blattmaterial war silica-gel-getrocknet, weshalb die Resultate teilweise schlecht oder nicht auswertbar waren. Frische Pflanzenteile sind besser geeignet für *FCM* (Doležel *et al.* 2007; Bainard *et al.* 2011). Genauere Ploidiestufenbestimmungen, welche aber mit deutlich höherem Zeitaufwand verbunden sind, liefern Chromosomenzählungen oder Genomgrößenbestimmungen mit *FCM* (Yokoya *et al.* 2000). Diese Methoden wurden für fünf Individuen verwendet (Manuskript III, Herklotz *et al.* 2018). Im Idealfall können dabei 10.000 Partikel pro Peak gemessen und ein Variationskoeffizient (CV) der Peaks von unter 5% erreicht werden (Yokoya *et al.* 2000; Doležel *et al.* 2007). Beide Qualitätsmerkmale konnten in unseren Studien nicht erreicht werden (max. 3000 Partikel pro Peak, CV <6%). Ursache dafür könnte sein, dass neben der Verwendung von getrocknetem Material auch ein hoher Anteil polymerisierender Sekundärmetaboliten, wie Polyphenole und Terpene die Messung inhibieren können (Doležel *et al.* 2007).

Um Populationsstrukturen und Hybridisierung zu untersuchen, wurden Mikrosatelliten als Markersystem verwendet. Mikrosatelliten sind

sequenzspezifisch und werden kodominant vererbt. Im Vergleich zu dominant vererbten Anonym-Markern, wie AFLPs oder RAPDs, haben Mikrosatelliten einen höheren Informationsgehalt und sind reproduzierbarer (Jones *et al.* 1997; McGregor *et al.* 2000). Die genutzten Mikrosatelliten wurden für *Rosa hybrida* entwickelt (Esselink *et al.* 2003). Sie fanden bereits in anderen Studien zu Hundsrosen Verwendung (Esselink *et al.* 2003; Nybom *et al.* 2004, 2006; Ritz & Wissemann 2011; Herklotz & Ritz 2014) und sind dadurch direkt vergleichbar. Die im Manuskript III (Herklotz *et al.* 2018) verwendeten Daten aus dem *Next Generation Sequencing (NGS)* bergen das Potential für die weitere Entwicklung von Mikrosatelliten. Hierfür eignet sich beispielsweise ein *De Novo Assembly* der Illumina reads mit VELVET (Zerbino & Birney 2008) und eine Mikrosatellitensuche mit MISA (Thiel *et al.* 2003). Einen höheren Informationsgehalt als die Mikrosatelliten könnten NGS-basierte Verfahren wie z.B. *RADseq* (Davey & Blaxter 2010) oder *SNP arrays* bieten (Deschamps *et al.* 2012; Vukosavljev *et al.* 2016).

Statistische Verfahren, die Mikrosatelliten, Sequenzdaten oder binäre AFLP-Profile zur Identifikation von Hybriden benutzen sind, z.B. Bayesische Methoden wie STRUCTURE oder NEWHYBRIDS (Anderson & Thompson 2002; FALUSH *et al.* 2007). Beide Methoden legen aber für Hundsrosen problematische Annahmen zu Grunde (z.B. Hardy-Weinberg-Gleichgewicht). Bisher existiert kein statistisches Modell, das Heterogamie und ungerade Ploidiestufen berücksichtigt. Die von uns entwickelte Hybrididentifikation (Abbildung 6) beachtet die betont maternale Vererbung in Hundsrosen. Diese Methode ist aber nur für Hybridisierungen zwischen zwei Subsektionen, nicht mehreren, anwendbar. Das Verfahren basiert auf der Beobachtung, dass Hundsrosen oft weniger Allele besitzen als es nach ihrer Ploidiestufe zu erwarten wäre (Abbildung 6, Nybom *et al.* 2004, 2006, Ritz & Wissemann 2011, Herklotz & Ritz 2014). Eine pentaploide Hundsrose ( $2n = 5x = 35$ ) hat maximal vier unterschiedliche Mikrosatelliten-Allele. Eines der Allele liegt in zwei identischen Kopien vor und repräsentiert wahrscheinlich die beiden Bivalenten-Genome

(Nybom *et al.* 2006). Hybridogene Individuen haben dagegen fünf unterschiedliche Allele pro Locus (Esselink *et al.* 2004; Nybom *et al.* 2006; Ritz & Wissemann 2011; Herklotz & Ritz 2014). Der Pollen-Elter hat ein Allel übertragen, welches nicht in der Eizelle vorkam und ein paternales Bivalenten-Genom repräsentiert (Nybom *et al.* 2004, 2006; Ritz & Wissemann 2011). Allele, die von Pollen-Eltern einer anderen Subsektion übertragen wurden, sind daher diagnostische Allele um Hybriden zu identifizieren (Abbildung 6). Der Umstand, dass immer nur ein diagnostisches Allel pro Locus vorkam (Manuskript I, Herklotz & Ritz 2017, *supplement Table S2*), entspricht der haploiden ( $1n = 1x = 7$ ) Vererbung durch Pollen in Hundsrosen und unterstützt daher unseren Ansatz der Hybrididentifikation.

Eine Implementierung dieser Prozedur in ein R *script* (R Development Core Team 2015) könnte mehr statistische Sicherheit bieten. Derzeit arbeiten wir in Kooperationen an einer Analyse um einen Datensatz mit ~3000 Individuen aus verschiedenen Sektionen und Subsektionen zu verarbeiten. Für jede Zuordnung, oder auf der Stufe der Häufigkeiten, könnten Chi<sup>2</sup>-Tests gegen einen Erwartungswert durchgeführt werden. Lineare Modelle mit einem Ansatz randomisierter Permutation sind ebenfalls denkbar. Eine multidimensionale Applikation, die diagnostische Allele aus mehr als zwei Sektionen bzw. Subsektionen erkennt, ist sicherlich eine Herausforderung.

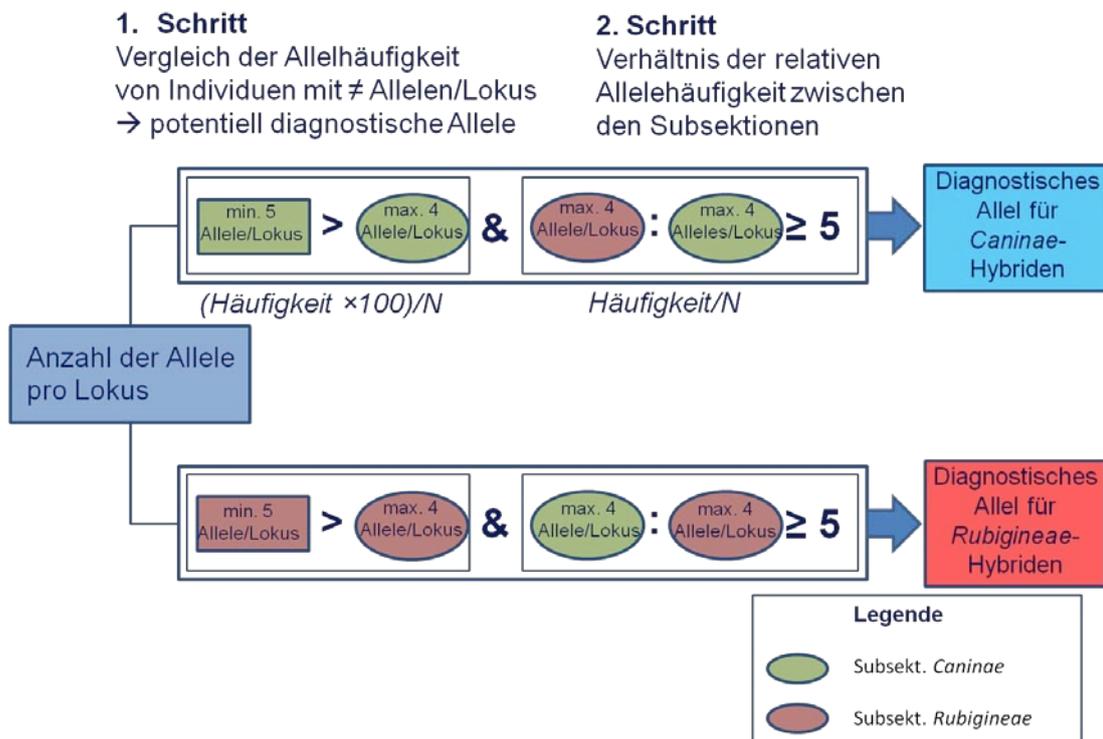


Abbildung 6. Schematische Darstellung der Prozedur zur Identifikation von diagnostischen Mikrosatelliten-Allelen in reziproken Hundsrosen-Hybriden. Der 1. Schritt vergleicht, ob ein potentiell diagnostisches Allel häufiger in Genotypen vorkommt, die mehr als vier Allele pro Locus haben. Der 2. Schritt setzt die relative Häufigkeit von Allelen der Individuen mit maximal vier Allelen pro Locus ins Verhältnis. Dabei sollte ein diagnostisches Allel in der paternalen Subsektion 5 $\times$  häufiger sein als in der maternalen Subsektion.

Für statistische Analysen und Visualisierungen wurde der Datensatz in eine Matrix genetischer Distanzen umgewandelt. Wir verwendeten in den Manuskripten I und II (Herklotz & Ritz 2017; Herklotz *et al.* 2017) die Bruvo-Distanz, welche mit dem R *package* POLYSAT berechnet wurde (Bruvo *et al.* 2004; Clark & Jasieniuk 2011). Hierfür wurde die POLYSAT-Funktion *meandistance.matrix* benutzt, weil diese für allopolyploide Systeme geeignet ist (Clark & Jasieniuk 2011). Im Gegensatz zu anderen Distanzen, wie z.B. der nicht-euklidischen Bray-Curtis-Unähnlichkeit, basieren Bruvo-Distanzen auf tatsächlichen Fragmentlängen der Mikrosatellitenallele. In einer Binärcodierung gehen diese Information verloren. *Simple Sequence Repeats* (SSR) bzw. Mikrosatelliten basieren auf kurzen rezeptiven Sequenzmotiven wie z.B. (TCT)<sub>n</sub>. Die Anzahl der Motivwiederholungen unterscheidet sich zwischen den Allelen. Damit lassen sich Allele als DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge

detektieren. Eine geringere Bruvo-Distanz haben bspw. Mikrosatellitenallele mit den Fragmentlängen 103bp und 109bp im Gegensatz zu 103bp und 139bp.

Die Methode *analysis of molecular variance* (AMOVA, Excoffier *et al.* 1992) wurde zur Analyse von hierarchisch strukturierten Einteilungen auf der Grundlage der genetischen Distanz verwendet. Der Unterschied zur klassischen AMOVA, implementiert in Arlequin v. 3.5 (Excoffier & Lischer 2010), bestand darin, dass anstatt mit quadrierter euklidischer Distanz mit der Bruvo-Distanz gerechnet wurde. Die unabhängige Wahl des Distanzmaßes für die AMOVA wird im R *package* POPPR durch eine quasi-euklidische Korrektur ermöglicht (Kamvar *et al.* 2014, 2015; R Development Core Team 2015).

Die Frage nach einem geographischen Muster in genetischen, epigenetischen und morphologischen Daten wurde in dieser Arbeit mit dem Manteltest untersucht. Der Manteltest ist eine der populärsten Methoden, um verschiedene Distanzmatrizen (z.B. genetische und geographische Distanz) miteinander zu vergleichen. Dennoch gibt es auch Kritik daran, den Manteltest für genetisch-geographische Korrelationen heranzuziehen, da die Interpretation entsprechend des theoretischen Modells *Isolation-By-Distance* (Wright 1943) Linearität und Varianzhomogenität voraussetzt (Diniz-Filho *et al.* 2013). In einem Manteltest nachgewiesene Beziehungen zwischen geografischen und genetischen Distanzen können auch durch andere ökologische und evolutionäre Prozesse beeinflusst werden. Diniz-Filho *et al.* (2013) beschreiben Kritiken am und Alternativen zum Manteltest.

Die Gruppenstruktur der Hybriden wurde mit der *multiple response permutation procedure* (MRPP) getestet. Statt euklidischer Distanz wie in den ursprünglichen Anwendungen (Biondini *et al.* 1988; McCune *et al.* 2002), basierte die MRPP in dieser Studie auf Bruvo-Distanzen.

Für morphometrische Untersuchungen wurden Merkmale aus vorangegangenen Studien zu Hundsrosen gewählt (De Cock *et al.* 2008; Vander Mijnsbrugge & Beeckman 2012). In Arbeiten von Poppek (1996, 2007) und Kerényi-Nagy (2012) wurden teilweise andere Merkmale, wie z.B. Krümmung der Stacheln, zur

Artbestimmung verwendet. Eine Untersuchung ihrer taxonomischen Relevanz und Praktikabilität wäre wünschenswert. Ansätze aus dem Bereich „maschinelles Lernen“ könnten für zukünftige morphometrische Studien hilfreich sein (Cope *et al.* 2012; Carranza-Rojas *et al.* 2017; Remagnino *et al.* 2017).

### *3.5.2 Evolution ribosomaler DNA und Epigenetik*

Für die Manuskripte III und IV (Vogt *et al.* 2015; Herklotz *et al.* 2018) wurde eine Modellpopulation untersucht, die bereits in früheren Arbeiten charakterisiert wurde (Herklotz 2012; Herklotz & Ritz 2014). Aus Individuen der Modellpopulation wurden auch künstliche Kreuzungen hergestellt (Vogt 2013), die aber erst zukünftig weitere Forschung gestatten werden: Leider beträgt die Keimzeit von Hundsrosensaart 2 Jahre (Rowley 1956) und die Generationszeiten der Arten sind sehr lang (Henker 2000). Bei diesen künstlichen Hybriden sind die exakten Eltern bekannt, was bei den hier untersuchten natürlichen Hybriden (Manuskript III, IV, Vogt *et al.* 2015, Herklotz *et al.* 2018) nicht der Fall war und teilweise die Interpretation der Ergebnisse erschwerte.

Mitotische Metaphasen wurden aus dem Meristem von Wurzelspitzen gewonnen. Stecklinge von Hundsrosen bilden im Wasser keine neuen Wurzeln und sind generell schwer zu etablieren (Sheat 1948). Deswegen wurden vor Ort die fein verzweigten Wurzelenden der Hundsrosen vorsichtig freigelegt, anschließend in Geotextil eingeschlagen und wieder mit Boden bedeckt. Nach ca. drei Wochen waren an den verletzten Wurzeltrieben viele neue Wurzelspitzen gewachsen, die apikales Meristemgewebe enthielten und für die zytologischen Untersuchungen entnommen wurden. Diese Methode wurde erstmalig an Hundsrosen angewandt und kann auch auf andere Gehölze übertragen werden. Gegen dieses Verfahren spricht allerdings eine potentielle Schädigung der Pflanzen bei häufiger Schädigung der Wurzeln. In fortlaufenden zytologischen Untersuchungen bin ich deshalb dazu übergegangen, Pistill-

Gewebe aus jungen Blütenknospen auch für mitotischen Analysen zu verwenden.

Die Protoplasten-Enzymatik und die Präparation der Objekte entsprach Standardprotokollen (Schwarzacher & Heslop-Harrison 2000; Lim *et al.* 2005). Eine Alternative wäre die „*SteamDrop*“ Methode nach Kirov *et al.* (2014).

Im Gegensatz zu den verwendeten direkt mit Fluoreszenzfarbstoff markierten FISH-Sonden würde eine Antikörper vermittelte Detektion (Lim *et al.* 2005) die Signalsensibilität erhöhen (Schwarzacher & Heslop-Harrison 2000). Vor allem für *Loci* von geringer Größe, wie die der 5S rDNA, wäre das unter Umständen besser geeignet. Interessante Ansätze für die Visualisierung von *single copy* Genen wäre eine Signalverstärkung durch die *Tyramide*-FISH-Methode (Khrustaleva & Kik 2001).

Eine großes Potential birgt die Etablierung der *fiber*-FISH Technik, bei der Prophasenchromosomen (DNA *fiber*) durch eine Kohlenstoff-Nano-Kapillare gezogen werden und die physikalische *Mapping* von Markern mit einer Auflösung von bis zu 1kb erlaubt (Dechyeva & Schmidt 2016; Sharma *et al.* 2016).

Die verwendeten Methoden *complementary* DNA-AFLP (cDNA-AFLP) und *Methylation Sensitive* AFLP (MSAP) zeigten anonyme Muster der Genexpression und DNA-Methylierung. Es wurden Hundsrosen aus der genannten Modellpopulation untersucht. Für die Expressionsanalysen (cDNA-AFLP) wurde RNA aus verschiedenen Geweben extrahiert. Die MSAP basierte auf genomischer DNA. Dabei ist zu beachten, dass nicht unter einheitlichen Kulturbedingungen gezogene Individuen untersucht wurden sonder Pflanzen an einem natürlichen Standort. Dies ist relevant, da epigenetische Modifikation und Genexpression immer von Umweltfaktoren abhängt und in einer natürlichen Population diese eben nicht einheitlich sind. Alternativ könnten *RNASeq* und *NGS* Verfahren zur Detektion von DNA-Methylierungen den Informationsgehalt steigern (Bloom *et al.* 2009; Plongthongkum *et al.* 2014).

Die *nrITS-1*-Region wurde mit Hilfe verschiedener Sequenzierstrategien quantitativ und qualitativ analysiert. Die Fehlerraten von PCR basierten Sequenzierungen sowie eine mögliche Selektion und/oder Deletion beim Klonieren ist bekannt (Hoff 2009). Bei den mit Illumina<sup>®</sup> sequenzierten *nrITS-1*-Amplicons zeigten sich die PCR-Fehlerraten durch den hohen Anteil von *low copy* Haplotypen (Manuskript III, Herklotz et al. 2018, *supplement Table S2*). Besser Ergebnisse lieferte die Analyse der *nrITS-1*-Region aus der genomischen Illumina<sup>®</sup>-Sequenzierung, weil dabei kein potentiell verzerrender PCR-Schritt enthalten war. Für eine genaue Transkriptomanalyse wäre ein RNASeq-Verfahren wünschenswert (Bloom *et al.* 2009).

## 4 Ausblick

Hundsrosen wurden schon von Generationen von Forschern bearbeitet, nicht zuletzt wegen ihrer großen Vielfalt und der besonderen Meiose. Die Canina-Meiose ist durch ihre besondere Form von grundlegendem Interesse. Asymmetrische Meiosen zu erforschen, kann dazu beitragen allgemeine Grundlagen zum Verständnis von Meiose zu liefern. In dieser Arbeit konnten einige Anhaltspunkte zum Mechanismus der Canina-Meiose aufgezeigt werden. Die vollständige Aufklärung der Canina-Meiose bleibt aber ein weit entferntes Ziel. Mittelfristig mangelt es an modernen zytogenetischen Untersuchungen der Hundsrosen-Megasporogenese, womit ein wichtiges Bindeglied beim Verständnis der Canina-Meiose fehlt. In einem deutsch-tschechischen Kooperationsprojekt erforschen wir derzeit die genomische Komposition in Hundsrosenhybriden und die Vererbung einzelner Subgenome in der Canina-Meiose. Zytogenetische Analysen (FISH) und NGS-basierte Verfahren zur Identifikation von *satellite repeats* sind methodische Schwerpunkte in diesem Projekt. Zukünftige Studien könnten sich mit der möglicherweise unterschiedlich ablaufenden Meiose in *Caninae* und *Rubigineae* beschäftigen. Weitere methodische Ansätze könnten histologische Immuno-Assays zum Verfolgen der Spindelstruktur oder Tyramid-FISH zur Detektion von low copy Genen sein. Ein großes Potential um genetische Mechanismen der Meiose zu untersuchen, birgt sicherlich das jüngst veröffentlichte komplett annotierte Genom von *Rosa chinensis*.

Die große morphologische Diversität der Hundsrosen führte immer wieder zu taxonomischen Veränderungen. Ziel dabei ist und war es die biologischen und phylogenetischen Zusammenhänge in dieser Gruppe möglichst realitätsnah wiederzugeben. Die taxonomische Bearbeitung der Hundsrosen ist längst nicht abgeschlossen und sollte weiter verfolgt werden. Ich plädiere dabei aber klar für eine Vereinfachung und Zusammenlegung einzelner Arten. Künftige morphometrische und populationsgenetische Studien könnten sich mit weiteren

(Sub)Sektionen der Rosen (z.B. sect. *Caninae* subsect. *Vestitae*), ihren Hybridschwärmen und Fragen um verschiedene Kleinarten (z.B. *R. marginata*, *R. balsamica*, *R. canina* var. *andegavensis*) befassen. Bei ökologischen Themen gibt es außerdem Forschungsbedarf. Besonders wichtig wird die Taxonomie der Hundsrosen bei praktischen Aspekten im Naturschutz und wissenschaftlichen Feldarbeiten. Den Verfassern von Florenschlüsseln wünsche ich daher bei der Bearbeitung der Hundsrosen viel Erfolg.

## Literaturverzeichnis

- Abbott, R., Albach, D., Ansell, S., Arntzen, J.W., Baird, S.J.E., Bierne, N., Boughman, J., Brelsford, A., Buerkle, C.A., Buggs, R., Butlin, R.K., Dieckmann, U., Eroukhanoff, F., Grill, A., Cahan, S.H., Hermansen, J.S., Hewitt, G., Hudson, A.G., Jiggins, C., Jones, J., Keller, B., Marczewski, T., Mallet, J., Martinez-Rodriguez, P., Möst, M., Mullen, S., Nichols, R., Nolte, A.W., Parisod, C., Pfennig, K., Rice, A.M., Ritchie, M.G., Seifert, B., Smadja, C.M., Stelkens, R., Szymura, J.M., Väinölä, R., Wolf, J.B.W., Zinner, D. (2013) 'Hybridization and speciation', *Journal of Evolutionary Biology*, 26(2), 229–246.
- Ahuja, M.R. (2005) 'Polyploidy in gymnosperms: Revisited', *Silvae Genetica*, 54(2), 59–69.
- Albertin, W., Marullo, P. (2012) 'Polyploidy in fungi: evolution after whole-genome duplication', *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 279(1738), 2497–2509.
- Alexander, M.P. (1980) 'A versatile stain for pollen fungi, yeast and bacteria.', *Stain technology*, 55(1), 13–18.
- Alves, M.J., Coelho, M.M., Collares-Pereira, M.J. (2001) 'Evolution in action through hybridisation and polyploidy in an Iberian freshwater fish: A genetic review', *Genetica*, 111(1–3), 375–385.
- Amores, A., Force, A., Yan, Y.-L., Joly, L., Amemiya, C., Fritz, A., Ho, R.K., Langeland, J., Prince, V., Wang, Y.-L., Westerfield, M., Ekker, M., Postlethwait, J.H. (1998) 'Zebrafish hox clusters and vertebrate genome evolution', *Science*, 282(5394).
- Anderson, E.C., Thompson, E.A. (2002) 'A model-based method for identifying species hybrids using multilocus data', *Genetics*, 160(3), 1217–1229.
- Arnold, M.L. (1992) 'Natural hybridization as an evolutionary process', *Annual Review of Ecology and Systematics*, 23(1), 237–261.
- Arnold, M.L., Hodges, S.A. (1995) 'Are natural hybrids fit or unfit relative to their parents?', *Trends in Ecology & Evolution*, 10(2), 67–71.
- Arrigo, N., Barker, M.S. (2012) 'Rarely successful polyploids and their legacy in plant genomes', *Current Opinion in Plant Biology*, 15(2), 140–146.
- Aury, J.-M., Jaillon, O., Duret, L., Noel, B., Jubin, C., Porcel, B.M., Ségurens, B., Daubin, V., Anthouard, V., Aiach, N., Arnaiz, O., Billaut, A., Beisson, J., Blanc, I., Bouhouche, K., Câmara, F., Duharcourt, S., Guigo, R., Gogendeau, D., Katinka, M., Keller, A.-M., Kissmehl, R., Klotz, C., Koll, F., Le Mouël, A., Lepère, G., Malinsky, S., Nowacki, M., Nowak, J.K., Plattner, H., Poulain, J., Ruiz, F., Serrano, V., Zagulski, M., Dessen, P., Bétermier, M., Weissenbach, J., Scarpelli, C., Schächter, V., Sperling, L., Meyer, E., Cohen, J., Wincker, P. (2006) 'Global trends of whole-genome duplications revealed by the ciliate *Paramecium tetraurelia*', *Nature*, 444(7116), 171–178.
- Bainard, J.D., Husband, B.C., Baldwin, S.J., Fazekas, A.J., Gregory, T.R., Newmaster, S.G., Kron, P. (2011) 'The effects of rapid desiccation on estimates of plant genome size', *Chromosome Research*, 19(6), 825–842.
- Barcaccia, G., Tavoletti, S., Falcinelli, M., Veronesi, F. (1997) 'Environmental influences on the frequency and viability of meiotic and apomeiotic cells of a diploid mutant of alfalfa', *Crop Science*, 37(1), 70–76.
- Barker, M.S., Arrigo, N., Baniaga, A.E., Li, Z., Levin, D.A. (2016) 'On the relative abundance of autopolyploids and allopolyploids', *New Phytologist*, 210(2), 391–398.
- Barton, N.H., Hewitt, G.M. (1985) 'Analysis of hybrid zones', *Annual Review of Ecology and Systematics*, 16(1), 113–148.
- Te Beest, M., Le Roux, J.J., Richardson, D.M., Brysting, A.K., Suda, J., Kubešová, M., Pyšek, P. (2012) 'The more the better? The role of polyploidy in facilitating plant invasions', *Annals of Botany*, 109, 19–45.
- Biondini, M.E., Mielke, P.W., Berry, K.J. (1988) 'Data-dependent permutation techniques for the analysis of ecological data', *Vegetatio*, 75(3), 161–168.
- Birchler, J.A., Riddle, N.C., Auger, D.L., Veitia, R.A. (2005) 'Dosage balance in gene regulation: biological implications', *Trends in Genetics*, 21(4), 219–226

- Bischler, H., Boisselier-Dubayle, M.-C. (2000) 'New approaches into the systematics of liverworts', *Nova Hedwigia*, 70, 37–44.
- Blackburn, K.B., Harrison, J.W.H. (1921) 'The status of the British rose forms as determined by their cytological behaviour', *Annals of Botany*, 35(138), 159–188.
- Bloom, J.S., Khan, Z., Kruglyak, L., Singh, M., Caudy, A.A. (2009) 'Measuring differential gene expression by short read sequencing: quantitative comparison to 2-channel gene expression microarrays.', *BMC Genomics*, 10, 221.
- Bourke, P.M., Arens, P., Voorrips, R.E., Esselink, G.D., Koning-Boucoiran, C.F.S., van't Westende, W.P.C., Santos Leonardo, T., Wissink, P., Zheng, C., van Geest, G., Visser, R.G.F., Krens, F.A., Smulders, M.J.M., Maliepaard, C. (2017) 'Partial preferential chromosome pairing is genotype dependent in tetraploid rose', *The Plant Journal*, 90(2), 330–343.
- Bradshaw, H.D., Stettler, R.F. (1993) 'Molecular genetics of growth and development in *Populus*. I. Triploidy in hybrid poplars', *Theoretical and Applied Genetics*, 86(2–3), 301–307.
- Brownfield, L., Köhler, C. (2011) 'Unreduced gamete formation in plants: mechanisms and prospects', *Journal of Experimental Botany*, 62(5), 1659–1668.
- Bruneau, A., Starr, J.R., Joly, S. (2007) 'Phylogenetic relationships in the genus *Rosa*: new evidence from chloroplast DNA sequences and an appraisal of current knowledge', *Systematic Botany*, 32(2), 366–378.
- Bruvo, R., Michiels, N.K., D'Souza, T.G., Schulenburg, H. (2004) 'A simple method for the calculation of microsatellite genotype distances irrespective of ploidy level', *Molecular ecology*, 13(7), 2101–6.
- Buckler, E.S., Holtsford, T.P. (1996) 'Zea systematics: ribosomal ITS evidence', *Molecular Biology and Evolution*, 13(4), 612–622.
- Buggs, R.J.A., Zhang, L., Miles, N., Tate, J.A., Gao, L., Wei, W., Schnable, P.S., Barbazuk, W.B., Soltis, P.S., Soltis, D.E. (2011) 'Transcriptomic shock generates evolutionary novelty in a newly formed, natural allopolyploid plant', *Current Biology*, 21(7), 551–556.
- Burgess, K.S., Morgan, M., Deverno, L., Husband, B.C. (2005) 'Asymmetrical introgression between two *Morus* species (*M. alba*, *M. rubra*) that differ in abundance', *Molecular Ecology*, 14(11), 3471–3483.
- Campbell, M.A., Ganley, A.R.D., Gabaldón, T., Cox, M.P. (2016) 'The case of the missing ancient fungal polyploids', *The American Naturalist*, 188(6), 602–614.
- Carranza-Rojas, J., Goeau, H., Bonnet, P., Mata-Montero, E., Joly, A. (2017) 'Going deeper in the automated identification of herbarium specimens', *BMC Evolutionary Biology*, 17(1), 181.
- Chen, Z.J. (2007) 'Genetic and epigenetic mechanisms for gene expression and phenotypic variation in plant polyploids', *Annual Review of Plant Biology*, 58, 377–406.
- Chester, M., Gallagher, J.P., Symonds, V. V., Cruz da Silva, A. V., Mavrodiev, E. V., Leitch, A.R., Soltis, P.S., Soltis, D.E. (2012) 'Extensive chromosomal variation in a recently formed natural allopolyploid species, *Tragopogon miscellus* (Asteraceae)', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(4), 1176–1181.
- Christ, H. (1873) 'Die Rosen der Schweiz mit Berücksichtigung der umliegenden Gebiete Mittel- und Süd-Europas', H. Georgs Verlag, Basel, Genf, Lyon.
- Clark, L. V., Jasieniuk, M. (2011) 'POLYSAT: an R package for polyploid microsatellite analysis', *Molecular Ecology Resources*, 11(3), 562–566.
- Clausen, J., Keck, D., Hiesey, W. (1945) 'Experimental studies on the nature of species. II. Plant evolution through amphiploidy and autopolloidy, with examples from the Madiinae', *Carnegie Institution of Washington publication*, 564.
- De Cock, K., Vander Mijnsbrugge, K., Breyne, P., Van Bockstaele, E., Van Slycken, J. (2008) 'Morphological and AFLP-based differentiation within the taxonomical complex section *Caninae* (subgenus *Rosa*)', *Annals of Botany*, 102(5), 685–697.
- Collares-Pereira, M.J., Matos, I., Morgado-Santos, M., Coelho, M.M. (2013) 'Natural pathways towards polyploidy in animals: The *Squalius alburnoides* fish complex as a model system to study genome size and genome reorganization in polyploids', *Cytogenetic and Genome*

- Research*, 140(2–4), 97–116.
- Comai, L. (2000) 'Genetic and epigenetic interactions in allopolyploid plants.', *Plant Molecular Biology*, 43(2–3), 387–399.
- Comai, L. (2005) 'The advantages and disadvantages of being polyploid.', *Nature Reviews Genetics*, 6(11), 836–846.
- Cope, J.S., Corney, D., Clark, J.Y., Remagnino, P., Wilkin, P. (2012) 'Plant species identification using digital morphometrics: A review', *Expert Systems with Applications*, 39(8), 7562–7573.
- Crespel, L., Ricci, S.C., Gudin, S. (2006) 'The production of 2n pollen in rose', *Euphytica*, 151(2), 155–164.
- Cui, L., Wall, P.K., Leebens-Mack, J.H., Lindsay, B.G., Soltis, D.E., Doyle, J.J., Soltis, P.S., Carlson, J.E., Arumuganathan, K., Barakat, A., Albert, V.A., Ma, H., DePamphilis, C.W. (2006) 'Widespread genome duplications throughout the history of flowering plants', *Genome Research*, 16(6), 738–749.
- Davey, J.L., Blaxter, M.W. (2010) 'RADseq: next-generation population genetics', *Briefings in Functional Genomics*, 9(5–6), 416–423.
- Dechyeva, D., Schmidt, T. (2016) 'Fluorescent in situ hybridization on extended chromatin fibers for high-resolution analysis of plant chromosomes', *Methods in Molecular Biology*, 1429, 23–33.
- Dehal, P., Boore, J.L. (2005) 'Two rounds of whole genome duplication in the ancestral vertebrate', *PLoS Biology*, 3(10), e314.
- Delany, M.E., Krupkin, A.B. (1999) 'Molecular characterization of ribosomal gene variation within and among NORs segregating in specialized populations of chicken.', *Genome*, 42(1), 60–71.
- Deschamps, S., Llaca, V., May, G.D. (2012) 'Genotyping-by-Sequencing in plants', *Biology*, 1(3), 460–483.
- Devos, K.M., Brown, J.K.M., Bennetzen, J.L. (2002) 'Genome size reduction through illegitimate recombination counteracts genome expansion in *Arabidopsis*.' *Genome research*, 12(7), 1075–9.
- Diniz-Filho, J.A.F., Soares, T.N., Lima, J.S., Dobrovolski, R., Landeiro, V.L., Telles, M.P. de C., Rangel, T.F., Bini, L.M. (2013) 'Mantel test in population genetics', *Genetics and Molecular Biology*, 36(4), 475–485.
- Dodsworth, S., Chase, M.W., Kelly, L.J., Leitch, I.J., Macas, J., Novak, P., Piednoel, M., Weiss-Schneeweiss, H., Leitch, A.R. (2015) 'Genomic repeat abundances contain phylogenetic signal', *Systematic Biology*, 64(1), 112–126.
- Dodsworth, S., Leitch, A.R., Leitch, I.J. (2015) 'Genome size diversity in angiosperms and its influence on gene space', *Current Opinion in Genetics and Development*, 35, 73–78.
- Doležel, J., Greilhuber, J., Suda, J. (2007) *Flow Cytometry with Plant Cells*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany.
- Dowling, T., Secor, C. (1997) 'The role of hybridization and introgression in the diversification of animals', *Annual Review of Ecology and Systematics*, 28, 593–619.
- Doyle, J.J., Sherman-Broyles, S. (2017) 'Double trouble: taxonomy and definitions of polyploidy', *New Phytologist*, 213(2), 487–493.
- Dubcovsky, J., Dvorač, J. (1995) 'Ribosomal RNA multigene loci: nomads of the *Triticeae* genomes.', *Genetics*, 140(4), 1367–1377.
- Eickbush, T.H., Eickbush, D.G. (2007) 'Finely orchestrated movements: evolution of the ribosomal RNA genes', *Genetics*, 175(2), 477–485.
- Esselink, G.D., Nybom, H., Vosman, B. (2004) 'Assignment of allelic configuration in polyploids using the MAC-PR (microsatellite DNA allele counting-peak ratios) method', *Theoretical and Applied Genetics*, 109(2), 402–408.
- Esselink, G.D., Smulders, M.J.M., Vosman, B. (2003) 'Identification of cut rose (*Rosa hybrida*) and rootstock varieties using robust sequence tagged microsatellite site markers', *Theoretical and Applied Genetics*, 106(2), 277–286.
- Excoffier, L., Lischer, H.E.L. (2010) 'Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows', *Molecular Ecology Resources*, 10,

- 564–567.
- Excoffier, L., Smouse, P.E., Quattro, J.M. (1992) 'Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data', *Genetics*, 131(2), 479–491.
- Fawcett, J.A., Maere, S., Van de Peer, Y. (2009) 'Plants with double genomes might have had a better chance to survive the Cretaceous-Tertiary extinction event.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(14), 5737–5742.
- Fawcett, J.A., Van de Peer, Y., Maere, S. (2013) 'Significance and biological consequences of polyploidization in land plant evolution', in Leitch, I.J., Greilhuber, J., Doležel, J. and Wendel, J.F., eds., *Plant Genome Diversity Volume 2*, Springer Vienna: Vienna, 277–293.
- Feliner, G.N., Rosselló, J.A. (2012) 'Concerted evolution of multigene families and homoeologous recombination', in *Plant Genome Diversity Volume 1*, Springer Vienna: Vienna, 171–193.
- Field, D.L., Ayre, D.J., Whelan, R.J., Young, A.G. (2011) 'Patterns of hybridization and asymmetrical gene flow in hybrid zones of the rare *Eucalyptus aggregata* and common *E. rubida*', *Heredity*, 106(5), 1–13.
- Fougère-Danezan, M., Joly, S., Bruneau, A., Gao, X.-F., Zhang, L.-B. (2015) 'Phylogeny and biogeography of wild roses with specific attention to polyploids', *Annals of Botany*, 115, 275–291.
- Fowler, N.L., Levin, D.A. (2016) 'Critical factors in the establishment of allopolyploids', *American Journal of Botany*, 103(7), 1236–1251.
- Freeling, M. (2009) 'Bias in plant gene content following different sorts of duplication: tandem, whole-genome segmental, or by transposition', *Annual Review of Plant Biology*, 60, 433–453.
- Freeling, M., Thomas, B.C. (2006) 'Gene-balanced duplications, like tetraploidy, provide predictable drive to increase morphological complexity', *Genome Research*, 16(7), 805–814.
- Gallardo, M.H., Bickham, J.W., Honeycutt, R.L., Ojeda, R.A., Köhler, N. (1999) 'Discovery of tetraploidy in a mammal', *Nature*, 401(6751), 341–341.
- Glennon, K.L., Ritchie, M.E., Segraves, K.A. (2014) 'Evidence for shared broad-scale climatic niches of diploid and polyploid plants', *Ecology Letters*, 17(5), 574–582.
- Graham, G., Primavesi, A. (1993) 'Roses of Great Britain and Ireland', *BSBI handbook no. 7.*, Botanical Society of the British Isles, London.
- Grandont, L., Jenczewski, E., Lloyd, A. (2013) 'Meiosis and its deviations in polyploids', *Cytogenetic and Genome Research*, 140(2-4), 171–184.
- Grant, V. (1953) 'Cytogenetics of the hybrid *Gilia millefoliata* × *achilleaefolia*', *Chromosoma*, 5, 372–390.
- Grant, V. (1981) *Plant Speciation*, Columbia University Press: New York.
- Gregory, T.R., Mable, B.K. (2005) 'Polyploidy in animals', in *The Evolution of the Genome*, ed. TR Gregory, Elsevier, New York, 427–517.
- Greilhuber, J., Doležel, J. (2009) '2C or not 2C: A closer look at cell nuclei and their DNA content', *Chromosoma*, 118(3), 391–400.
- Guignard, M.S., Nichols, R.A., Knell, R.J., Macdonald, A., Romila, C.A., Trimmer, M., Leitch, I.J., Leitch, A.R. (2016) 'Genome size and ploidy influence angiosperm species' biomass under nitrogen and phosphorus limitation', *New Phytologist*, 210(4), 1195–1206
- Hagerup, O. (1931) 'Über Polyploidie in Beziehung zu Klima, Ökologie und Phylogenie', *Hereditas*, 16(1–2), 19–40.
- Hale, M.L., Burg, T.M., Steeves, T.E. (2012) 'Sampling for microsatellite-based population genetic studies: 25 to 30 individuals per population is enough to accurately estimate allele frequencies.', *PLoS ONE*, 7(9), e45170.
- Hancock, J.M. (2002) 'Genome size and the accumulation of simple sequence repeats: implications of new data from genome sequencing projects', *Genetica*, 115(1), 93–103.
- Harlan, J.R. (1975) 'On Ö. Winge and a Prayer: The origins of polyploidy', *The Botanical Review*, 41(4), 361–390.
- Harpke, D., Carta, A., Tomović, G., Randelović, V., Randelović, N., Blattner, F.R., Peruzzi, L.

- (2015) 'Phylogeny, karyotype evolution and taxonomy of *Crocus* series *Verni* (Iridaceae)', *Plant Systematics and Evolution*, 301(1), 309–325.
- Haveman, R. (2016) 'Gestolen kenmerken: Wat zijn soorten in *Rosa* sect. *Caninae*?, *Gorteria: Tijdschrift voor Onderzoek aan de Wilde Flora*, 38(1), 13–21.
- Henker, H. (2000) 'Rosa L.', in Conert, H.J., Jäger, E.J., Kadereit, J.W., Schultze-Motel, W., Wagenitz, G. and Weber, H.E., eds., *Gustav Hegi: Illustrierte Flora von Mitteleuropa*, Parey Buchverlag: Berlin, 1–108.
- Henker, H. (2011) 'Rosa', in Jäger, E.J., ed., *Rothmaler - Exkursions Flora von Deutschland. Grundband*, Springer Spektrum: Heidelberg, 444–453.
- Herklotz, V. (2012) *Populationsgenetik und Hybridisierung von Hundsrosen auf dem Strohmberg (Oberlausitz/Sachsen)*, Masterarbeit, Internationales Hochschulinstitut Zittau.
- Herklotz, V., Kovařík, A., Lunerová, J., Lippitsch, S., Groth, M., Ritz, C.M. (2018) 'The fate of ribosomal RNA genes in spontaneous polyploid dogrose hybrids [*Rosa* L. sect. *Caninae* (DC.) Ser.] exhibiting non-symmetrical meiosis', *Plant Journal*, 94(1), 77–90.
- Herklotz, V., Mieder, N., Ritz, C.M. (2017) 'Cytological, genetic and morphological variation in mixed stands of dogroses (*Rosa* section *Caninae*; Rosaceae) in Germany with a focus on the hybridogenic *R. micrantha*', *Botanical Journal of the Linnean Society*, 184(2), 254–271.
- Herklotz, V., Ritz, C.M. (2014) 'Spontane Hybridisierung von Hundsrosen (*Rosa* L. sect. *Caninae* (DC.) Ser.) an einem natürlichen Vorkommen in der Oberlausitz (Sachsen, Deutschland)', *Peckiana*, 9(Dc), 119–131.
- Herklotz, V., Ritz, C.M. (2017) 'Multiple and asymmetrical origin of polyploid dog rose hybrids (*Rosa* L. sect. *Caninae* (DC.) Ser.) involving unreduced gametes.', *Annals of Botany*, 120(2), 209–220.
- Heslop-Harrison, J. (2012) 'Genome evolution: extinction, continuation or explosion?', *Current Opinion in Plant Biology*, 15(2), 115–121.
- Hoff, K. (2009) 'The effect of sequencing errors on metagenomic gene prediction.', *BMC Genomics*, 10, 520.
- Holland, L.Z., Albalat, R., Azumi, K., Benito-Gutiérrez, È., Blow, M.J., Bronner-Fraser, M., Brunet, F., Butts, T., Candiani, S., Dishaw, L.J., Ferrier, D.E.K., Garcia-Fernández, J., Gibson-Brown, J.J., Gissi, C., Godzik, A., Hallböök, F., Hirose, D., Hosomichi, K., Ikuta, T., Inoko, H., Kasahara, M., Kasamatsu, J., Kawashima, T., Kimura, A., Kobayashi, M., Kozmik, Z., Kubokawa, K., Laudet, V., Litman, G.W., McHardy, A.C., Meulemans, D., Nonaka, M., Olinski, R.P., Pancer, Z., Pennacchio, L.A., Pestarino, M., Rast, J.P., Rigoutsos, I., Robinson-Rechavi, M., Roch, G., Saiga, H., Sasakura, Y., Satake, M., Satou, Y., Schubert, M., Sherwood, N., Shiina, T., Takatori, N., Tello, J., Vopalensky, P., Wada, S., Xu, A., Ye, Y., Yoshida, K., Yoshizaki, F., Yu, J.K., Zhang, Q., Zmasek, C.M., De Jong, P.J., Osoegawa, K., Putnam, N.H., Rokhsar, D.S., Satoh, N., Holland, P.W.H. (2008) 'The amphioxus genome illuminates vertebrate origins and cephalochordate biology', *Genome Research*, 18(7), 1100–1111.
- Hollister, J.D. (2015) 'Polyploidy: adaptation to the genomic environment', *New Phytologist*, 205(3), 1034–1039.
- Hřibová, E., Čížková, J., Christelová, P., Taudien, S., de Langhe, E., Doležel, J. (2011) 'The *ITS1-5.8S-ITS2* sequence region in the musaceae: structure, diversity and use in molecular phylogeny', *PLoS ONE*, 6(3), e17863.
- Husband, B.C. (2000) 'Constraints on polyploid evolution: a test of the minority cytotype exclusion principle', *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 267(1440), 217–223.
- Husband, B.C. (2004) 'The role of triploid hybrids in the evolutionary dynamics of mixed-ploidy populations', *Biological Journal of the Linnean Society*, 82(4), 537–546.
- Husband, B.C., Baldwin, S.J., Suda, J. (2013) 'The incidence of polyploidy in natural plant populations: major patterns and evolutionary processes', in Greilhuber, J., Doležel, J. and Wendel, J.F., eds., *Plant Genome Diversity*, Springer: Vienna, 255–276.
- Jiao, Y., Wickett, N.J., Ayyampalayam, S., Chanderbali, A.S., Landherr, L., Ralph, P.E., Tomsho, L.P., Hu, Y., Liang, H., Soltis, P.S., Soltis, D.E., Clifton, S.W., Schlarbaum, S.E., Schuster, S.C., Ma, H., Leebens-Mack, J., dePamphilis, C.W. (2011) 'Ancestral polyploidy in seed

- plants and angiosperms', *Nature*, 473(7345), 97–100.
- Jones, C.J., Edwards, K.J., Castaglione, S., Winfield, M.O., Sala, F., Van De Wiel, C., Bredemeijer, G., Vosman, B., Matthes, M., Daly, A., Brettschneider, R., Bettini, P., Buiatti, M., Maestri, E., Malcevski, A., Marmiroli, N., Aerts, R., Volckaert, G., Rueda, J., Linacero, R., Vazquez, A., Karp, A. (1997) 'Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories', *Molecular Breeding*, 3(5), 381–390.
- Jürgens, A.H., Seitz, B., Kowarik, I. (2007) 'Genetic differentiation of *Rosa canina* (L.) at regional and continental scales', *Plant Systematics and Evolution*, 269(1–2), 39–53.
- Kadereit, J.W., Körner, C., Kost, B., Sonnewald, U. (2014) *Strasburger – Lehrbuch Der Pflanzenwissenschaften*, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg.
- Kamvar, Z.N., Brooks, J.C., Grünwald, N.J. (2015) 'Novel R tools for analysis of genome-wide population genetic data with emphasis on clonality.', *Frontiers in Genetics*, 6, 208.
- Kamvar, Z.N., Tabima, J.F., Grünwald, N.J. (2014) 'Poppr: an R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction', *PeerJ*, 2, e281.
- Kapraun, D.F. (2005) 'Nuclear DNA content estimates in multicellular green, red and brown algae: phylogenetic considerations.', *Annals of Botany*, 95(1), 7–44.
- Keller, R. (1931) 'Synopsis Rosarum Spontanearum Europae Mediae - Übersicht über die mitteleuropäische Wildrosen mit besonderer Berücksichtigung ihrer schweizerischen Fundorte', *Denkschr. Schweiz. Naturf. Ges.*, 65, 1–163.
- Kellner, A., Ritz, C.M., Wissemann, V. (2012) 'Hybridization with invasive *Rosa rugosa* threatens the genetic integrity of native *Rosa mollis*', *Botanical Journal of the Linnean Society*, 170, 472–484.
- Kerényi-Nagy, V. (2012) *A Történelmi Magyarország Területén Élő Őshonos, Idegenhonos És Kultúr-Reliktum Rózsák Kismonográfiája – A Small Monograph of Autochton, Allochton and Cultur-Relict Roses of the Historical Hungary*, Nyugat-Magyarországi Egyetem Kiadó.
- Khaitová, L., Werlemark, G., Kovarikova, A., Nybom, H., Kovařík, A. (2014) 'High penetrance of a pan- canina type rDNA family in intersection *Rosa* hybrids suggests strong selection of bivalent chromosomes in the section *Caninae*.' *Cytogenetic and genome research*, 143(1–3), 104–113.
- Khaitová, L., Werlemark, G., Nybom, H., Kovařík, A. (2010) 'Frequent silencing of rDNA loci on the univalent-forming genomes contrasts with their stable expression on the bivalent-forming genomes in polyploid dogroses (*Rosa* sect. *Caninae*).', *Heredity*, 104, 113–120.
- Khrustaleva, L.I., Kik, C. (2001) 'Localization of single-copy T-DNA insertion in transgenic shallots (*Allium cepa*) by using ultra-sensitive FISH with tyramide signal amplification', *Plant Journal*, 25(6), 699–707.
- Kihara, H., Ono, T. (1926) 'Chromosomenzahlen und systematische Gruppierung der Rumex-Arten', *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, 4(3), 475–481.
- Kirov, I., Divashuk, M., Laere, K., Alex, Soloviev, A., Soloviev, E., Khrustaleva, L. (2014) 'An easy "SteamDrop" method for high quality plant chromosome preparation', *Molecular Cytogenetics*, 7, 21.
- Klásterská, I. (1969) 'Cytology and some chromosome numbers of Czechoslovak roses I', *Folia Geobotanica*, 4(2), 175–189.
- Klásterská, I., Klásteršský, I. (1974) 'Cytology and some chromosome numbers of Czechoslovak roses II', *Bot. Notiser*, 127(3), 328–337.
- Kolarčík, V., Zozomová-Lihová, J., Ducár, E., Mártonfi, P. (2014) 'Evolutionary significance of hybridization in *Onosma* (Boraginaceae): Analyses of stabilized hemisexual odd polyploids and recent sterile hybrids', *Biological Journal of the Linnean Society*, 112(1), 89–107.
- Končalová, M.N., Klásteršský, I. (1978) 'Cytology and chromosome numbers of some Czechoslovak roses III', *Folia Geobotanica et Phytotaxonomica*, 13(1), 67–93.
- Kovařík, A., Dadejova, M., Lim, Y.K., Chase, M.W., Clarkson, J.J., Knapp, S., Leitch, A.R. (2008) 'Evolution of rDNA in *Nicotiana* allopolyploids: a potential link between rDNA homogenization and epigenetics', *Annals of Botany*, 101(6), 815–823.
- Kovařík, A., Matyášek, R., Lim, K.Y., Skalická, K., Koukalová, B., Knapp, S., Chase, M., Leitch, A.R. (2004) 'Concerted evolution of 18-5.8-26S rDNA repeats in *Nicotiana* allotetraploids', *Biological Journal of the Linnean Society*, 82(4), 615–625.

- Kovařík, A., Werlemark, G., Leitch, A.R., Souckova-Skalicka, K., Lim, Y.K., Khaitová, L., Koukalova, B., Nybom, H. (2008) 'The asymmetric meiosis in pentaploid dogroses (*Rosa* sect. *Caninae*) is associated with a skewed distribution of rRNA gene families in the gametes', *Heredity*, 101(4), 359–367.
- Kreiner, J.M., Kron, P., Husband, B.C. (2017) 'Frequency and maintenance of unreduced gametes in natural plant populations: associations with reproductive mode, life history and genome size', *New Phytologist*, 214(2), 879–889.
- Kurtto, A., Lampine, R., Junikka, L. (eds) (2004) *Atlas Flora Europaeae. Distribution of Vascular Plants in Europe. 13. Rosaceae (Spireaea to Fragaria, Excl. Rubus)*, The Committee for Mapping the Flora of Europe & Societas Biologica Fennica Vanamo: Helsinki.
- Laport, R.G., Minckley, R.L., Ramsey, J. (2016) 'Ecological distributions, phenological isolation, and genetic structure in sympatric and parapatric populations of the *Larrea tridentata* polyploid complex', *American Journal of Botany*, 103(7), 1358–1374.
- Leitch, A.R., Leitch, I.J. (2008) 'Genomic plasticity and the diversity of polyploid plants', *Science*, 320(5875), 481–483.
- Levin, D.A. (1975) 'Minority cytotype exclusion in local plant populations', *Taxon*, 24, 35–43.
- Levin, D.A. (1983) 'Polyploidy and novelty in flowering plants', *The American Naturalist*, 122, 1–25.
- Levin, D.A. (2003) 'The ecological transition in speciation', *New Phytologist*, 161(1), 91–96.
- Li, Y., Wang, Y., Wang, P., Yang, J., Kang, X. (2016) 'Induction of unreduced megaspores in *Eucommia ulmoides* by high temperature treatment during megasporogenesis', *Euphytica*, 212(3), 515–524.
- Liao, D. (1999) 'Concerted evolution: molecular mechanism and biological implications', *American Journal of Human Genetics*, 64(1), 24–30.
- Lim, K.Y., Kovařík, A., Matyášek, R., Bezdek, M., Lichtenstein, C.P., Leitch, A.R. (2000) 'Gene conversion of ribosomal DNA in *Nicotiana tabacum* is associated with undermethylated, decondensed and probably active gene units', *Chromosoma*, 109(3), 161–172.
- Lim, K.Y., Werlemark, G., Matyášek, R., Bringloe, J.B., Sieber, V., El Mokadem, H., Meynet, J., Hemming, J., Leitch, A.R., Roberts, A.V. (2005) 'Evolutionary implications of permanent odd polyploidy in the stable sexual, pentaploid of *Rosa canina* L.', *Heredity*, 94(5), 501–506.
- Liu, Y., Li, D., Yan, L., Huang, H. (2015) 'The microgeographical patterns of morphological and molecular variation of a mixed ploidy population in the species complex *Actinidia chinensis*', *PloS One*, 10(2), e0117596.
- Lu, M., Zhang, P., Kang, X., Zhao, Y.B., Chang, R.F., Wu, L.P., Song, W.Q., Chen, R.Y., Qi, L.W. (2013) 'Induction of 2n female gametes in *Populus adenopoda* Maxim by high temperature exposure during female gametophyte development', *Breeding Science*, 63(1), 96–103.
- Lynch, M., Conery, J.S. (2000) 'The evolutionary fate and consequences of duplicate genes', *Science*, 290(5494), 1151–1155.
- Mable, B.K. (2003) 'Breaking down taxonomic barriers in polyploidy research', *Trends in Plant Science*, 8(12), 582–590.
- Mable, B.K. (2004) '“Why polyploidy is rarer in animals than in plants”: Myths and mechanisms', in *Biological Journal of the Linnean Society*, Plenum Press, NewYork, 453–466.
- Mable, B.K. (2013) 'Polyploids and hybrids in changing environments: winners or losers in the struggle for adaptation?', *Heredity*, 110(2), 95–96.
- Mable, B.K., Alexandrou, M.A., Taylor, M.I. (2011) 'Genome duplication in amphibians and fish: An extended synthesis', *Journal of Zoology*, 284(3), 151–182.
- Madlung, A. (2013) 'Polyploidy and its effect on evolutionary success: old questions revisited with new tools', *Heredity*, 110(2), 99–104.
- Madlung, A., Tyagi, A.P., Watson, B., Jiang, H., Kagochi, T., Doerge, R.W., Martienssen, R., Comai, L. (2005) 'Genomic changes in synthetic *Arabidopsis* polyploids', *The Plant Journal*, 41, 221–230.
- Małecka, J., Poppek, R. (1982) 'Karyological studies in the Polish representatives of the genus *Rosa* L. I', *Acta biologica Cracoviensia. Series Botanica*, 14, 79–90.
- Małecka, J., Poppek, R. (1984) 'Karyological studies in the Polish representatives of the genus

- Rosa* L. II', *Acta biologica Cracoviensia. Series Botanica*, 16, 43–54.
- Mallet, J. (2007) 'Hybrid speciation', *Nature*, 446(7133), 279–283.
- Mandáková, T., Kovařík, A., Zozomová-Lihová, J., Shimizu-inatsugi, R., Shimizu, K.K., Mummenhoff, K., Marhold, K., Lysak, M.A. (2013) 'The more the merrier: recent hybridization and polyploidy in *Cardamine*.' *The Plant Cell*, 25(9), 3280–3295.
- Mandáková, T., Mummenhoff, K., Al-Shehbaz, I.A., Mucina, L., Mühlhausen, A., Lysak, M.A. (2012) 'Whole-genome triplication and species radiation in the southern African tribe *Heliophileae* (Brassicaceae)', *Taxon*, 61(5), 989–1000.
- Marchant, B.D., Soltis, D.E., Soltis, P.S. (2016) 'Patterns of abiotic niche shifts in allopolyploids relative to their progenitors', *New Phytologist*, 212(3), 708–718.
- Mason, A.S., Nelson, M.N., Yan, G., Cowling, W.A. (2011) 'Production of viable male unreduced gametes in *Brassica* interspecific hybrids is genotype specific and stimulated by cold temperatures', *BMC Plant Biology*, 11(1), 103.
- Mason, A.S., Pires, J.C. (2015) 'Unreduced gametes: meiotic mishap or evolutionary mechanism?', *Trends in Genetics*, 31(1), 5–10.
- Matyášek, R., Renny-Byfield, S., Fulneček, J., Macas, J., Grandbastien, M.-A., Nichols, R., Leitch, A., Kovařík, A. (2012) 'Next generation sequencing analysis reveals a relationship between rDNA unit diversity and locus number in *Nicotiana* diploids.', *BMC Genomics*, 13, 722.
- Matyášek, R., Tate, J.A., Lim, Y.K., Šrubařová, H., Koh, J., Leitch, A.R., Soltis, D.E., Soltis, P.S., Kovařík, A. (2007) 'Concerted evolution of rDNA in recently formed *Tragopogon* allotetraploids is typically associated with an inverse correlation between gene copy number and expression', *Genetics*, 176(4), 2509–2519.
- Mayr, E. (1942) *Systematics and the Origin of Species, from the Viewpoint of a Zoologist*, Harvard University Press: Cambridge.
- Mayr, E. (1982) *The Growth of Biological Thought: Diversity, Evolution, and Inheritance*, Harvard University Press: Cambridge.
- Mayrose, I., Zhan, S.H., Rothfels, C.J., Arrigo, N., Barker, M.S., Rieseberg, L.H., Otto, S.P. (2015) 'Methods for studying polyploid diversification and the dead end hypothesis: A reply to Soltis et al. (2014)', *New Phytologist*, 206(1), 27–35.
- Mayrose, I., Zhan, S.H., Rothfels, C.J., Magnuson-Ford, K., Barker, M.S., Rieseberg, L.H., Otto, S.P. (2011) 'Recently formed polyploid plants diversify at lower rates', *Science*, 333(6047), 1257.
- McClintock, B. (1984) 'The significance of responses of the genome to challenge.', *Science*, 226(4676), 792–801.
- McCune, B., Grace, J.B., Urban, D.L. (2002) *Analysis of Ecological Communities*, MjM software design: Gleneden Beach.
- McGrath, C.L., Lynch, M. (2012) 'Evolutionary significance of whole-genome duplication', in Soltis, P.S. and Soltis, D.E., eds., *Polyploidy and Genome Evolution*, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 1–20.
- McGregor, C.E., Lambert, C.A., Greyling, M.M., Louw, J.H., Warnich, L. (2000) 'A comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR, AFLP and SSR) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) germplasm', *Euphytica*, 113(2), 135–144.
- McNeill, J., Barrie, F. R., Burdet, H. M., Demoulin, V., Hawksworth, D. L., Marhold, K., Nicolson, D. H., Prado, J., Silva, P. C., Skog, J. E., Wiersema, J. H. & Turland, N. J. (Hrsg.) 2006. International Code of Botanical Nomenclature (Vienna Code) adopted by the Seventeenth International Botanical Congress Vienna, Austria, July 2005. Regnum Vegetabile 146. Gantner Verlag, Ruggell, Liechtenstein.
- Melaragno, J.E. (1993) 'Relationship between endopolyploidy and cell size in epidermal tissue of arabidopsis', *The Plant Cell*, 5(11), 1661–1668.
- Mercure, M., Bruneau, A. (2008) 'Hybridization between the escaped *Rosa rugosa* (Rosaceae) and native *R. blanda* in eastern North America', *American Journal of Botany*, 95(5), 597–607.
- Vander Mijnsbrugge, K., Beeckman, H. (2012) 'Geographically differentiating morphology of genetically similar dogroses: consequences of canina meiosis', *Plant Systematics and*

- Evolution*, 298(9), 1733–1742.
- Moore, G. (2002) 'Meiosis in allopolyploids - The importance of "Teflon" chromosomes', *Trends in Genetics*, 18(9), 456–463.
- Muller, H.J. (1925) 'Why polyploidy is rarer in animals than in plants', *The American Naturalist*, 59(663), 346–353.
- Müntzing, A. (1936) 'The chromosomes of a giant *Populus tremula*', *Hereditas*, 21(2–3), 383–393.
- Nei, M. (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*, Columbia University Press.
- Neves, N., Delgado, M., Silva, M., Caperta, A., Morais-Cecílio, L., Viegas, W. (2005) 'Ribosomal DNA heterochromatin in plants', *Cytogenetic and Genome Research*, 109(1-3), 104–111.
- Norrman, G. a., Quarin, C.L. (1987) 'Permanent odd polyploidy in a grass (*Andropogon ternatus*)', *Genome*, 29(2), 340–344.
- Novak, P., Neumann, P., Pech, J., Steinhaisl, J., Macas, J. (2013) 'RepeatExplorer: a Galaxy-based web server for genome-wide characterization of eukaryotic repetitive elements from next-generation sequence reads', *Bioinformatics*, 29(6), 792–793.
- Nybom, H., Carlson-Nilsson, U., Werlemark, G., Uggla, M. (1997) 'Different levels of morphometric variation in three heterogamous dogrose species (*Rosa* sect. *Caninae*, Rosaceae)', *Plant Systematics and Evolution*, 204(3–4), 207–224.
- Nybom, H., Esselink, G.D., Werlemark, G., Leus, L., Vosman, B. (2006) 'Unique genomic configuration revealed by microsatellite DNA in polyploid dogroses, *Rosa* sect. *Caninae*', *Journal of Evolutionary Biology*, 19(2), 635–648.
- 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, 139–150.
- Orr, H.A. (1990) "'Why polyploidy is rarer in animals than in plants" Revisited', *The American Naturalist*, 136(6), 759–770.
- Otto, S.P., Whitton, J. (2000) 'Polyploid incidence and evolution', *Annual Review of Genetics*, 34(1), 401–437.
- Pachl, Š. (2011) *Variabilita Botanických Druhů Rodu Rosa L., a Možosti Jejich Využití v Krajinářské Tvorbě*. Slovak University of Agriculture, Nitra, Slovakia.
- Parisod, C., Broennimann, O. (2016) 'Towards unified hypotheses of the impact of polyploidy on ecological niches', *New Phytologist*, 212(3), 540–542.
- Parisod, C., Holderegger, R., Brochmann, C. (2010) 'Evolutionary consequences of autopolyploidy', *New Phytologist*, 186(1), 5–17.
- Pecrix, Y., Rallo, G., Folzer, H., Cigna, M., Gudín, S., Le Bris, M. (2011) 'Polyploidization mechanisms: temperature environment can induce diploid gamete formation in *Rosa* sp.', *Journal of Experimental Botany*, 62(10), 3587–3597.
- Van de Peer, Y., Maere, S., Meyer, A. (2009) 'The evolutionary significance of ancient genome duplications', *Nature Reviews Genetics*, 10(10), 725–732.
- Van de Peer, Y., Mizrachi, E., Marchal, K. (2017) 'The evolutionary significance of polyploidy', *Nature Reviews Genetics*, 18(7), 411–424.
- Pires, N.D., Grossniklaus, U. (2014) 'Different yet similar: evolution of imprinting in flowering plants and mammals', *F1000Prime Reports*, 6, 63.
- Plongthongkum, N., Diep, D.H., Zhang, K. (2014) 'Advances in the profiling of DNA modifications: cytosine methylation and beyond', *Nature Reviews Genetics*, 15(10), 647–661.
- Poczai, P., Hyvönen, J. (2010) 'Nuclear ribosomal spacer regions in plant phylogenetics: problems and prospects', *Molecular Biology Reports*, 37(4), 1897–1912.
- Popek, R.C. (1996) *Biosystematyczne Studia Nad Rodzajem Rosa L. W Polsce I Krajach Ościennych*, Wydawnictwo Naukowe WSP.
- Popek, R.C. (2007) *Dziko Rosnące Róże Europy*, Oficyna Botanica: Kraków.
- Postlethwait, J.H., Yan, Y.L., Gates, M.A., Horne, S., Amores, A., Brownlie, A., Donovan, A., Egan, E.S., Force, A., Gong, Z., Goutel, C., Fritz, A., Kelsh, R., Knapik, E., Liao, E., Paw, B., Ransom, D., Singer, A., Thomson, M., Abduljabbar, T.S., Yelick, P., Beier, D., Joly, J.S., Larhammar, D., Rosa, F., Westerfield, M., Zon, L.I., Johnson, S.L., Talbot, W.S. (1998)

- 'Vertebrate genome evolution and the zebrafish gene map.', *Nature Genetics*, 18(4), 345–349.
- Pritchard, J.K., Stephens, M., Donnelly, P. (2000) 'Inference of population structure using multilocus genotype data'. *Genetics*, 155, 945–959
- R Development Core Team (2015) *R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2013.*
- Ramanna, M.S., Kuipers, A.G.J., Jacobsen, E. (2003) 'Occurrence of numerically unreduced (2n) gametes in *Alstroemeria* interspecific hybrids and their significance for sexual polyploidisation', *Euphytica*, 133(1), 95–106.
- Ramsey, J. (2007) 'Unreduced gametes and neopolyploids in natural populations of *Achillea borealis* (Asteraceae)', *Heredity*, 98(3), 143–150.
- Ramsey, J., Ramsey, T.S. (2014) 'Ecological studies of polyploidy in the 100 years following its discovery.', *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 369(1648), 1–76.
- Ramsey, J., Schemske, D.W. (1998) 'Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants', *Annual Review of Ecology and Systematics*, 29(1), 467–501.
- Ramsey, J., Schemske, D.W. (2002) 'Neopolyploidy in flowering plants', *Annual Review of Ecology and Systematics*, 33(1), 589–639.
- Rapp, R.A., Wendel, J.F. (2005) 'Epigenetics and plant evolution', *New Phytologist*, 168, 81–91
- Raybould, A.F., Gray, A.J., Lawrence, M.J., Marshall, D.F. (1991) 'The evolution of *Spartina anglica* CE Hubbard (Gramineae): origin and genetic variability', *Biological Journal of the Linnean Society*, 43(43), 111–126.
- Rehder, A. (1940) *Manual of Cultivated Trees and Shrubs Hardy in North America Exclusive of the Subtropical and Warmer Temperate Regions*, 2nd ed, Macmillan: New York.
- Reichert, H. (1998) 'Die zwei Wuchstypen bei Rosen der Sektion *Caninae* und ein Vorschlag für eine Kurzbezeichnung derselben', *Acta Rhodologica*, 1, 29–35.
- Remagnino, P., Mayo, S., Wilkin, P., Cope, J., Kirkup, D. (2017) 'Machine learning for plant leaf analysis', in *Computational Botany: Methods for Automated Species Identification*, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 57–79.
- Renny-Byfield, S., Chester, M., Kovařík, A., Le Comber, S.C., Grandbastien, M.-A., Deloger, M., Nichols, R.A., Macas, J., Novak, P., Chase, M.W., Leitch, A.R. (2011) 'Next generation sequencing reveals genome downsizing in allotetraploid *Nicotiana tabacum*, predominantly through the elimination of paternally derived repetitive DNAs', *Molecular Biology and Evolution*, 28(10), 2843–2854.
- Renny-Byfield, S., Wendel, J.F. (2014) 'Doubling down on genomes: polyploidy and crop plants', *American Journal of Botany*, 101(10), 1711–1725.
- De Riek, J., De Cock, K., Smulders, M.J.M., Nybom, H. (2013) 'AFLP-based population structure analysis as a means to validate the complex taxonomy of dogroses (*Rosa* section *Caninae*)', *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 67(3), 547–559.
- Rieseberg, L.H., Sinervo, B., Linder, C.R., Ungerer, M.C., Arias, D.M. (1996) 'Role of gene interactions in hybrid speciation: evidence from ancient and experimental hybrids', *Science*, 272(5262), 741–745.
- 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.
- Ritz, C.M., Wissemann, V. (2003) 'Male correlated non-matrocinal character inheritance in reciprocal hybrids of *Rosa* section *Caninae* (DC.) Ser. (Rosaceae)', *Plant Systematics and Evolution*, 241(3–4), 213–221.
- Ritz, C.M., Wissemann, V. (2011) 'Microsatellite analyses of artificial and spontaneous dogrose hybrids reveal the hybridogenic origin of *Rosa micrantha* by the contribution of unreduced gametes', *Journal of Heredity*, 102(2), 217–227.
- Rogers, S.O., Bendich, A.J. (1987) 'Ribosomal RNA genes in plants: variability in copy number and in the intergenic spacer', *Plant Molecular Biology*, 9(5), 509–520.
- Rowley, G.D. (1956) 'Germination in *Rosa canina*.', *American Rose Annual*, 41, 70–73.
- Ruprecht, C., Lohaus, R., Vanneste, K., Mutwil, M., Nikoloski, Z., Van de Peer, Y., Persson, S.

- (2017) 'Revisiting ancestral polyploidy in plants', *Science Advances*, 3(7), e1603195.
- Schanzer, I.A., Kutlunina, N.A. (2010) 'Interspecific hybridization in wild roses (*Rosa* L. sect. *Caninae* DC.)', *Biology Bulletin*, 37(5), 564–573.
- Schanzer, I. a., Vagina, A.V.A. V. (2007) 'ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) markers reveal natural intersectional hybridization in wild roses [*Rosa* L., sect. *Caninae* (DC.) Ser. and sect. *Cinnamomeae* (DC.) Ser.]', *Wulfenia*, 14, 1–14.
- Schlötterer, C., Tautz, D. (1994) 'Chromosomal homogeneity of *Drosophila* ribosomal DNA arrays suggests intrachromosomal exchanges drive concerted evolution', *Current Biology*, 4(9), 777–783.
- Schranz, E.M., Mohammadin, S., Edger, P.P. (2012) 'Ancient whole genome duplications, novelty and diversification: The WGD Radiation Lag-Time model', *Current Opinion in Plant Biology*, 15(2), 147–153.
- Schwarzacher, T., Heslop-Harrison, P. (2000) *Practical in situ hybridization*, BIOS Scientific, Oxford, UK.
- Segraves, K.A. (2017) 'The effects of genome duplications in a community context', *New Phytologist*, 215(1), 57–69.
- Segraves, K.A., Anneberg, T.J. (2016) 'Species interactions and plant polyploidy', *American Journal of Botany*, 103(7), 1326–1335.
- Sharma, S.K., Yamamoto, M., Mukai, Y. (2016) 'Molecular cytogenetic approaches in exploration of important chromosomal landmarks in plants', In: Rajpal V., Rao S., Raina S. (eds) *Molecular Breeding for Sustainable Crop Improvement. Sustainable Development and Biodiversity*, 11, Springer, Cham, 127–148.
- Sheat, W.G. (1948) *Propagation of Trees, Shrubs and Conifers*, MacMillan and Co.
- Sleigh, M.A. (1991) *Protozoa and Other Protists*, Cambridge University Press, Cambridge.
- Šmarda, P., Hejčman, M., Březinová, A., Horová, L., Steigerová, H., Zedek, F., Bureš, P., Hejčmanová, P., Schellberg, J. (2013) 'Effect of phosphorus availability on the selection of species with different ploidy levels and genome sizes in a long-term grassland fertilization experiment', *New Phytologist*, 200(3), 911–921.
- De Smet, R., Van de Peer, Y. (2012) 'Redundancy and rewiring of genetic networks following genome-wide duplication events', *Current Opinion in Plant Biology*, 15(2), 168–176.
- Smith, G. (1976) 'Evolution of repeated DNA sequences by unequal crossover', *Science*, 191(4227), 528–535.
- Sochorová, J., Coriton, O., Kuderová, A., Lunerová, J., Chèvre, A.M., Kovařík, A. (2017) 'Gene conversion events and variable degree of homogenization of rDNA loci in cultivars of *Brassica napus*', *Annals of Botany*, 119(1), 13–26.
- Soltis, D.E., Albert, V.A., Leebens-Mack, J., Bell, C.D., Paterson, A.H., Zheng, C., Sankoff, D., dePamphilis, C.W., Wall, P.K., Soltis, P.S. (2009) 'Polyploidy and angiosperm diversification', *American Journal of Botany*, 96(1), 336–348.
- Soltis, D.E., Segovia-Salcedo, M.C., Jordon-Thaden, I., Majure, L., Miles, N.M., Mavrodiev, E. V., Mei, W., Cortez, M.B., Soltis, P.S., Gitzendanner, M.A. (2014) 'Are polyploids really evolutionary dead-ends (again)? A critical reappraisal of Mayrose et al. (2011)', *New Phytologist*, 202(4), 1105–1117.
- Soltis, D.E., Soltis, P.S., Schemske, D.W., Hancock, J.F., Thompson, J.N., Husband, B.C., Judd, W.S. (2007) 'Autopolyploidy in angiosperms: Have we grossly underestimated the number of species?', *Taxon*, 56, 13–30.
- Soltis, D.E., Visger, C.J., Blaine Marchant, D., Soltis, P.S. (2016) 'Polyploidy: pitfalls and paths to a paradigm', *American Journal of Botany*, 103(7), 1146–1166.
- Soltis, D.E., Visger, C.J., Soltis, P.S. (2014) 'The polyploidy revolution then...and now: Stebbins revisited', *American Journal of Botany*, 101(7), 1057–1078.
- Soltis, P.S. (2013) 'Hybridization, speciation and novelty.', *Journal of evolutionary biology*, 26(2), 291–3.
- Soltis, P.S., Liu, X., Marchant, D.B., Visger, C.J., Soltis, D.E. (2014) 'Polyploidy and novelty: Gottlieb's legacy', *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 369(1648), 20130351.
- Soltis, P.S., Marchant, D.B., Van de Peer, Y., Soltis, D.E. (2015) 'Polyploidy and genome

- evolution in plants', *Current Opinion in Genetics and Development*, 35, 119–125.
- Soltis, P.S., Soltis, D.E. (2000) 'The role of genetic and genomic attributes in the success of polyploids.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(13), 7051–7057.
- Soltis, P.S., Soltis, D.E. (2009) 'The role of hybridization in plant speciation', *Annual Review of Plant Biology*, 60(1), 561–588.
- Soltis, P.S., Soltis, D.E. (2012) *Polyploidy and Genome Evolution*, Polyploidy and Genome Evolution, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg.
- Soltis, P.S., Soltis, D.E. (2016) 'Ancient WGD events as drivers of key innovations in angiosperms', *Current Opinion in Plant Biology*, 30, 159–165.
- Spoelhof, J.P., Soltis, P.S., Soltis, D.E. (2017) 'Pure polyploidy: Closing the gaps in autopolyploid research', *Journal of Systematics and Evolution*, 55(4), 340–352.
- Stebbins, G.L. (1947) 'Types of polyploids: their classification and significance', *Advances in Genetics*, 1(C), 403–429.
- Stebbins, G.L. (1950) *Variation and Evolution in Plants*, Columbia University Biological Series, Columbia University Press: New York.
- Stebbins, G.L. (1971) *Chromosomal Evolution in Higher Plants*, Addison-Wesley: London.
- Stöck, M., Lamatsch, D.K., Steinlein, C., Epplen, J.T., Grosse, W.-R., Hock, R., Klapperstück, T., Lampert, K.P., Scheer, U., Schmid, M., Scharl, M. (2002) 'A bisexually reproducing all-triploid vertebrate', *Nature Genetics*, 30(3), 325–328.
- De Storme, N., Geelen, D. (2013) 'Sexual polyploidization in plants - cytological mechanisms and molecular regulation.', *The New Phytologist*, 198(3), 670–684.
- De Storme, N., Mason, A. (2014) 'Plant speciation through chromosome instability and ploidy change: Cellular mechanisms, molecular factors and evolutionary relevance', *Current Plant Biology*, 1, 10–33.
- De Storme, N., Zamariola, L., Mau, M., Sharbel, T.F., Geelen, D. (2013) 'Volume-based pollen size analysis: an advanced method to assess somatic and gametophytic ploidy in flowering plants', *Plant Reproduction*, 26(2), 65–81.
- Suarez, E.Y., Lopez, A.G., Naranjo, C.A. (1992) 'Polyspermy versus unreduced male gametes as the origin of nonaploids (9x) common wheat plants', *Caryologia*, 45(1), 21–28.
- 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.
- Tank, D.C., Eastman, J.M., Pennell, M.W., Soltis, P.S., Soltis, D.E., Hinchliff, C.E., Brown, J.W., Sessa, E.B., Harmon, L.J. (2015) 'Nested radiations and the pulse of angiosperm diversification: Increased diversification rates often follow whole genome duplications', *New Phytologist*, 207(2), 454–467.
- Tate, J.A. (2006) 'Evolution and expression of homeologous loci in *Tragopogon miscellus* (Asteraceae), a recent and reciprocally formed allopolyploid', *Genetics*, 173(3), 1599–1611.
- Tate, J.A., Soltis, P.S., Soltis, D.E. (2005) 'Polyploidy in plants', in *The Evolution of the Genome*, ed. TR Gregory, Elsevier Academic, San Diego, 371–426.
- Terefe-Ayana, D., Kaufmann, H., Linde, M., Debener, T. (2012) 'Evolution of the *Rdr1* TNL-cluster in roses and other Rosaceous species.', *BMC genomics*, 13(1), 409.
- Theodoridis, S., Randin, C., Broennimann, O., Patsiou, T., Conti, E. (2013) 'Divergent and narrower climatic niches characterize polyploid species of European primroses in *Primula* sect. *Aleuritia*', *Journal of Biogeography*, 40(7), 1278–1289.
- Thiel, T., Michalek, W., Varshney, R., Graner, A. (2003) 'Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived SSR-markers in barley (*Hordeum vulgare* L.)', *Theoretical and Applied Genetics*, 106(3), 411–422.
- Tiffin, P., Olson, M.S., Moyle, L.C. (2001) 'Asymmetrical crossing barriers in angiosperms', *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 268(1469), 861–867.
- Toda, E., Okamoto, T. (2016) 'Formation of triploid plants via possible polyspermy', *Plant Signaling & Behavior*, 11(9), e1218107.

- Vanneste, K., Baele, G., Maere, S., Van de Peer, Y. (2014) 'Analysis of 41 plant genomes supports a wave of successful genome duplications at the Cretaceous-Tertiary boundary', *Genome Research*, 24(8), 1334–1347.
- Via, S. (2009) 'Natural selection in action during speciation.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 9939–9946.
- Vigfússon, E. (2009) 'On polyspermy in the sunflower', *Hereditas*, 64(1), 1–52.
- Vogt, J.C. (2013) *Untersuchungen zur Genexpression in einer Hybridpopulation von Hundsrosen auf dem Strohmberg (Oberlausitz/Sachsen)*, Masterarbeit, Technische Universität Dresden.
- Vogt, J.C., Herklotz, V., Ritz, C.M. (2015) 'Epigenetic patterns in genetically imbalanced polyploid dog rose hybrids (*Rosa* L. sect. *Caninae* (DC.) Ser.) revealed by cDNA-Amplified Fragment Length Polymorphisms and Methylation-Sensitive Amplified Polymorphisms', *International Journal of Plant Sciences*, 176(5), 433–445.
- Volkov, R.A., Komarova, N.Y., Hemleben, V. (2007) 'Ribosomal DNA in plant hybrids: inheritance, rearrangement, expression', *Systematics and Biodiversity*, 5(3), 261–276.
- Vukosavljev, M., Arens, P., Voorrips, R.E., Westende, W.P.C. Van, Esselink, G.D., Bourke, P.M., Cox, P., Weg, W.E. Van De, Visser, R.G.F., Maliepaard, C., Smulders, M.J.M. (2016) 'High-density SNP-based genetic maps for the parents of an outcrossed and a selfed tetraploid garden rose cross, inferred from admixed progeny using the 68k rose SNP array', *Horticulture Research*, 3(1), 16052.
- Wagner, W.H. (1970) 'Biosystematics and evolutionary noise', *Taxon*, 19(2), 146–151.
- Wang, H., Jiang, J., Chen, S., Fang, W., Guan, Z., Liao, Y., Chen, F. (2013) 'Rapid genomic and transcriptomic alterations induced by wide hybridization: *Chrysanthemum nankingense* × *Tanacetum vulgare* and *C. crassum* × *Crossostephium chinense* (Asteraceae)', *BMC Genomics*, 14(1), 1–10.
- Wang, J., Li, D.-L., Kang, X.-Y. (2012) 'Induction of unreduced megaspores with high temperature during megasporogenesis in *Populus*', *Annals of Forest Science*, 69(1), 59–67.
- Wang, J., Li, D., Shang, F., Kang, X. (2017) 'High temperature-induced production of unreduced pollen and its cytological effects in *Populus*', *Scientific Reports*, 7(1), 5281.
- Weiss-Schneeweiss, H., Emadzade, K., Jang, T.-S., Schneeweiss, G.M. (2013) 'Evolutionary consequences, constraints and potential of polyploidy in plants', *Cytogenetic and Genome Research*, 140(2–4), 137–150.
- Wendel, J.F. (2000) 'Genome evolution in polyploids', *Plant Molecular Biology*, 42(1), 225–249.
- Wendel, J.F. (2015) 'The wondrous cycles of polyploidy in plants', *American Journal of Botany*, 102(11), 1753–1756.
- Wendel, J.F., Schnabel, A., Seelanan, T. (1995) 'Bidirectional interlocus concerted evolution following allopolyploid speciation in cotton (*Gossypium*).', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(1), 280–284.
- Werlemark, G. (2000) 'Evidence of apomixis in hemisexual dogroses, *Rosa* section *Caninae*', *Sexual Plant Reproduction*, 12(6), 353–359.
- Wesenberg, J., Gebauer, P., Ritz, C.M. (2015) *Rosa* L. [online], in *Bestimmungskritische Taxa der deutschen Flora. Herbarium Senckenbergianum Frankfurt/Main, Görlitz & Herbarium Haussknecht Jena*, available: <http://webapp.senckenberg.de/bestikri>.
- Wheeler, Q.D., Meier, R. (Eds.) (2000) *Species Concepts and Phylogenetic Theory: A Debate*, Columbia University Press, New York.
- Wiley, E.O., Mayden, R.L. (2000) 'The evolutionary species concept', in Wheeler, Q.D. and Meier, R., eds., *Species Concepts and Phylogenetic Theory: A Debate*, Columbia University Press, New York, 70–89.
- Winfield, M.O., Wilson, P.J., Labra, M., Parker, J.S. (2003) 'A brief evolutionary excursion comes to an end: The genetic relationship of British species of *Gentianella* sect. *Gentianella* (Gentianaceae)', *Plant Systematics and Evolution*, 237(3–4), 137–151.
- Winkler, H. (1908) 'Über Parthenogenesis und Apogamie im Pflanzenreich', in *Progressus Rei Botanicae. Bd.2*, 293–454.
- Wissemann, V. (2000) 'Molekulargenetische und morphologisch-anatomische Untersuchungen

- zur Evolution und Genomzusammensetzung von Wildrosen der Sektion *Caninae* (DC.) Ser.', *Botanische Jahrbücher für Systematik*, 122(3), 357–429.
- Wissemann, V. (2003) 'Conventional taxonomy of wild roses', in Roberts, A., Debener, T. and Gudin, S., eds., *Encyclopedia of Rose Science*, Elsevier: London, 111–117.
- 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 *atpB-rbcL* intergenic spacer (IGS) versus conventional taxonomy', *Botanical Journal of the Linnean Society*, 147(3), 275–290.
- Wood, T.E., Takebayashi, N., Barker, M.S., Mayrose, I., Greenspoon, P.B., Rieseberg, L.H. (2009) 'The frequency of polyploid speciation in vascular plants.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(33), 13875–13879.
- Woodhouse, M.R., Cheng, F., Pires, J.C., Lisch, D., Freeling, M., Wang, X. (2014) 'Origin, inheritance, and gene regulatory consequences of genome dominance in polyploids', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(14).
- Woodhouse, M.R., Schnable, J.C., Pedersen, B.S., Lyons, E., Lisch, D., Subramaniam, S., Freeling, M. (2010) 'Following tetraploidy in maize, a short deletion mechanism removed genes preferentially from one of the two homeologs', *PLoS Biology*, 8(6), e1000409.
- Wright, S. (1943) 'Isolation by Distance', *Genetics*, 28(2), 114–138.
- Wu, C.-I. (2001) 'The genic view of the process of speciation', *Journal of Evolutionary Biology*, 14(6), 851–865.
- Wulff, H.D. (1954a) 'Über das spontane Auftreten einer *Caninae*-Meiosis bei der Mikrosporogenese der diploiden *Rosa ruga* Lindl.', *Österreichische Botanische Zeitschrift*, 101(5), 539–557.
- Wulff, H.D. (1954b) 'Cytologische Untersuchungen an einer fertilen triploiden Rose', *Planta*, 44(5), 472–490.
- Wulff, H.D. (1954c) 'Cytologische untersuchungen an einem pentaploiden Rosenbastard (*Rosa* hybr. "315") und seiner Nachkommenschaft', *Planta*, 43(5), 420–439.
- Wyatt, R., Odrzykoski, I.J., Stoneburner, A., Bass, H.W., Galau, G.A. (1988) 'Allopolyploidy in bryophytes: multiple origins of *Plagiomnium medium*.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(15), 5601–5604.
- Yokoya, K., Roberts, A., Mottley, J. (2000) 'Nuclear DNA amounts in roses', *Annals of Botany*, 85(4), 557–561.
- Zerbino, D.R., Birney, E. (2008) 'Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs', *Genome Research*, 18(5), 821–829.
- Zhan, S.H., Drori, M., Goldberg, E.E., Otto, S.P., Mayrose, I. (2016) 'Phylogenetic evidence for cladogenetic polyploidization in land plants', *American Journal of Botany*, 103(7), 1252–1258.
- Zhang, H., Bian, Y., Gou, X., Zhu, B., Xu, C., Qi, B., Li, N., Rustgi, S., Zhou, H., Han, F., Jiang, J., von Wettstein, D., Liu, B. (2013) 'Persistent whole-chromosome aneuploidy is generally associated with nascent allohexaploid wheat', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(9), 3447–3452.
- Zhang, J., Esselink, G.D., Che, D., Fougère-Danezan, M., Arens, P., Smulders, M.J.M. (2013) 'The diploid origins of allopolyploid rose species studied using single nucleotide polymorphism haplotypes flanking a microsatellite repeat', *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 88(1), 85–92.
- Zhu, Z.-M., Gao, X.-F., Fougère-Danezan, M. (2015) 'Phylogeny of *Rosa* sections *Chinenses* and *Synstylae* (Rosaceae) based on chloroplast and nuclear markers', *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 87, 50–64.
- Zozomová-Lihová, J., Mandáková, T., Kovaříková, A., Mühlhausen, A., Mummenhoff, K., Lysak, M.A., Kovařík, A. (2014) 'When fathers are instant losers: homogenization of rDNA loci in recently formed *Cardamine* × *schulzii* trigenomic allopolyploid', *New Phytologist*, 203, 1096–1108.

## Danksagung

Diese Arbeit wurde am Senckenberg Museum für Naturkunde Görlitz in der Abteilung Botanik angefertigt.

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein herzlichster Dank gilt meiner Betreuerin Dr. Christiane Ritz für die Möglichkeit das Thema Hundsrosen über meine Masterarbeit hinaus bis in diese Tiefen bearbeiten zu dürfen. Ich danke ihr für die gute Zusammenarbeit, die vielen konstruktiven wissenschaftlichen Diskussionen, den Spaß und für ihre einzigartige Fähigkeit zur Motivation.

Ebenso danke ich Prof. Dr. Karsten Wesche als Leiter der Abteilung Botanik und Erstgutachter dieser Arbeit für die Möglichkeit am Senckenberg Museum für Naturkunde Görlitz zu arbeiten und an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg zu promovieren. Ich danke für die Hilfe bei statistischen Fragen, für das Gegenlesen der Manuskripte, sowie für die stets offene und freundliche Unterstützung.

Ich möchte mich außerdem für die Übernahme der Begutachtung dieser Arbeit bei Prof. Dr. Martin Röser, sowie bei dem dritten Gutachter bedanken.

Bei Dr. Jens Wesenberg bedanke ich mich besonders für die vielen guten Ratschläge und die überaus nützlichen Anmerkungen zu dieser Arbeit. Mein Dank gilt auch Dr. Volker Otte für die Nutzung des Mikroskops und die vielen anregenden Diskussionen.

Zudem danke ich besonders RNDr. Aleš Kovařík CSc. und Ph.D. Jana Lunerová Mgr. für die gute Zusammenarbeit, den Wissenstransfer und Hilfe bei der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung und der freundlichen Aufnahme am Institut für Biophysik der Tschechischen Akademie der Wissenschaften in Brno.

Dr. Juraj Paule vom Senckenberg Forschungsinstitut und Naturkundemuseum Frankfurt danke ich für die Hilfe bei der Durchflusszytometrie.

Bei Dr. Marco Groth vom Leibniz-Institut für Altersforschung in Jena bedanke ich mich für die Illumina-Sequenzierungen und Unterstützung bei der komplexen NGS-Thematik.

Gedankt seien Prof. Dr. Roland Schubert und Heike Hohlfeld von der Hochschule Zittau/Görlitz für die Hilfe bei der Dichtegradientenzentrifugation.

Bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft, der Senckenberg DNA-Bank, der Paul-Ungerer Stiftung, dem Förderkreis des Naturkundemuseums Görlitz, Herrn Kohli vom Autohaus Klische in Görlitz bedanke ich mich für Finanzierung und Logistik.

Für die exzellente technische Unterstützung und die gute Zusammenarbeit bedanke ich mich bei PD Dr. Thomas Berberich und allen Mitarbeitern des BiK-F Laborzentrums in Frankfurt.

Ohne die vielen Botaniker und Rosenfreunde wären meine Sammeltätigkeiten nicht möglich gewesen. Bedanken möchte ich mich daher bei: I. Schanzer, V. Kerényi-Nagy, B. und J. Adler, S. Buhr, Z. Dajdok, P. Erzberger, T. Gregor, Z. Hroudová, N. Jogan, Z. Kački, G. Kleesadl, H. Korsch, S. Kühnel, S. Kovac, M. Lepší, P. Mair, A. Mohr, A. Mrkvicka, M. Oldja, R. Paulič, F. Prosser, J. Pusch, H. Reichert, W. Rottensteiner, H. Sonnenberg, F. Starlinger und H. Wolf.

Mein besonderer Dank gilt der technischen Assistenz der Abteilung Botanik und des Labors: Michaela Schwager, Bettina Schlitt, Petra Gebauer und Renate Christian sowie den Mitarbeitern der Verwaltung: Rolf Bernd, Carolin Brinner, Sabine Dittrich, Carola Rücker.

Den in meinen Projekt beteiligten Studierenden und Praktikanten sei ebenfalls herzlich gedankt: Janina Vogt, Nadine Mieder, Diana Altmann, Stefan Dorf, Susan Lippitsch und Alisia Smolka.

## Erklärung über den persönlichen Anteil an den Publikationen

### Manuskript I

Herklotz, V., Ritz, C.M. (2017) Multiple and asymmetrical origin of polyploid dog rose hybrids (*Rosa* L. sect. *Caninae* (DC.) Ser.) involving unreduced gametes. *Annals of Botany* 120, 209–220.

Materialaufsammlung	Veit Herklotz (100%)
Laborarbeit	Veit Herklotz (80%), Nadine Mieder (10%), Stefan Dorf (5%), Diana Altmann (5%)
Analysen	Veit Herklotz (90%), Christiane Ritz (10%)
Manuskript	Veit Herklotz (80%), Christiane Ritz (20%)

### Manuskript II

Herklotz, V., Mieder, N., Ritz, C. M. (2017) Cytological, genetic and morphological variation in mixed stands of dogroses (*Rosa* L. sect. *Caninae* (DC.) Ser.) in Germany with a focus on the hybridogenic *R. micrantha* Sm. *Botanical Journal of the Linnean Society* 184, 254–271.

Materialaufsammlung	Veit Herklotz (100%)
Laborarbeit	Veit Herklotz (70%), Nadine Mieder (30%)
Analysen	Veit Herklotz (70%), Nadine Mieder (20%), Christiane Ritz (10%)
Manuskript	Veit Herklotz (80%), Christiane Ritz (20%)

**Manuskript III**

Herklotz, V., Kovařík, A., Lunerová, J., Lippitsch, S., Groth, M., Ritz, C. M. (2018) The fate of ribosomal RNA genes in spontaneous polyploid dogrose hybrids (*Rosa* L. sect. *Caninae* (DC.) Ser.) exhibiting non-symmetrical meiosis. *The Plant Journal* 94, 77–90.

Materialaufsammlung	Veit Herklotz (100%)
Laborarbeit	Veit Herklotz (70%), Jana Lunerová (20%), Susan Lippitsch (10%)
Analysen	Veit Herklotz (60%), Aleš Kovařík (20%) Marco Groth (10%), Susan Lippitsch (10%)
Manuskript	Veit Herklotz (70%), Christiane Ritz (20%), Aleš Kovařík (10%)

**Manuskript IV**

Vogt, J.C., Herklotz, V., Ritz, C.M. (2015) Epigenetic patterns in genetically imbalanced polyploid dog rose Hybrids (*Rosa* L. sect. *Caninae* (DC.) Ser.) revealed by cDNA–Amplified Fragment Length Polymorphisms and Methylation-Sensitive Amplified Polymorphisms, *International Journal of Plant Sciences*, 176(5), 433–445.

Materialaufsammlung	Janina Vogt (90%), Veit Herklotz (10%)
Laborarbeit	Janina Vogt (80%), Veit Herklotz (20%)
Analysen	Veit Herklotz (70%), Janina Vogt (30%)
Manuskript	Veit Herklotz (60%), Christiane Ritz (40%)

Görlitz, den

Unterschrift

■ **Veit Herklotz**

Rietschel Straße 26  
02763 Zittau  
weit.herklotz@freenet.de  
weit.herklotz@senckenberg.de

## Lebenslauf

### Persönliche Angaben

Geburtsdatum 15. Oktober 1982 in Dresden  
Nationalität deutsch  
Familienstand ledig, zwei Kinder (\*2015; \*2018)

### Ausbildung und Berufserfahrung

seit 05/2016	<b>wissenschaftlicher Mitarbeiter</b> im DFG-Projekt "Polyploidy generates beauty: exploration of complex rose genomes (Rosa L. sect. Caninae (DC.) Ser.)" am Senckenberg Museum für Naturkunde Görlitz
09/2014 bis 08/2015	<b>wissenschaftlicher Mitarbeiter</b> am Senckenberg Museum für Naturkunde Görlitz
09/2012 bis 08/2014	<b>wissenschaftlicher Volontär</b> am Senckenberg Museum für Naturkunde Görlitz
01/2012	Abschluss als <b>Master of Science in Biotechnologie und Angewandte Ökologie</b> (Note 1,2) Internationales Hochschulinstitut Zittau (IHI)
10/2009 bis 04/2011	<b>Studium Biotechnologie und Angewandte Ökologie</b> Internationales Hochschulinstitut Zittau (IHI) <ul style="list-style-type: none"> <li>• Schwerpunkt Biotechnologie</li> <li>• Spezialisierung auf Molekularbiologie</li> </ul> <p>Masterarbeit: „Populationsgenetik und Hybridisierung von Hundsrosen auf dem Strohberg (Oberlausitz/Sachsen)“ (Note 1,0) am Senckenberg Museum für Naturkunde Görlitz</p>
09/2009	Abschluss als <b>Bachelor of Science in Biotechnologie</b> (Note 1,4) Hochschule Zittau/Görlitz
09/2006 bis 04/2009	<b>Studium Biotechnologie</b> Hochschule Zittau/Görlitz <ul style="list-style-type: none"> <li>• Schwerpunkt molekulare Biotechnologie</li> <li>• Spezialisierung auf Molekularbiologie</li> </ul>

	Bachelorarbeit: „Isolation of a chitin synthase gene from apple powdery mildew <i>Podosphaera leucotricha</i> (Ell. et Ev.) SALM.“ (Note 1,0) am Julius Kühn-Institut (JKI) Institut für Züchtungsforschung an gartenbaulichen Kulturen und Obst, Standort Dresden-Pillnitz
08/2005 bis 07/2006	<b>Fachabitur</b> (Note 2,3) BSZ für Agrarwirtschaft und Ernährung Dresden
07/2005	Facharbeiter <b>Gärtner – Garten- und Landschaftsbau</b>
08/2002 bis 07/2005	<b>Ausbildung zum Gärtner – Garten und Landschaftsbau</b> Berufsförderungswerk Dresden

### Publikationen

Herklotz, V., Kovařík, A., Lunerová, J., Lippitsch, S., Groth, M., Ritz, C.M. (2018) The fate of ribosomal RNA genes in spontaneous polyploid dogrose hybrids (*Rosa* L. sect. *Caninae* (DC.) Ser.) exhibiting non-symmetrical meiosis. *The Plant Journal*, 94. pp. 77-90.

Herklotz, V., Mieder, N., Ritz, C.M. (2017) Cytological, genetic and morphological variation in mixed stands of dogroses (*Rosa* section *Caninae*, Rosaceae) in Germany with a focus on the hybridogenic *R. micrantha*. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 184 (2). pp. 254-271. ISSN 0024-4074

Herklotz, V. & Ritz, C.M. (2017) Multiple and asymmetric origin of polyploid dogrose hybrids (*Rosa* L. sect. *Caninae* (DC.) Ser.) involving unreduced gametes. *Annals of Botany*, 120 (2). pp. 209-220.

Laudien, M., Herklotz, V., Ritz, C.M., Lunerová, J., Kovařík, A. (2017) Differential chromosome evolution in two dogrose lineages (*Rosa* sect. *Caninae*). In: Geobiodiversity - An Integrative Approach Expanding Humboldt's Vision, 01.-03.10.2017, Frankfurt am Main.

Lunerová, J., Herklotz, V., Laudien, M., Ritz, C.M., Kovařík, A. (2017) Insights into genome structure of two pentaploid dogroses harbouring a unique asymmetrical meiotic system. In: XIX International Botanical Congress, Shenzhen.

Ritz, C.M. & Herklotz, V. (2017) Chromosomenevolution in Hundsrosen. In: Jahrestagung der Gesellschaft zur Erforschung der Flora Deutschlands.

Herklotz, V., Lunerová, J., Kovařík, A., Ritz, C.M. (2016) The fate of ribosomal RNA genes in spontaneous dogrose hybrids (*Rosa* sect. *Caninae* (DC.) Ser.). In: International Conference on Polyploidy, Hybridization and Biodiversity, 11.05.-14.05.2016, Rvinj, Croatia.

Lesemann, S.S., Bölke, N., Tejada-Fernandez, C.E., Gerischer, U., Buschmann, S., Herklotz, V., Neinhuis, C., Ritz, C.M., Olbricht, K. (2017) Fruit diversity in a natural European habitat of *Fragaria moschata* Weston. *Acta Horticulturae*, 1156. pp. 215-222.

Ritz, C.M. & Herklotz, V. (2016) Recurrent origin of asymmetric dogrose hybrids (*Rosa* sect. *Caninae* (DC.) Ser.) in Central and Eastern Europe. In: 23rd Symposium on Biodiversity and Evolutionary Biology, 08.-11.09.2016, Munich.

Herklotz, V., Fiedler, S., Kovařík, A., Ritz, C.M. (2015) FISHing in a pond of odd-ploid species: The fate of ribosomal RNA genes in spontaneous dogrose hybrids (*Rosa* L. sect. *Caninae* (DC.)). In: From Molecules to the field. Botanikertagung 2015, 30.08.-3.9.2015, Freising.

Vogt, J.C., Herklotz, V., Ritz, C.M. (2015) Epigenetic patterns in genetically imbalanced polyploid dogrose hybrids (*Rosa* L. sect. *Caninae* (DC.) Ser.) revealed by cDNA-AFLPs and MSAPs. *International Journal of Plant Sciences*, 176 (6). pp. 433-445.

Herklotz, V., Ritz, C. M. (2014) Spontane Hybridisierung von Hundsrosen (*Rosa* L. sect. *Caninae* (DC.) Ser.) an einem natürlichen Vorkommen in der Oberlausitz (Sachsen, Deutschland). *Peckiana* 9: 119-131.

Herklotz, V., Gebauer, P., Ritz, C.M. (2012) Mama's baby daddy's maybe: Formation of hybridogenic dogrose species with unbalanced meiosis in natural populations. In: International Conference on Polyploidy, Hybridization, and Biodiversity, 7.5.-10.5. 2012, Průhonice near Prague, Czech Republic.

Herklotz, V., Gebauer, P., Ritz, C.M. (2011) Hybridogenic origin and reproductive biology of *Rosa agrestis* and *R. caesia* in eastern Saxony. In: 20th Congress of the German Botanical Society (DBG), 18.9.-22.9.2011, Berlin.

**Eidesstattliche Erklärung**

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig ohne fremde Hilfe verfasst und keine anderen als die im Literaturverzeichnis angegebenen Quellen benutzt habe.

Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder noch nicht veröffentlichten Quellen entnommen sind, sind als solche kenntlich gemacht.

Die Zeichnungen oder Abbildungen in dieser Arbeit sind von mir selbst erstellt worden oder mit einem entsprechenden Quellennachweis versehen.

Diese Arbeit ist in gleicher oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen Prüfungsbehörde eingereicht worden.

Datum, Unterschrift