

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

**Hybridation entre un rosier échappé de culture et un rosier indigène:
Impact sur l'intégrité génétique et morphologique de *Rosa blanda***

par

Marjorie Mercure

Département de Sciences biologiques

Université de Montréal

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de M. Sc.
en Sciences biologiques.

Mai 2007

© Marjorie Mercure, 2007



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Hybridation entre un rosier échappé de culture et un rosier indigène:
Impact sur l'intégrité génétique et morphologique de *Rosa blanda***

présenté par:
Marjorie Mercure

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Luc Brouillet
président-rapporteur

Anne Bruneau
directrice de recherche

Jacques Brisson
membre du jury

Résumé

Ce mémoire porte sur l'hybridation entre le rosier inerme indigène (*Rosa blanda*; Rosaceae) et le rosier rugueux (*R. rugosa*), échappé de culture dans le Nord-Est de l'Amérique du Nord et formant des populations mixtes le long de l'estuaire du St-Laurent. L'objectif de ce mémoire est de documenter l'hybridation entre ces espèces et d'en évaluer l'étendue géographique et la structure génétique pour en dégager les conséquences évolutives et écologiques. Des marqueurs moléculaires chloroplastique et nucléaires ont été développés pour détecter l'hybridation et l'introgression. L'utilité de la morphologie pour la détection des hybrides a été évaluée. Une hybridation fréquente a été détectée et s'accompagne d'une faible introgression bidirectionnelle. Les analyses morphologiques ont identifié des caractères permettant de discriminer les hybrides. Cette hybridation pourrait avoir un impact sur l'intégrité génétique de *R. blanda* dans l'aire sympatrique et pourrait accentuer la compétition écologique posée par *R. rugosa* dans les habitats côtiers de l'estuaire.

Mots clés : *Rosa rugosa*, *Rosa blanda*, hybridation, introgression, conservation, espèce introduite, gènes nucléaires, amorces spécifiques, morphologie

Abstract

This M. Sc. thesis discusses hybridization between the native smooth rose (*Rosa blanda*; Rosaceae) and the introduced Japanese rose (*R. rugosa*), escaped from cultivation in eastern North America. Mixed populations occur along the St. Lawrence River estuary. The objective of this thesis is to document hybridization between these interfertile species and evaluate its geographic extent and genetic structure, in order to assess its evolutionary and ecological consequences. Chloroplast and nuclear molecular markers were developed to detect hybridization and introgression. The use of morphology for hybrid identification was evaluated. Frequent hybridization was detected, which also is accompanied by low bidirectional introgression. Morphological data analyses identified useful characters discriminating hybrids from their parents. This hybridization could locally affect the genetic integrity of *R. blanda* in the area of sympatry and accentuate the ecological competition posed by *R. rugosa* in the coastal habitats of the estuary.

Key words : *Rosa rugosa*, *Rosa blanda*, hybridization, introgression, introduced species, conservation, nuclear genes, allele-specific primers, morphology

Table des matières

Résumé	iii
Abstract	iv
Table des matières	v
Liste des tableaux	vii
Liste des figures.....	viii
Liste des abréviations	ix
Remerciements	x
Chapitre 1 Impacts de l'hybridation anthropique sur la conservation de la biodiversité végétale indigène.....	1
1.1 Impact humain sur les taux d'hybridation.....	2
1.1.1 Perturbation d'habitats	2
1.1.2 Introduction d'espèces.....	3
1.2 Conséquences évolutives et écologiques de l'hybridation vues sous l'angle de la conservation.....	3
1.2.1 Assimilation génétique	5
1.2.2 Dépression due à des croisements distants.....	12
1.2.3 Réduction de la diversité génétique.....	14
1.2.4 Formation d'hybrides compétitifs ou envahissants	14
1.3 Espèces rares menacées par l'hybridation.....	18
1.4 Hybridation entre espèces indigènes et introduites	19
1.5 Gestion des zones hybrides pour la conservation.....	21
1.6 Objectifs	22
Chapitre 2 Hybridization between the escaped <i>Rosa rugosa</i> (Rosaceae) and the native <i>R. blanda</i> in eastern North America.....	24
2.1 Résumé	25
2.2 Abstract	26
2.3 Introduction	27

2.4 Methods	30
2.4.1 Sampling.....	30
2.4.2 Molecular markers.....	36
2.4.3 Molecular analyses	38
2.4.4 Morphological measurements	39
2.4.5 Morphological analyses.....	41
2.4.6 Pollen viability	44
2.5 Results	44
2.5.1 Geographical extent, species involved and North American <i>R. rugosa</i>	44
2.5.2 Molecular analyses	45
2.5.3 Morphological analyses.....	48
2.5.4 Pollen viability	57
2.6 Discussion	57
2.6.1 Use of morphological characters for detecting hybrids.....	57
2.6.2 Use of molecular markers for identifying hybrids	59
2.6.3 Genetic structure of hybrid zone	60
2.6.4 Conservation implications of the hybridization between <i>Rosa rugosa</i> and ...	64
<i>R. blanda</i>	64
2.6.5 Conclusion.....	68
Chapitre 3 Conclusion	69
3.1 Recommandations pour la gestion du rosier rugueux et des hybrides	72
Bibliographie	74

Liste des tableaux

<i>Table 2.1 Voucher information and localities of the individuals used in the study of the natural hybridization between Rosa blanda and R. rugosa in eastern North America.....</i>	<i>32</i>
<i>Table 2.2 Primers designed for species-specific amplification of the chloroplast and nuclear genes used in the molecular study of Rosa blanda, R. rugosa and their hybrids.....</i>	<i>38</i>
<i>Table 2.3 Description of the 22 characters used in the morphological study of the natural hybridization between Rosa blanda and R. rugosa.....</i>	<i>40</i>
<i>Table 2.4 Observed parental allelic frequencies in pure populations of Rosa blanda and R. rugosa used for the calculation of the molecular hybrid index.....</i>	<i>45</i>
<i>Table 2.5 Mean and standard deviation of 22 morphological characters and one reproductive fitness measure used in the study of natural hybridization between Rosa blanda and R. rugosa.....</i>	<i>49</i>

Liste des figures

<i>Figure 2.1 Localities of Rosa blanda and R. rugosa sampled along the St. Lawrence River, eastern Canada, showing all mixed populations and some of the pure populations.....</i>	<i>31</i>
<i>Figure 2.2 Posterior probabilities (y axis) of the class to which each individual was assigned (x axis) in the molecular analysis of NewHybrids in the study of hybridization between Rosa blanda and R. rugosa.</i>	<i>46</i>
<i>Figure 2.3 Posterior probabilities of each class in NewHybrids for twelve putative second generation hybrids between Rosa rugosa and R. blanda.</i>	<i>47</i>
<i>Figure 2.4 Box-plots showing the distribution prior to transformation of 22 morphological characters and maximum pollen viability for the parents and F₁ classes in the study of natural hybridization between Rosa blanda and R. rugosa.</i>	<i>50</i>
<i>Figure 2.5 Principal component analysis (PCA) of 11 morphological characters used in the study of natural hybridization between Rosa blanda and R. rugosa.</i>	<i>53</i>
<i>Figure 2.6 Plot of the morphological against molecular hybrid indices in the study of natural hybridization between Rosa blanda and R. rugosa.....</i>	<i>54</i>
<i>Figure 2.7 Canonical discriminant analysis of 11 morphological characters measured for 149 individuals in the study of natural hybridization between Rosa blanda and R. rugosa.</i>	<i>56</i>

Liste des abréviations

ADN	acide désoxyribonucléique
ANOVA	analysis of variance
CTAB	cetyltrimethylammonium bromide
CVA	canonical variate analysis
DAO	Vascular plant herbarium, Agriculture and Agri-Food Canada, Ottawa, Canada.
DNA	deoxyribonucleic acid
<i>FENR</i>	ferredoxin-NADH reductase precursor-like protein
<i>GAPDH</i>	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
HSD	honest significant differences
M	molar
MAMA	Mismatch Amplification Mutation Assay
mM	millimolar
<i>MS</i>	malate synthase
MT	Herbier Marie-Victorin, Université de Montréal, Montréal, Canada
PCA	principal components analysis
PCR	polymerase chain reaction
PEG	polyethylene glycol
SNP	single nucleotide polymorphism
<i>TPI</i>	triose phosphate isomerase
U.S.A.	United States of America

Remerciements

Je tiens d'abord et surtout à remercier ma directrice de recherche, Anne Bruneau, pour son optimisme constant, sa confiance et la grande liberté qu'elle m'a accordée pour l'exploration des méthodes ainsi que la réalisation de ce projet.

Je désire aussi remercier les précieux collaborateurs de terrain, Jocelyn Brouillard et Élyse-Ann Faubert, qui m'ont patiemment assistée dans la recherche de populations et dans la récolte des spécimens, respectivement sous la pluie de Charlevoix et le soleil de Cape Cod. Je suis reconnaissante envers les Pr. T. Azuma et Y. Hashidoko qui ont accepté de me fournir des échantillons du rosier rugueux de son aire d'origine ainsi qu'envers Christiane Ritz qui m'a fourni des échantillons d'Allemagne.

Je souhaite exprimer ma gratitude envers les membres des laboratoires Bruneau et Brouillet pour leur complicité, leurs suggestions ainsi que leur aide au laboratoire. Je veux remercier particulièrement Simon Joly qui m'a permis d'utiliser ses échantillons et ses nombreuses séquences de rosiers nord-américains. Simon a été un phare pour bien des étudiants du labo Bruneau et je suis très reconnaissante d'avoir bénéficié de ses judicieux conseils. J'aimerais également remercier Stacey Thompson pour ses suggestions, sa créativité scientifique inspirante et son enthousiasme débordant. Merci au personnel de l'IRBV et du département de Sciences biologiques pour leur soutien technique ou administratif. Je veux également remercier ma famille, particulièrement mes parents, qui ont toujours cru en moi plus que moi-même.

Finalement, l'aide financière du FQRNT, du CRSNG ainsi que de la bourse Jacques-Rousseau a rendu possible la réalisation de ce projet.

CHAPITRE 1

Impacts de l'hybridation anthropique sur la conservation de la biodiversité végétale indigène

L'hybridation est un phénomène d'une fréquence indéniable chez les plantes (Knobloch, 1972; Rieseberg et Soltis, 1991; Ellstrand et al., 1996; Cronn et Wendel, 2003). Jusqu'à 70% des angiospermes seraient dérivés d'anciens allopolyploïdes créés par l'hybridation (Masterson, 1994), sans compter les espèces hybrides d'origine homoploïde. Étant donné sa prépondérance, il est logique de croire que l'hybridation a joué et jouerait encore un rôle évolutif important. Son impact sur l'intégrité et la survie des espèces végétales le serait donc tout autant. Le flux génique interspécifique est partie intégrante de la réalité biologique de plusieurs espèces. En effet, certaines zones hybrides naturelles stables peuvent persister pour des dizaines de milliers d'années sans affecter l'intégrité des espèces parentales (Martinsen et al., 2001). Cependant, l'Homme a contribué à accroître les taux naturels d'hybridation par la perturbation d'habitats et l'introduction d'espèces, ce qui bouleverse à la fois l'équilibre écologique et génétique de la biodiversité indigène.

Ce chapitre porte sur l'impact de cette hybridation de cause humaine pour la conservation des espèces indigènes, avec une attention particulière aux plantes. Le rôle de l'Homme dans l'accroissement des taux d'hybridation est d'abord examiné. Les diverses conséquences prévues et constatées pour les espèces indigènes sont ensuite discutées. Ce chapitre est conclu par un survol des cas rapportés dans la littérature et par la gestion des zones hybrides dans un cadre de conservation.

1.1 Impact humain sur les taux d'hybridation

1.1.1 Perturbation d'habitats

L'humain aurait contribué à accroître le taux d'hybridation d'abord par son impact sur l'habitat. Cet effet serait dû à plusieurs mécanismes distincts. Anderson (1948) a émis l'hypothèse qu'un milieu affecté par des perturbations (i.e., « hybridé »), naturelles ou surtout humaines, fournit un plus large éventail d'habitats aptes à accommoder les besoins des divers génotypes recombinants (e.g., Arnold et Bennett, 1993). Selon Grant (1981), les perturbations humaines augmenteraient également les taux d'hybridation en créant des habitats ouverts où la compétition écologique entre les hybrides et leurs parents se trouve réduite, facilitant leur établissement. La fragmentation des habitats génère des paysages en mosaïque où l'effet de bordure est important. Cela accroît la proximité des espèces interfertiles qui étaient auparavant isolées par leur niches distinctes (Levin et al., 1996; Rhymer et Simberloff, 1996; e.g., Bleeker et Hurka, 2001; Tsukaya et al., 2003). La fragmentation des habitats affecte aussi la taille des populations qu'ils peuvent supporter. Les individus de petites populations isolées ont plus de chances de s'hybrider car les partenaires de la même espèce sont plus difficiles à trouver (Rhymer et Simberloff, 1996). La perturbation d'habitats permet également l'agrandissement de l'aire de répartition d'une espèce dans celui d'une autre espèce interfertile ou l'établissement d'un corridor permanent permettant le contact (Levin et al., 1996; Rhymer et Simberloff, 1996). Finalement, la perturbation anthropique peut agir de façon indirecte sur la biologie reproductive des plantes en affectant par exemple leur phénologie, permettant l'hybridation (Lamont et al., 2003).

L'étude de zones hybrides a montré que les hybrides sont fréquents et plus abondants dans des habitats perturbés (Rieseberg et Wendel, 1993; Neuffer et al., 1999; Tovar-Sanchez et Oyama, 2004). Ellstrand et Schierenbeck (2000) ont cependant noté qu'un biais peut découler du fait que les habitats perturbés par l'humain sont justement les plus étudiés.

1.1.2 Introduction d'espèces

L'humain a surtout contribué à augmenter les taux d'hybridation par l'introduction volontaire ou non d'espèces (Rhymer et Simberloff, 1996; Huxel, 1999; Vilà et al., 2000; Allendorf et al., 2001; Mooney et Cleland, 2001; Olden et al., 2004). La mobilité humaine, accrue dès l'âge des grandes explorations, a aujourd'hui atteint son apogée avec l'avènement des moyens de transport modernes (Mack et al., 2000; Mooney et Cleland, 2001). Les introductions terrestres auraient atteint un taux trois fois supérieur à la période d'échanges intenses d'espèces entre les deux Amériques qui suivit la fermeture de l'isthme de Panama (Williamson, 1996). À cause de cette mobilité humaine, la proportion d'espèces introduites depuis la colonisation atteint 27 % de la flore du Canada (Scoggan, 1978) et jusqu'à 50 % de la flore néo-zélandaise (Mooney et Cleland, 2001). Les coûts liés à la gestion des espèces végétales envahissantes atteignent près de 35 milliards de dollars annuellement aux États-Unis (Pimentel et al., 2000). La compétition écologique de ces espèces introduites constitue une menace mieux reconnue pour la survie des espèces indigènes que celle posée par l'hybridation (Rhymer et Simberloff, 1996; Huxel, 1999), même si cette dernière peut être plus importante dans certains écosystèmes (Ellstrand et Schierenbeck, 2000).

1.2 Conséquences évolutives et écologiques de l'hybridation vues sous l'angle de la conservation

Le potentiel évolutif important de l'hybridation (Anderson, 1949; Heiser, 1949; 1973; Anderson et Stebbins, 1954; Stebbins, 1969; Grant, 1981; Seehausen, 2004) découle du fait que la recombinaison engendrée par l'hybridation fournit à la sélection une variation génétique beaucoup plus importante que ce que peuvent produire les mutations (Harrison, 1993; Rieseberg et Wendel, 1993). Par ailleurs, le flux génique entre espèces peut contrecarrer d'autres forces évolutives comme la sélection et la dérive (Slatkin, 1987; Ellstrand et al., 1999). Anderson (1949) a prôné que la conséquence la plus fréquente de l'hybridation est l'introgession, soit l'incorporation d'allèles d'un taxon dans le pool génique d'un autre suite à l'hybridation et au rétrocroisement répété.

Certains auteurs (Heiser, 1973; Rieseberg et Wendel, 1993) ont par la suite suggéré que la permanence du transfert génique soit intégrée à la définition d'introgression car un essaim hybride temporaire et localisé est souvent sans conséquences évolutives.

Récemment, des études exhaustives au niveau des populations comme celles de Rieseberg dans le genre *Helianthus* (Asteraceae; Rieseberg et al., 1990, 1998, 2003; Rieseberg, 1991a; Kim et Rieseberg, 1999, 2001; Rieseberg et Linder, 1999; Carney et al., 2000; Rosenthal et al., 2002, 2005; Lexer et al., 2003), d'Arnold avec les iris de Louisiane (Iridaceae; Arnold et al., 1990, 1991; Arnold et Bennett, 1993; Cruzan et al., 1993; Carney et al., 1994, 1996; Cruzan et Arnold, 1994; Hodges et al., 1996; Emms et Arnold, 1997, 2000; Burke et al., 1998; Johnston et al., 2001a, 2001b, 2003) et de Campbell chez le genre *Ipomopsis* (Polemoniaceae; Campbell et al., 1998, 2002a, 2002b, 2003, 2005; Campbell et Waser, 2001, 2007; Wu et Campbell, 2005) ont contribué à cerner les forces qui affectent la dynamique et la structure des zones hybrides et donc les impacts évolutifs de l'hybridation chez les plantes. Différents auteurs ont aussi revu les conséquences possibles de l'hybridation et de l'introgression chez les plantes: une réduction des barrières reproductives (fusion des espèces) ou leur renforcement, une diversité génétique accrue, le transfert ou l'origine d'adaptations, l'invasion d'habitats nouveaux voire extrêmes par des hybrides, la spéciation hybride et l'accroissement ou la réduction de l'aptitude du taxon introgressé (Rieseberg et Brunsfeld, 1992; Rieseberg et Wendel, 1993; Rieseberg, 1997; Rieseberg et Carney, 1998; Arnold et al., 2003; Arnold, 2004).

Le rôle joué par l'hybridation dans la conservation est à double tranchant. En effet, l'hybridation est une force évolutive créatrice qui génère de la diversité aux niveaux génique et génotypique, peut augmenter l'aptitude des taxons impliqués et éventuellement engendrer de nouvelles lignées évolutives. Dans certains cas, l'hybridation est la seule possibilité de sauver des taxons sévèrement consanguins ou constitués d'un nombre restreint d'individus (Rhymer et Simberloff, 1996). Les hybrides naturels comportent d'ailleurs une part importante de la diversité génétique et du potentiel évolutif d'une espèce (Rieseberg, 1991b; Allendorf et al., 2001; Cozzolino et

al., 2006). Quoiqu'un flux génique spontané soit normal et puisse contribuer à l'adaptation d'une espèce, l'hybridation peut aussi conduire à l'extinction, particulièrement pour les espèces rares (Rieseberg, 1991b; Ellstrand et Elam, 1993; Rhymer et Simberloff, 1996). Malgré l'amélioration des outils moléculaires, il demeure difficile d'évaluer les conséquences évolutives de l'hybridation avec des espèces introduites pour la conservation des espèces indigènes (Hall et al., 2006). Quatre principales conséquences négatives peuvent en émerger: l'assimilation génétique, la dépression due à des croisements distants, une diminution de la diversité génétique et la création de taxons agressifs.

1.2.1 Assimilation génétique

Il est possible que l'introgession conduise à une réduction de la force des barrières reproductives. Par exemple, chez les asclépiades, la présence de l'hybride diminue les habiletés discriminantes des pollinisateurs et facilite l'introgession (Broyles, 2002). Carney et al. (2000) ont montré que la fertilité des tournesols hybrides augmentait avec le temps, signe que la sélection diminue les barrières postzygotiques dans cette zone hybride. Quand les barrières reproductives s'effondrent, deux résultats possibles sont l'assimilation génétique d'un des taxons ou la fusion des deux en une « compilo-espèce » (Rieseberg et Wendel, 1993). L'assimilation génétique se produit quand une espèce perd son intégrité génétique et devient assimilée par une espèce plus commune après plusieurs générations d'introgession (Rieseberg, 1991b; Rhymer et Simberloff, 1996). Différents noms à connotation souvent péjorative ont été donnés pour qualifier ce phénomène, par exemple contamination, infection, détérioration, pollution et agression génétique (Rhymer et Simberloff, 1996). Cette assimilation est le reflet de la conséquence principale du flux génique, soit l'homogénéisation de la structure génétique des populations (Slatkin, 1987). La dilution des allèles caractéristiques d'une espèce par l'hybridation et l'introgession peut conduire à leur perte par dérive génique (Rieseberg, 1991b). Néanmoins, il est probable que les fréquences alléliques demeurent les mêmes à l'échelle de la population hybridée (Epifanio et Philipp, 2001). Ce sont alors les combinaisons génotypiques multilocus qui sont affectées. Dans les deux cas, cela résulte

en une perte d'information génétique et une perte de diversité taxonomique. Les études théoriques nous ont aidés à comprendre les conditions favorisant ou accélérant l'assimilation génétique. Ces études ont montré que dans certaines conditions, l'extinction par hybridation peut être très rapide et se produire en moins de cinq générations (Huxel, 1999; Wolf et al., 2001).

1.2.1.1 Aptitude relative des hybrides et taux d'hybridation

L'aptitude (« fitness ») relative des hybrides est un important déterminant du taux auquel l'assimilation s'effectue. Une aptitude moyenne réduite des hybrides des premières générations, liée au phénomène de dépression hybride, est observée dans la plupart des études empiriques (Rieseberg et Carney, 1998; Burke et Arnold, 2001). Néanmoins, plusieurs génotypes hybrides ont une aptitude égale ou supérieure à leurs parents, du moins dans certains habitats (revu par Arnold et Hodges, 1995; Arnold et al., 1999, 2001). La performance des hybrides ne s'explique pas que par des déterminants génétiques endogènes. La sélection environnementale joue aussi un rôle important dans la structure génétique et spatiale des zones hybrides (Campbell et Waser, 2001, 2007; Johnston et al., 2001a, 2001b, 2003). Plusieurs zones hybrides chez les plantes semblent en effet correspondre au modèle de zone hybride en mosaïque (e.g., Cruzan et Arnold, 1993; Tovar-Sanchez et Oyama, 2004). Dans ce modèle, les parents et leur hybride cohabitent dans un environnement hétérogène qui génère une distribution inégale de ressources (Harrison, 1993). Les espèces parentales et l'hybride se retrouvent dans les microhabitats où leur aptitude respective est maximale. Parce que l'aptitude d'un individu hybride est fondée sur l'interaction entre les gènes et l'environnement, elle doit être mesurée dans les habitats des espèces parentales, ce qui exige des transplantations réciproques longues et coûteuses (e.g., Arnold et Bennett, 1993; Cruzan et Arnold, 1993; Vilà et D'Antonio, 1998b; Campbell et Waser, 2001, 2007; Campbell et al., 2005). Généralement, ce type d'étude a confirmé que l'aptitude des hybrides varie selon l'habitat et est souvent supérieure dans les habitats des parents auxquels ils ressemblent le plus (e.g., Johnston et al., 2001a).

Un autre aspect crucial ressortant des études empiriques est la variabilité de l'aptitude d'un génotype hybride à l'autre, entre les classes hybrides, à l'intérieur d'une même classe (revu par Rieseberg et Carney, 1998; Arnold et al., 1999, 2001; Hails et Morley, 2005; e.g., Rosenthal et al., 2002; Campbell et al., 2005; Kirk et al., 2005; Rhode et Cruzan, 2005) voire entre les stades de vie d'un même génotype (Johnston et al., 2003). Cette variance de l'aptitude, plus critique que la moyenne pour le destin de la zone hybride et les conséquences évolutives engendrées, est maximale pour la classe hybride F_2 et les premières générations de rétrocroisement (Rieseberg et Carney, 1998). En effet, il a été démontré que l'aptitude plus faible des hybrides F_1 n'élimine pas la possibilité que certains génotypes recombinants avancés soit plus aptes que leurs parents et permettent une abondante introgression (Rieseberg et Carney, 1998; Arnold et al., 1999, 2001; Vanden Broeck et al., 2005). Comme le dit Grant (1981), "*the difference between a high degree of hybrid sterility and complete sterility may be small in terms of percentage points but it is quite significant biologically*". La sélection peut ainsi faire en sorte que les rares génotypes ayant une fertilité plus élevée deviennent très abondants avec le temps. Avec les générations successives, l'aptitude moyenne des hybrides s'accroît et la variance de l'aptitude diminue (Rieseberg et Carney, 1998). Par exemple, Carney et al. (2000) ont noté une augmentation marquée de la fertilité du pollen des hybrides entre *Helianthus bolanderi* (Asteraceae) et *H. annuus* dans les 15 dernières années, montrant une forte sélection pour la fertilité.

Huxel (1999) a démontré par des modèles mathématiques que le remplacement d'une espèce peut se faire très rapidement si la sélection pour l'espèce dominante est forte. Des simulations ont aussi montré que la rapidité de croissance de la fraction hybride et d'extinction des parents est déterminée par la force des gradients d'aptitude entre ces derniers et les hybrides (Allendorf et al., 2001; Epifanio et Philipp, 2001; Hall et al., 2006). Plus l'aptitude des hybrides s'approche de celle de leurs parents, plus l'assimilation se fait rapidement; un important seuil survient quand l'aptitude hybride devient supérieure (Allendorf et al., 2001). Parce que l'aptitude des hybrides montre une grande variance et une dépendance environnementale, les taux d'introgression sont difficiles à prédire (Hails et Morley, 2005). Les modèles montrent en fait que les parents

vont tendre vers l'extinction même en dépit d'une aptitude fortement pénalisée chez les hybrides (Ellstrand et al., 1999; Huxel, 1999; Epifanio et Philipp, 2001; Wolf et al., 2001; Haygood et al., 2003). La sélection pour les génotypes les plus aptes dans les générations avancées fera en sorte que ces génotypes deviendront vite dominants (Hall et al., 2006).

Un taux d'hybridation élevé peut aussi contrecarrer l'effet d'une aptitude réduite chez les hybrides (Levin et al., 1996; Rhymer et Simberloff, 1996; Huxel, 1999; Haygood et al., 2003). Le modèle de Wright prédit qu'un allèle défavorable peut être fixé si l'immigration excède le coefficient de sélection local (Ellstrand et al., 1999). Une forte immigration augmente les chances qu'un taxon soit pollinisé par du pollen étranger. Des graines hybrides sont ainsi produites à chaque génération aux dépens de graines conspécifiques. Une fraction un peu plus grande de la population s'hybridera chaque génération, laissant une encore plus petite fraction qui n'a pas subi de mélange génétique. En plus de poser le risque d'assimilation génétique, l'hybridation entraîne donc aussi un risque d'extinction démographique (Levin et al., 1996). Réduisant la taille des populations pures et interférant avec leur potentiel de recrutement, l'hybridation les rend plus vulnérable aux extinctions locales causées par la dépression de consanguinité ou des fluctuations démographiques et environnementales (Levin et al., 1996; Haygood et al., 2003).

Une fois enclenchés, les processus démographiques font en sorte que l'assimilation génétique des parents est presque irréversible et difficilement arrêtée. Cela suggère qu'on peut s'y attendre du moment qu'un flux génique dure plus de quelques générations (Haygood et al., 2003). Mesurer les taux d'hybridation permet d'estimer le taux d'immigration d'allèles étrangers. Si ce taux est biologiquement significatif (fréquence d'un allèle étranger d'environ 1% dans une population; Ellstrand et al., 1999), les populations hybrides vont persister en dépit d'une aptitude réduite (Hails et Morley, 2005). D'autres modèles ont finalement établi que l'immigration d'individus ou de gamètes purs de populations avoisinantes peut contrecarrer l'assimilation génétique,

tant qu'elle est couplée à un certain niveau d'isolement reproductif (Ferdy et Austerlitz, 2002).

1.2.1.2 Barrières reproductives et asymétrie de l'introgession

Les barrières reproductives affectent, conjointement avec la sélection environnementale, la structure et la persistance de la zone hybride (Cruzan et Arnold, 1994). Ces barrières sont divisées en deux types: prézygotiques et postzygotiques, selon qu'elles agissent avant ou après la fécondation de l'ovule par le pollen. Les barrières prézygotiques de pré-pollinisation peuvent être de nature écologique, comme des habitats divergents entre les parents. Des gènes contrôlant la phénologie florale ou la divergence des caractères floraux peuvent aussi affecter les patrons reproductifs (Rieseberg et Carney, 1998; Tiffin et al., 2001). Chez les espèces pollinisées par les animaux, les patrons de visite des pollinisateurs peuvent limiter le flux génique interspécifique en créant un appariement assortatif positif ou au contraire favoriser l'hybridation ou l'introgession (Campbell et al., 1998; Emms and Arnold, 2000; Campbell et al., 2002b). L'isolement reproductif prézygotique de type post-pollinisation se manifeste par des interactions pollen-pistil, pollen-ovules ou par des différences de longueur des styles entre les espèces (Carney et al., 1994; 1996). Des pollinisations contrôlées ont permis de détecter la présence de compétition pollinique dans plusieurs genres. La plupart de ces études ont montré un avantage du pollen conspécifique (Carney et al., 1996; revu par Howard, 1999), même si le pollen hétérosppécifique n'avait pas nécessairement un taux de fécondation réduit lorsque appliqué seul (Campbell et al., 2003). La compétition pollinique peut être assez forte pour empêcher l'hybridation quand les deux espèces sont abondantes mais son impact diminue si les fleurs d'une espèce sont en minorité (Arnold et Bennett, 1993; Rieseberg et Carney, 1998). Le type de reproduction des parents influe également sur le taux d'hybridation, puisque l'autogamie le réduit (Rieseberg et Carney, 1998; Tiffin et al., 2001; Wolf et al., 2001). Une fois l'ovule fécondé par le pollen hétérosppécifique, l'hybridation peut encore être stoppée par la présence de barrières reproductives postzygotiques. Ces barrières se manifestent par une réduction de la viabilité et de la fertilité des générations hybrides (Rieseberg et Carney, 1998; Tiffin et al., 2001).

Les modèles théoriques suggèrent que ces barrières reproductives jouent également un rôle important dans l'apparition d'hybrides et dans les taux d'introgression (Epifanio et Philipp, 2001; Wolf et al., 2001; Ferdy et Austerlitz, 2002; Hall et al., 2006). Un appariement assortatif fort ralentit l'extinction génétique des parents. Toutefois, un essaim hybride sera établi si les parents sont moindrement interfertiles et si l'hybride n'est pas complètement stérile, même en cas d'une forte sélection contre les hybrides. Les simulations de Wolf et al. (2001) ont montré que les barrières prézygotiques ont une influence plus forte sur le taux d'extinction du parent indigène que les barrières postzygotiques.

L'asymétrie des barrières reproductives a d'importantes conséquences quant à la dynamique des zones hybrides et leur destin (Tiffin et al., 2001). Beaucoup d'auteurs ont observé des zones hybride asymétriques où le transfert génétique s'effectue plus abondamment, voire entièrement d'une espèce vers l'autre (Paige et al., 1991; Bacilieri et al., 1996; Hardig et al., 2000; Caraway et al., 2001; Kirk et al., 2005). De telles barrières asymétriques entre les espèces parentales, fréquentes chez les angiospermes, se retrouvent à tous les stades d'isolement (Tiffin et al., 2001). Par exemple, l'introgression unilatérale du *Callicarpa japonica* (Verbenaceae) vers *C. mollis*, deux espèces protérandres, provient d'une légère avance phénologique de *C. japonica* combinée à un rendement reproductif plus élevé (Tsukaya et al., 2003). Les préférences des pollinisateurs génèrent aussi des asymétries. Par exemple, les colibris imposent une introgression directionnelle vers les fleurs d'*Ipomopsis aggregata* (Polemoniaceae) dans une zone hybride avec *I. tenuiloba* (Campbell et al., 2002b). D'autres barrières prézygotiques comme les différences de croissance des tubes polliniques, de longueur des styles ou de système reproducteur (auto-compatibilité versus auto-incompatibilité) peuvent être impliquées dans l'introgression asymétrique, le flux génique se faisant de l'espèce discriminante vers l'espèce moins discriminante (Carney et al., 1994; Tiffin et al., 2001). Les asymétries post-reproductives peuvent quant à elles être causées par des interactions négatives entre des gènes chloroplastique du parent maternel et des gènes nucléaires de l'espèce paternelle dans un hybride (Burke et al., 1998; Rhode et Cruzan,

2005) ou par la sélection environnementale qui agit de façon inégale sur les différents génotypes hybrides (Tovar-Sanchez et Oyama, 2004).

Une autre cause fréquente de cette asymétrie est la différence d'abondance relative des deux espèces parentales (Nason et al., 1992; Rieseberg et Wendel, 1993; Rieseberg et Carney, 1998; Broyles, 2002). Dans une petite population qui s'hybride avec une plus grande, le pollen hétérospécifique est plus commun que le pollen natif, menant à hybridation proportionnellement plus importante que dans la grande population (Levin, 1975). Les hybrides se rétrocroisent ensuite davantage vers le parent le plus commun, causant l'assimilation génétique du taxon rare par le taxon abondant (Levin et al., 1996; Rhymer et Simberloff, 1996). Burgess et al. (2005) ont observé une corrélation entre le degré de biais de l'hybridation vers une espèce et l'abondance de cette espèce. L'espèce indigène rare *Morus rubra* (Moraceae) est donc menacée d'assimilation génétique par son congénère plus abondant, l'espèce introduite *M. alba*. Des résultats similaires ont été observés dans la zone hybride entre *Helianthus bolanderi* (Asteraceae) et *H. annuus*, introduit et plus abondant (Carney et al., 2000). L'asymétrie augmente la rapidité à laquelle l'assimilation génétique du taxon rare se produit et ralentit l'assimilation du taxon commun mais, encore une fois, n'affecte pas le résultat final de l'introgession (Ellstrand et al., 1999; Epifanio et Philipp, 2001). Même dans une asymétrie de 99:1, l'extinction génétique de l'espèce abondante se fera en huit générations s'il n'y a pas de reproduction assortie et que l'aptitude de tous les génotypes est égale (Epifanio et Philipp, 2001).

À l'inverse, un taxon introduit mais rare peut aussi menacer une espèce indigène commune par l'hybridation si son rendement reproductif est élevé (Anttila et al., 1998). Des différences de taille, du nombre de fleurs ou de densité des plantes peuvent modifier la représentation effective des parents puisqu'elles affectent l'abondance relative des gamètes de chaque taxon (Rieseberg et Carney, 1998; Broyles, 2002). Par exemple, l'espèce introduite *Spartina alterniflora* (Poaceae), quoique rare, produit 21 fois plus de pollen que l'espèce indigène abondante *S. foliosa* et ce pollen a un taux de germination

1,5 fois plus élevé que le pollen de l'espèce indigène sur ses propres stigmates (Anttila et al., 1998). Le pollen hétérospécifique augmente le taux de production de graines du *S. foliosa* par huit, alors que le pollen du *S. foliosa* n'a aucun impact sur la production de graines du *S. alterniflora*. Les simulations montrent que le *S. alterniflora* menace l'intégrité génétique d'une large population indigène puisque l'espèce indigène pourrait disparaître en 3 à 20 générations (Wolf et al., 2001). Autrement, quand les deux espèces sont abondantes, l'intégrité des deux parents peut être menacée (Levin et al., 1996).

La quasi-irrévocabilité de l'assimilation génétique en regard de plusieurs facteurs comme l'aptitude des hybrides, la présence de barrières reproductives et la proportion initiale des taxons démontrée par ces modèles peut sembler contradictoire avec la persistance historique de zones hybrides naturelles (e.g., Martinsen et al., 2001). Certains modèles expliquent le maintien de l'intégrité des espèces parentales dans les zones hybrides par la présence de gradient ou d'hétérogénéité environnementale (Barton and Hewitt, 1985; Harrison, 1993) dont la majorité des simulations citées plus haut n'ont pas tenu compte. Dans un habitat hétérogène, il est possible que les espèces indigènes s'hybridant avec des espèces introduites trouvent un refuge où les génotypes hybrides ont un faible recrutement et une survie restreinte. Il semble en effet que seule une différenciation d'habitat permette le maintien d'une zone hybride stable dans le temps (Wolf et al., 2001; Buerkle et al., 2003). La présence de niveaux modestes d'isolement spatial ou écologique permet le maintien de zones hybrides stables même en présence d'un niveau de stérilité faible chez les hybrides (Buerkle et al., 2003). Par ailleurs, la persistance de plusieurs génotypes dans une zone hybride peut provenir de l'exploitation différente d'un même habitat si les classes hybrides maximisent des stratégies de vie différentes (Hall et al., 2006). En l'absence de telles différenciations, l'intégrité génétique des espèces parentales semble condamnée.

1.2.2 Dépression due à des croisements distants

Chez les espèces rares, l'hybridation peut constituer une menace d'extinction même en l'absence d'introgession ou d'assimilation génétique à cause de l'aptitude

moyenne généralement réduite des populations hybridées (Rieseberg, 1991b; Levin et al., 1996; Rhymer et Simberloff, 1996; Ellstrand et al., 1999; Allendorf et al., 2001). Deux mécanismes sont responsables de ce phénomène, appelé dépression due à des croisements distants (*outbreeding depression*). Un premier facteur, de nature endogène, est la réduction d'aptitude hybride ou dépression hybride (*hybrid breakdown*) qui est liée à des incompatibilités chromosomiques ou génétiques (Allendorf et al., 2001). Malgré qu'elle puisse se manifester à la première génération (e.g., Cruzan et Arnold, 1993), souvent par la stérilité des F_1 , la dépression hybride réfère surtout aux cas où la réduction d'aptitude s'exprime dans les générations hybrides subséquentes suite à la ségrégation (Burke et Arnold, 2001). L'étude des mécanismes qui en sont responsables chez les organismes modèles comme le riz ont montré qu'un ensemble de facteurs peuvent être conjointement impliqués (Li et al., 1997). Ce phénomène est le plus souvent causé par des incompatibilités cytonucléaires (Fishman et Willis, 2006) ou entre allèles nucléaires divergents (appelées incompatibilités de Dobzhansky-Muller; Dobzhansky, 1951; Orr et Turelli, 2001) et peut parfois aussi impliquer des réarrangements chromosomiques nuisibles au bon fonctionnement de la méiose (Grant, 1981). En réduisant l'aptitude des hybrides, la dépression hybride entraîne l'incapacité d'une population introgressée à maintenir sa croissance et augmente donc les risques d'extinction (Levin et al., 1996), quoique à plus long terme que l'assimilation génétique (Wolf et al., 2001).

La dépression due à des croisements distants peut aussi être liée à des facteurs exogènes par le biais de la sélection environnementale (Allendorf et al., 2001). Certains allèles, par exemple ceux impliqués dans la phénologie, peuvent être défavorables dans un environnement. C'est souvent le cas d'allèles de plantes cultivées ou introduites (de Wet et Harlan, 1975; Ellstrand et al., 1999; Haygood et al., 2003). Si le taux d'hybridation est élevé, leur immigration dans une population hybridée peut se faire aux dépens d'allèles localement adaptés, menaçant ainsi leur survie. Il est important de considérer ce phénomène dans les programmes de réintroduction d'espèces menacées (Rhymer et Simberloff, 1996). La recombinaison produite par l'hybridation peut briser les combinaisons génotypiques multilocus, souvent responsables de l'adaptation

complexe à un environnement (Allendorf et al., 2001). La perte des adaptations locales, tant au niveau allélique que génotypique, peut se produire sans impact immédiat car ces allèles sont la plupart du temps neutres. La réduction d'aptitude peut n'apparaître que plus tard si ces allèles confèrent un avantage lors de situations épisodiques comme une sécheresse ou un feu (Allendorf et al., 2001).

1.2.3 Réduction de la diversité génétique

L'hybridation avec des espèces introduites ou cultivées peut réduire la diversité génétique des espèces indigènes (Haygood et al., 2003). Les changements de diversité suite à l'hybridation dépendent des niveaux de richesse alléliques et de diversité génétique de la population source par rapport à la population réceptrice (Ellstrand et al., 1999). Or, les cultivars montrent souvent une base génétique réduite par rapport aux espèces en nature (Ellstrand et al., 1999; Vanden Broeck et al., 2005). L'effet fondateur peut aussi occasionner une réduction de la diversité génétique chez les espèces introduites. L'hybridation et l'introgession entre ces espèces domestiquées ou introduites et leurs congénères indigènes peut donc conduire à une diminution de la variation neutre de ces derniers, limitant leur potentiel évolutif futur.

1.2.4 Formation d'hybrides compétitifs ou envahissants

L'évolution d'hybrides plus aptes que leurs parents et donc ayant un potentiel d'envahissement plus grand est un aspect indésirable du rôle créatif de l'hybridation. L'hybridation serait une cause sous-estimée du caractère envahissant de certaines plantes (Ellstrand et Schierenbeck, 2000). Ellstrand et Schierenbeck (2000) rapportent 28 exemples où les évidences moléculaires confirment que le caractère envahissant d'un taxon découle de l'hybridation. Dans la moitié des cas, l'hybridation impliquait une espèce introduite et une espèce indigène. Les données moléculaires ont aussi montré que les populations envahissantes du genre *Myriophyllum* (Haloragaceae) en Amérique du Nord étaient en fait composées d'hybrides cryptiques entre des espèces indigènes et introduites (Moody et Les, 2002). L'hybridation entre deux génotypes ou espèces

introduites peut aussi produire des hybrides envahissants, comme ce fut le cas pour des génotypes eurasiatiques du genre *Tamarix* (Tamaricaceae) en Amérique du Nord (Gaskin et Schaal, 2002), pour le genre *Rhododendron* (Ericaceae) dans les Îles Britanniques (Milne et Abbott, 2000) et pour le genre *Onopordum* (Asteraceae) en Europe (O'Hanlon et al., 1999). Certains auteurs avancent que l'existence d'une phase latente entre l'introduction d'une espèce et le moment où elle devient envahissante peut être liée au temps requis avant la formation d'hybrides (Ellstrand et Schierenbeck, 2000; Abbott et al., 2003).

L'évolution d'hybrides plus envahissants peut s'expliquer par plusieurs mécanismes. Les premières générations hybrides montrent souvent une vigueur végétative accrue, appelée hétérosis, qui est fréquemment exploitée pour la création de variétés agricoles (Rieseberg et Carney, 1998). L'hétérosis serait partiellement responsable du succès des espèces allopolyploïdes (Rieseberg et Carney, 1998) et des espèces hybrides clonales (Moody et Les, 2002). Le phénomène d'hétérosis avantage les hybrides par rapport aux parents, ce qui facilite l'introgression (Rhode et Cruzan, 2005) et permet l'établissement de zones hybrides (Arnold, 1997).

Les mécanismes moléculaires responsables de l'hétérosis sont encore obscurs, bien que différentes hypothèses aient été proposées (Burke et Arnold, 2001). Une première hypothèse est que la dominance de certains allèles parentaux permettrait de masquer des allèles nuisibles (Rieseberg et Carney, 1998). La consanguinité, causée par des populations de tailles réduites et une dispersion limitée, produit une accumulation de mutations légèrement nuisibles. La plupart des loci homozygotes pour des allèles néfastes chez les parents sont hétérozygotes chez l'hybride, lui conférant une aptitude plus élevée (Rhode et Cruzan, 2005). Certains auteurs rapportent cependant que de purger les lignées consanguines des allèles néfastes aurait peu d'impact sur l'hétérosis (Swanson-Wagner et al., 2006). L'hypothèse de surdominance statue que la performance accrue des hybrides F₁ est plutôt une conséquence de l'épistasie positive aux loci hétérozygotes (Rieseberg et Carney, 1998; Swanson-Wagner et al., 2006). Plusieurs mécanismes peuvent agir en concert pour conférer une aptitude supérieure à l'hybride

(Swanson-Wagner et al., 2006). Néanmoins, cet effet positif sera transitoire puisque le niveau d'hétérozygoté de la progéniture décroît à chaque génération d'hybridation au-delà de la première (Rieseberg et Carney, 1998; Rhode et Cruzan, 2005; e.g., Kirk et al., 2005).

En plus de l'hétérosis, la recombinaison génotypique produite par hybridation et l'introgession peut aussi mener à la formation d'hybrides plus compétitifs. Cette recombinaison peut créer des génotypes possédant des traits nouveaux qui leur permettent de coloniser de nouveaux habitats (Heiser, 1973; Rieseberg et al., 2003), d'où leur potentiel d'envahissement plus grand (Ellstrand et Schierenbeck, 2000; Hails et Morley, 2005). Plusieurs études ont ainsi rapporté une aptitude plus élevée des hybrides dans des habitats nouveaux (Cruzan et Arnold, 1993; Arnold et al., 1999; Arnold et al., 2001). L'origine de nouvelles adaptations proviendrait davantage de la création de nouveaux génotypes à l'échelle multilocus par la recombinaison que de la création de nouveaux allèles (Rieseberg et Wendel, 1993). Il est toutefois difficile d'établir si les hybrides envahissants le sont à cause de l'hétérosis ou à cause de nouveautés évolutives, à moins d'avoir accès à des études d'aptitude en milieu naturel (Ellstrand et Schierenbeck, 2000; e.g., Vilà et D'Antonio, 1998b).

La nouveauté évolutive peut aussi provenir de la fixation de traits intermédiaires ou plus particulièrement transgressifs (Ellstrand et Schierenbeck, 2000). Rosenthal et al. (2002) ont mesuré la différenciation morphologique et écophysologique entre trois anciens taxons hybrides et leur parents pour trouver qu'une proportion élevée des traits mesurés étaient extrêmes par rapport aux parents. Ces traits transgressifs comportaient des adaptations à de nouveaux habitats xériques ou salins. Dans une revue de littérature de l'expression des traits chez les hybrides (Rieseberg et Ellstrand, 1993), plus de 10 % des caractères morphologiques des hybrides F_1 et 30 % des générations hybrides plus avancées étaient transgressifs. Les caractères chimiques transgressifs sont aussi plus fréquents chez les hybrides de générations avancées et les espèces hybrides mais se retrouvaient néanmoins chez plusieurs hybrides F_1 (Rieseberg et Ellstrand, 1993; Orians, 2000). Comme l'hétérosis, la transgression chez les hybrides vient surtout de la

complémentarité de l'action de gènes des deux parents et dans une moindre mesure de la surdominance ou d'interactions épistatiques (Rieseberg et Linder, 1999; Rosenthal et al., 2002; Rieseberg et al., 2003). La divergence écologique peut toutefois se produire sans la présence de traits transgressifs (Rosenthal et al., 2002).

Chez les plantes hybrides comme *Myriophyllum* qui peuvent se reproduire asexuellement, l'avantage conféré par l'hétérozygoté devient fixé et peut se perpétuer indéfiniment (Ellstrand et Schierenbeck, 2000; Moody et Les, 2002). La reproduction végétative des peupliers hybrides leur a ainsi permis de remplacer les populations indigènes le long des cours d'eau (Vanden Broeck et al., 2005). D'autres mécanismes comme l'alloploïdie, la spéciation recombinante (isolement des hybrides par des barrières chromosomales avec les parents) et l'agamospermie permettent de stabiliser le caractère hybride et donc l'hétérosis (Grant, 1981; Abbott, 1992; Ellstrand et Schierenbeck, 2000). Abbott (1992) a compilé une liste de 20 exemples d'hybrides entre espèces introduites ou entre une espèce introduite et une espèce indigène qui se sont stabilisés par ces mécanismes. Si l'hybride ne devient pas sexuellement isolé des parents, il est possible que l'amalgame des génomes hybrides et parentaux crée un complexe coalescent envahissant (Ellstrand et Schierenbeck, 2000). La recombinaison empêchant la fixation de l'hétérosis, le caractère envahissant de ces « compilo-espèces » serait donc plutôt lié à la diversité génétique plus grande qu'on y trouve aux niveaux intra- et inter-individuel.

Certaines caractéristiques des parents prédisposent l'hybride à devenir envahissant. Les hybrides stabilisés envahissants sont plus fréquemment des vivaces herbacées (Ellstrand et Schierenbeck, 2000). Puisqu'elles persistent plus longtemps, les espèces vivaces ont plus de chances de se reproduire de façon asexuée et d'ainsi fixer l'hétérozygoté. Quant aux plantes herbacées, elles investissent plus de ressources dans la reproduction que dans la formation de structures permanentes, contrairement aux espèces ligneuses. Comme il a été mentionné plus haut, les taxons consanguins sont aussi plus susceptibles de créer un hybride vigoureux à cause de l'hétérosis (Ellstrand et Schierenbeck, 2000; Rhode et Cruzan, 2005).

La compétition d'un hybride plus apte que ses parents pour les mêmes ressources peut avoir de sérieuses conséquences pour le maintien des populations parentales. Burgess et Husband (2006) ont étudié la différenciation écologique entre l'espèce introduite *Morus alba* (Moraceae), l'espèce indigène rare *M. rubra* et leur hybride par des transplantations réciproques pour montrer que l'espèce indigène subit une compétition écologique autant par *M. alba* que par l'hybride. Toutefois, les hybrides peuvent aussi devenir une menace pour l'ensemble de l'écosystème où ils se trouvent. Par exemple, l'introgression entre l'espèce introduite envahissante *Carpobrotus edulis* (Aizoaceae) et l'espèce indigène *C. chilensis* a créé des hybrides vigoureux et résistants qui empêchent l'établissement et la croissance des autres espèces indigènes (Vilà et D'Antonio, 1998b). Daehler et Strong (1997) ont identifié des hybrides entre l'espèce introduite *Spartina alterniflora* (Poaceae) et l'espèce indigène *S. foliosa* dans les marais salants de Californie. Ces hybrides ont une tolérance écologique ainsi qu'une vigueur végétative et reproductive plus grande que leur parent. Accumulant les sédiments, ils modifient la hauteur des marées et leur envahissement exponentiel des platières de boue nuit aux oiseaux de rivage qui s'y nourrissent (Ayres et al., 1999, 2004). La compétition d'hybrides envahissants a aussi des impacts directs sur l'humain. La création de mauvaises herbes agressives suite à l'hybridation avec une espèce indigène a été observée pour sept des 13 plus importantes plantes cultivées (Ellstrand et al., 1999).

1.3 Espèces rares menacées par l'hybridation

Les espèces qui ont de petits effectifs sont particulièrement vulnérables aux risques d'assimilation génétique et de dépression due à des croisements distants (Rieseberg, 1991b; Ellstrand, 1992; Ellstrand et Elam, 1993). Rhymer et Simberloff, (1996) rapportent plusieurs espèces rares menacées par l'hybridation dans divers groupes d'organismes. Par exemple, trois des 11 derniers individus de l'espèce arborescente rare *Cercocarpus traskiae* (Rosaceae) sont des hybrides avec l'espèce plus commune *C. betuloides* var. *blancheae* (Rieseberg et Gerber, 1995). Le risque d'extinction par hybridation concerne aussi particulièrement les plantes insulaires, qui

subissent en général une destruction d'habitat et des introductions d'espèces plus importantes (Levin et al., 1996; Rhymer et Simberloff, 1996). Elles seraient aussi plus à risque puisqu'elles sont plus souvent isolées par des barrières écologiques que génétiques. Toutefois, aucun cas bien documenté d'extinction n'a été explicitement relié à l'hybridation jusqu'à maintenant et l'hybridation serait encore une cause d'extinction sous-estimée, bien que l'intérêt envers cette problématique ait récemment augmenté (Rieseberg, 1991b; Levin et al., 1996; Rhymer et Simberloff, 1996; Ellstrand et al., 1999). La plupart des cas d'hybridation menaçant des espèces rares ne seraient pas discernables par la morphologie et le manque de financement empêcherait la confirmation moléculaire des cas suspectés (Rhymer et Simberloff, 1996).

Quoique ce ne soit pas le point focal de ce chapitre, il est intéressant de mentionner le cas des poissons puisqu'une littérature abondante s'y rapporte. Beaucoup d'espèces menacées par l'hybridation ont été répertoriées chez les poissons, qui ont une fertilisation externe et une mobilité réduite comme les plantes et sont donc plus à même d'entrer en contact avec des gamètes de taxons divergents (Echelle et Connor, 1989; Rhymer et Simberloff, 1996; Avise et al., 1997; Allendorf et al., 2001; Scribner et al., 2001; Hänfling et al., 2005). L'hybridation a contribué à 38 % des extinctions de poissons aux États-Unis (Perry et al., 2002) et l'influence humaine est impliquée dans plus de la moitié des cas d'espèces de poissons menacées par l'hybridation (Scribner et al., 2001). Cet impact humain se traduit par la perte ou la perturbation d'habitats et surtout par l'introduction souvent volontaires d'espèces, notamment d'endémiques régionaux (Rhymer et Simberloff, 1996; Scribner et al., 2001; Perry et al., 2002; Hänfling et al., 2005). Il peut sembler paradoxal, étant donné que les plantes s'hybrident avec une aussi grande facilité, que moins d'attention y ait été consacrée.

1.4 Hybridation entre espèces indigènes et introduites

Depuis les années 90, plusieurs zones hybrides entre espèces végétales introduites et indigènes ont été étudiées, entre autres dans les genres *Carpobrotus* (Aizoaceae; Albert et al., 1997; Gallagher et al., 1997; Vilà et D'Antonio, 1998a, 1998b;

Suehs et al., 2006), *Eucalyptus* (Myrtaceae; Barbour et al., 2002, 2006), *Helianthus* (Asteraceae; Carney et al., 2000), *Morus* (Moraceae; Burgess et Husband, 2004, 2006; Burgess et al., 2005), *Onopordum* (Asteraceae; O'Hanlon et al., 1999), *Populus* (Salicaceae; Vanden Broeck et al., 2005), *Rhododendron* (Ericaceae; Milne et Abbott, 2000), *Rorippa* (Bleeker, 2003) et d'autres genres de la famille Brassicaceae (Hurka et al., 2003), *Rubus* (Rosaceae; Randell et al., 2004) et *Spartina* (Poaceae; Daehler et Strong, 1997; Ayres et al., 1999, 2004). Cependant, le potentiel pour ce type d'interaction est encore souvent ignoré (Huxel, 1999).

L'attention est particulièrement focalisée sur les espèces cultivées qui introgressent leurs congénères sauvages (Ellstrand, 1992, 2003; Ellstrand et al., 1999) e.g., Arias et Rieseberg, 1994; Whitton et al., 1997; Linder et al., 1998; Chen et al., 2004). La problématique de l'évasion de transgènes n'est certes pas étrangère à l'intérêt croissant pour le flux génique entre espèces cultivées et indigènes (Klinger et Ellstrand, 1994; Messeguer, 2003; Stewart et al., 2003; Thompson et al., 2003; den Nijs et al., 2004; Hails et Morley, 2005). La plupart des plantes domestiquées s'hybrident avec une espèce sauvage dans une partie de leur aire de répartition (Hancock et al., 1996; Ellstrand et al., 1999; Ellstrand, 2003). Parmi les 25 plus importantes plantes cultivées, seules trois ne s'hybrident pas avec un taxon indigène (Ellstrand, 2003). Dans dix cas, des évidences suggèrent que l'assimilation génétique ou l'extinction du congénère sauvage auraient résulté de l'hybridation. Étant donné la forte densité des plantes introduites en milieu agricole et la quantité de pollen qui y est produite, l'immigration d'allèles cultivés excède typiquement beaucoup le taux de mutation dans les populations naturelles impliquées (Ellstrand et al., 1999). Il est intéressant de noter que le flux génique se fait également dans la direction inverse, jouant parfois un rôle important dans l'origine et le développement des plantes cultivées (Heiser, 1973; Beebe et al., 1997; Jarvis et Hodgkin, 1999).

Puisque les causes anthropiques d'hybridation que sont les modifications d'habitats et le mouvement d'espèces sont appelées à augmenter avec l'accroissement de la population et de la mobilité humaine, il est probable que l'hybridation deviendra un

enjeu de conservation encore plus important dans le futur. La modification des aires de répartition en fonction des changements climatiques pourrait aussi influencer les taux d'hybridation (Huxel, 1999).

1.5 Gestion des zones hybrides pour la conservation

Allendorf et al. (2001) ont développé des recommandations pour mieux tenir compte, dans une perspective de conservation, du rôle évolutif de l'hybridation et des problèmes liés à l'hybridation anthropique. Les taxons résultant d'une hybridation naturelle devraient être éligibles à un statut de conservation. Par exemple, les aires sympatriques d'espèces d'orchidées terrestres sont des sites importants pour les processus évolutifs de ces espèces et méritent un statut de conservation élevé (Cozzolino et al., 2006).

Pour l'hybridation de cause humaine, trois cas sont considérés. S'il y a hybridation en l'absence d'introgession, il est encore possible de sauver les populations pures si les outils de détection sont assez fins pour s'assurer que seul le parent indigène est réintroduit (Allendorf et al., 2001; Hall et al., 2006). Cela exige un nombre de marqueurs moléculaires suffisant pour détecter les introgressants potentiels des parents (Boecklen et Howard, 1997). Le retrait des hybrides et de l'espèce introduite peut être couplé à une restauration d'habitat pour être plus efficace (Allendorf et al., 2001). Comme la dégradation d'habitat peut réduire l'efficacité des barrières reproductives, la restauration peut s'avérer la meilleure solution à long terme (Wolf et al., 2001). Une partie importante de la variation génétique d'une espèce se trouvant entre les populations, la conservation de différentes populations est un objectif souhaitable (Rhymer et Simberloff, 1996).

Quand l'introgession s'est produite et qu'un essaim hybride s'est formé, le risque d'identification erronée augmente et il devient alors plus difficile d'entreprendre un programme d'élimination sélective et de réintroduction (Epifanio et Philipp, 2001). Les populations fortement introgressées ont peu de valeur pour la conservation et les

efforts devraient plutôt être dirigés vers le maintien et l'expansion des populations pures restantes (Allendorf et al., 2001). Cela peut être couplé à la propagation des rares individus purs dans des sites où l'hybridation est peu probable (Rieseberg, 1995). Il s'avère donc que la meilleure façon d'éliminer les risques d'hybridation est la prévention de contact secondaire par l'entremise humaine, par exemple avant l'introduction volontaire d'espèces dans le cadre d'un programme de biocontrôle (Allendorf et al., 2001; Epifanio et Philipp, 2001). Cela peut se faire en évaluant l'aptitude relative des hybrides et la force des barrières reproductives entre les taxons qui montrent un potentiel d'hybridation (Epifanio et Philipp, 2001).

La conservation des hybrides, voire l'hybridation intentionnelle, peuvent toutefois être souhaitables quand les populations sont réduites ou contiennent peu de diversité génétique suite à un goulet d'étranglement (Rieseberg, 1991b; Rhymer et Simberloff, 1996; Allendorf et al., 2001). Il est cependant préférable de vérifier au préalable qu'il n'y ait pas de sélection négative contre les hybrides (Allendorf et al., 2001). De plus, les particularités locales des populations pourraient être perdues de cette façon, ce qui risque de causer un déclin de l'aptitude (Rhymer et Simberloff, 1996; Epifanio et Philipp, 2001). Plus le nombre de populations encore pures est restreint, ou plus les populations hybrides sont différenciées au plan phénotypique, plus ces dernières prennent de la valeur (Allendorf et al., 2001). Au contraire, si l'existence des populations hybrides constitue une menace importante pour les populations pures, leur valeur décroît. Quand les hybrides contiennent une part importante de la diversité restante, leur préservation est indiquée (Rieseberg, 1991b; Rieseberg et Gerber, 1995).

1.6 Objectifs

Ce projet vise l'étude de l'hybridation entre le rosier rugueux (*Rosa rugosa* Thunb. ex Murray; Rosaceae) introduit et le rosier inerme (*R. blanda* Ait.) indigène. Le rosier rugueux est naturalisé dans le Nord-Est de l'Amérique du Nord, particulièrement dans les habitats côtiers, dont le long de l'estuaire du Fleuve Saint-Laurent. Comme nous venons de le voir, cette hybridation pourrait constituer un risque pour l'intégrité

génétique du rosier inerme. Il est aussi possible que les hybrides ainsi créés deviennent une menace écologique envers les habitats de l'estuaire.

À l'aide de marqueurs moléculaires et de caractères morphologiques, une première étape essentielle de l'étude de cette zone hybride est la documentation du flux génique interspécifique. Nous pouvons ainsi évaluer l'ampleur de l'hybridation, tant au niveau géographique que par sa structure génétique, pour mieux en cerner les conséquences potentielles. Pour compléter cette information, le taux de coloration du pollen permet d'estimer l'aptitude reproductive mâle relative des hybrides. De plus, pour une application plus pratique des informations que fournira cette étude pour les gestionnaires sur le terrain, il importe de déterminer si la morphologie est un outil fiable pour la détection d'hybrides en évaluant sa concordance avec les données moléculaires. Le cas échéant, il convient de cerner les caractères morphologiques les plus discriminants entre l'hybride et ses parents. De façon auxiliaire, le séquençage de rosiers rugueux nord-américains et la comparaison avec des séquences d'individus de l'aire d'origine permet d'établir si le matériel introduit est composé de l'espèce pure ou d'hybrides cryptiques. Ces objectifs sont abordés au second chapitre. Les outils moléculaires et morphologiques développés dans cette étude permettront éventuellement un suivi de l'évolution de cette zone.

CHAPITRE 2

Hybridization between the escaped *Rosa rugosa* (Rosaceae) and the native *R. blanda* in eastern North America

Marjorie Mercure and Anne Bruneau

Cet article sera soumis sous peu à la revue American Journal of Botany

2.1 Résumé

Le rosier rugueux (*Rosa rugosa*) est un arbuste ornemental agressif, introduit d'Asie au siècle dernier. Il est fréquemment utilisé dans les croisements horticoles pour sa résistance au froid, sa vigueur et sa floraison remontante. Quoique d'intérêt pour les horticulteurs, ces qualités pourraient aussi avoir contribué à la naturalisation de *R. rugosa* le long des côtes du Nord-Est de l'Amérique du nord. Des colonies denses ont été trouvées le long des rives de l'estuaire du Fleuve St-Laurent, où le rosier rugueux partage un habitat commun avec le rosier inerme indigène (*R. blanda*). Près de 200 individus des espèces parentales et hybrides putatifs ont été échantillonnés dans des populations pures et sympatriques de l'aire naturalisée du rosier rugueux pour documenter l'hybridation entre ces espèces, évaluer l'étendue géographique et la structure génétique de la zone hybride ainsi qu'investiguer l'utilité de la morphologie pour la détection des hybrides. Nous avons développé des amorces spécifiques pour des marqueurs SNP (*single nucleotide polymorphisms*) diagnostiques ou presque d'un intron chloroplastique et de quatre introns nucléaires. Nos résultats ont documenté l'hybridation fréquente entre ces espèces et ont montré qu'une faible introgression bilatérale se produit dans les populations sympatriques. Des hybrides ont été trouvés dans chacune des populations sympatriques, démontrant la faiblesse des barrières reproductives entre ces espèces. Les données morphologiques, concordantes avec les données moléculaires, supportent la présence de quelques rétrocroisements. Les analyses morphologiques ont fourni des caractères diagnostiques pour l'identification des hybrides sur le terrain et le suivi de la zone hybride. Cette hybridation pourrait éventuellement conduire à l'assimilation génétique localisée de *R. blanda* dans l'aire de sympatrie et à la formation d'un hybride envahissant. Cette étude supporte la notion que les espèces introduites non seulement menacent la biodiversité par la compétition écologique mais qu'elles menacent aussi, par l'introgression, l'intégrité génétique des espèces indigènes.

2.2 Abstract

Rosa rugosa is an aggressive ornamental shrub introduced from Asia in the last century. It is commonly used in breeding for its great hardiness, vigour and long blooming period. Although of interest to horticulturists, these qualities also could have contributed to the escape from cultivation and subsequent establishment of *R. rugosa* in coastal northeastern North America. Dense colonies are found along the shores of the St. Lawrence River estuary where it shares common habitats with the native *R. blanda*. Nearly 200 individuals of parental species and putative hybrids were collected in pure and mixed populations along the naturalized range of *R. rugosa* to document hybridization between these species, to evaluate the geographical extent and the genetic structure of the hybrid zone, and to investigate the use of morphology for hybrid identification. We developed species-specific primers to assay diagnostic single nucleotide polymorphisms (SNPs) markers from one chloroplast and four nuclear introns. Our results documented the abundant hybridization between these species and show that infrequent introgression is occurring in mixed populations. Hybrids were found in every mixed population studied, showing the weakness of reproductive barriers between these species. Morphological data are concordant with molecular data and provide additional evidence for the presence of a few backcrosses. Morphological analyses yielded diagnostic characters for field identification of hybrids and monitoring of the hybrid zone. Such hybridization could ultimately lead to the localized genetic assimilation of *R. blanda* in the area of sympatry and to the formation of an invasive hybrid. This study supports the notion that introduced species not only threaten native species by competing for habitats but also threaten, through introgression, their genetic integrity.

2.3 Introduction

Even though some level of hybridization is part of the biological reality of many plant species (Knobloch, 1972; Grant, 1981; Rieseberg and Soltis, 1991; Ellstrand et al., 1996; Cronn and Wendel, 2003; Mallet, 2005), human actions artificially increase hybridization rates, thus disrupting both the genetic and ecological equilibrium of native biodiversity (Rhymer and Simberloff, 1996; Ellstrand and Schierenbeck, 2000). The anthropogenic effect on hybridization rate occurs through habitat disturbance (Anderson, 1948; Grant, 1981; Levin et al., 1996; e.g., Tsukaya et al., 2003) and, more importantly, through the purposeful or inadvertent movement of organisms (Huxel, 1999; Ellstrand and Schierenbeck, 2000; Allendorf et al., 2001; Mooney and Cleland, 2001; Hall et al., 2006). Exotics now represent about 27% of the flora of Canada (Scoggan, 1978). In the United States, about 35 billion dollars are allocated annually to the management of invasive plant species (Pimentel et al., 2000), which have important ecological consequences (Williamson, 1996; Mack et al., 2000). Notwithstanding the constructive evolutionary roles played by hybridization (reviewed in Rieseberg and Carney, 1998), it also can have serious conservation implications in the context of introduced species (Vilà et al., 2000; Mooney and Cleland, 2001; Olden et al., 2004). Demographic swamping, genetic assimilation, gamete waste and outbreeding depression may lead to the extinction of the native parent or to the merging of the two genomes (Rieseberg, 1991b; Levin et al., 1996; Rhymer and Simberloff, 1996; Wolf et al., 2001). Heterosis and new adaptations provided by recombination have led to the creation of vigorous invasive hybrids in many hybrid zones between native and introduced or between two exotic species (reviewed by Ellstrand et al., 1999; Ellstrand and Schierenbeck, 2000; Abbott et al., 2003), threatening the existence of the local taxon (Daehler and Strong, 1997; Burgess and Husband, 2006) and ecosystems (Vilà and D'Antonio, 1998b; Ayres et al., 1999; 2004; Gaskin and Schaal, 2002; Moody and Les, 2002).

Although concern about hybridization between exotics and natives has increased in the past 20 years (Echelle and Connor, 1989; Rieseberg, 1991b; Mooney and Cleland, 2001; Olden et al., 2004), most authors agree that it is still underestimated as a

conservation issue (Rhymer and Simberloff, 1996; Huxel, 1999; Vilà et al., 2000). In plants, there have been several well-documented reports of anthropogenic hybrid zones or of native plant species threatened by hybridization with exotics (reviewed in Rieseberg, 1991b; Abbott, 1992; Rhymer and Simberloff, 1996; Vilà et al., 2000 e.g., Daehler and Strong, 1997; Gallagher et al., 1997; Barbour et al., 2002; Burgess et al., 2005). It is now an important agricultural concern because most crops hybridize with wild relatives, leading to increased weediness, genetic assimilation, and even sometimes extinction of the native species (Ellstrand and Elam, 1993; Hancock et al., 1996; Ellstrand et al., 1999; Ellstrand, 2003; Haygood et al., 2003). The growing number of reports of transgene introgression into indigenous populations also highlights this problem (Hancock et al., 1996; Messeguer, 2003; den Nijs et al., 2004; Hails and Morley, 2005). Except for *Lantana* (Verbenaceae; Sanders, 1987) and *Populus* (Salicaceae; Vanden Broeck et al., 2005), few studies report hybrid zones between natives and introduced ornamentals. We investigate hybridization between the introduced ornamental *Rosa rugosa* (Rosaceae) and the native *R. blanda* in eastern North America.

Rosa rugosa Thunb. ex Murray, Japanese rose, is a diploid ($2n = 14$) species that naturally occurs on the shores of temperate and northern Eastern Asia (Ohwi, 1965; Ueda et al., 1996). The qualities for which *R. rugosa* is praised in rose breeding programs are also likely to be involved in its naturalization. Being among the hardiest of species in the genus (to -40°C), it shows disease and pest resistance, heat, drought, wind and salt tolerance, recurrent blooming, high vigour, and a strongly suckering habit (Rehder, 1940; Dirr, 1978; Augé et al., 1990; Bruun, 2005). The use of *R. rugosa* for dune stabilization (Belcher, 1977) also has contributed to its naturalization. In Europe, *R. rugosa* has become naturalized or invasive in 16 countries, mostly along the coasts of the Northern Atlantic and of the Baltic and North Seas where it replaces native communities (Bruun, 2005; Kollmann et al., 2007). It was introduced from Japan to North America in 1845 as an ornamental species (Rehder, 1940). Bicknell (1911) and Rydberg (1920) reported it as commonly cultivated and occasionally escaped in Connecticut and on Nantucket Island. It is now naturalized in 19 states of the U.S.A.

(USDA NRCS, 2007) and six provinces of Canada (Darbyshire, 2003), mainly along the northern Atlantic Coast, where it forms dense colonies. *Rosa rugosa* is now so locally common that it is often thought to be native (Verrier, 1991). It is easily differentiated from North American indigenous roses by its abundant pubescence and prickles, and by its thick, rugose and glossy leaflets.

Rosa blanda Ait. or smooth rose is a polymorphic diploid species ($2n = 14$) widely distributed in eastern North America, from Manitoba to the Atlantic Coast, south to Missouri and North to the Hudson Bay (Erlanson, 1930; Bruneau et al., 2005). It grows in various open or woody habitats such as meadows, thickets, clearings and along roads, ditches, banks and shores, on a broad array of mesic soil types, often on a calcareous base (Fernald, 1918; Boivin, 1945; Soper and Heimburger, 1982; Joly et al., 2006). *Rosa blanda* is commonly found along the well-drained shores of the St. Lawrence River estuary up to the level of the highest tides (Boivin, 1945) where we observed that it frequently formed sympatric populations with *R. rugosa*. Although highly variable, *R. blanda* can be differentiated from other North American indigenous roses by its lack of prickles on young wood and by its glabrous fruit and petioles (Boivin, 1945).

Rosa rugosa and *R. blanda* are phylogenetically close relatives, both placed in section *Cinnamomeae* (Wissemann and Ritz, 2005; Bruneau et al., 2007). Although they have a high karyotypic similarity (Ma et al., 1997), Hurst (1928) considered them to belong to different chromosomal groups. This does not seem to impair their interfertility; *R. blanda* was found to be one of the most fertile maternal species in crosses with other diploid members of section *Cinnamomeae*, notably with *R. rugosa* (Ratsek et al., 1939). Because of the apparent lack of prezygotic barriers and the interfertility of these species, we expect that natural hybridization between *R. rugosa* and *R. blanda* occurs in mixed populations, although no natural hybrid has been reported to date between these species. We noted the presence of individuals of apparent intermediate morphology in several populations in the St. Lawrence River estuary region, a preliminary evidence for hybridization.

The main objective of this study is to document hybridization between *R. blanda* and *R. rugosa* using codominant SNP-based nuclear and chloroplast markers. The geographic extent and genetic structure of their hybrid zone also are verified. The latter can indirectly reveal patterns of reproductive barriers, strength of selection and differential fitness among the genotype classes (Barton and Hewitt, 1985; Arnold, 1993; Harrison, 1993). These factors have been shown to play a critical role in controlling patterns of introgression and the fate of hybrid zones (Nason et al., 1992; Rieseberg and Carney, 1998). The reproductive male fitness of the parents and hybrids also is estimated using pollen viability to further evaluate the evolutionary impact of hybridization with the exotic *R. rugosa* on the integrity of the native *R. blanda*. Additionally, we measure the concordance between molecular markers and morphology, and investigate the use of individual morphological characters for practical and economical monitoring of hybridization in the field. Because invasiveness of a species often has been demonstrated to arise from hybridization, an auxiliary objective is to investigate whether the naturalized *R. rugosa* is the pure species or a cryptic hybrid.

2.4 Methods

2.4.1 Sampling

Sampling of mixed populations focused on the St. Lawrence River estuary (Canada) where field observations and herbarium specimens indicated *R. rugosa* was well established in natural habitats (Fig. 2.1; Table 2.1). Between four and 29 individuals were sampled in 11 mixed populations depending on their size. In each population, individuals were selected to represent the greatest diversity of morphotypes. Allopatric and sympatric pure parental populations comprising two to eight individuals were sampled for the selection of morphometric characters and molecular markers. Four allopatric pure populations of escaped *R. rugosa* were collected along the coast of the northeastern United States, and allopatric populations of *R. blanda* were analysed from the study of Joly et al. (2006). A total of nine pure populations of both species were also

sampled in the area of sympatry to look for cryptic signs of introgression (Fig. 2.1; Table 2.1). For each individual, fresh leaves were stored in silica gel until extraction and a flowering or fruiting voucher was pressed for morphological measurements (deposited at MT). Three individuals of *R. rugosa* from its native range in Japan and one from its introduced range in Germany were included to verify whether the taxon escaped in North America is the pure species from Asia or a cryptic hybrid.

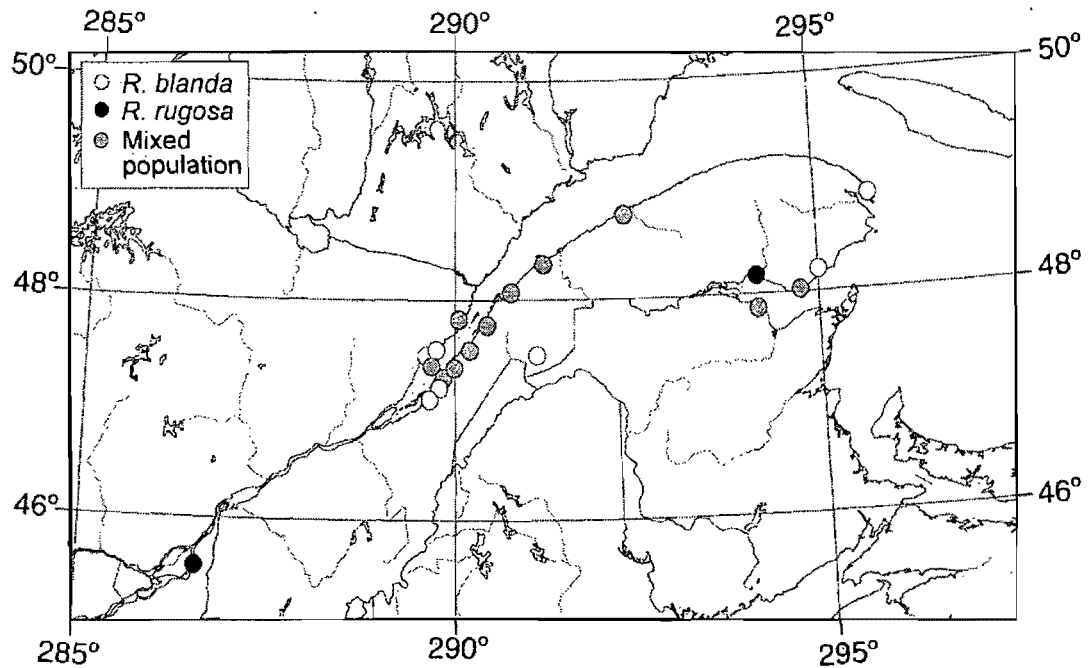


Figure 2.1 Localities of *Rosa blanda* and *R. rugosa* sampled along the St. Lawrence River, eastern Canada, showing all mixed populations and some of the pure populations.

Table 2.1 Voucher information and localities of the individuals used in the study of the natural hybridization between *Rosa blanda* and *R. rugosa* in eastern North America. Population refers to the composition of the population in which the individual was found. For use: G: genotyped for the molecular study; M: main dataset of morphological characters; F: reduced dataset of additional fruit characters; P: pollen stainability study. Mol. HI and Morph. HI respectively refer to the molecular and morphological hybrid indices. NH and KM respectively refer to the class assigned to each individual in the molecular NewHybrids analysis (when posterior probability exceeds 0.9) and in the morphological *K*-means analysis. B and R refer to *R. blanda* and *R. rugosa* classes.

Locality Coordinates	Population	Voucher ID	Use	Mol. HI	Morph. HI	NH	KM
Boucherville, Québec, Canada N 45°36', W 73°27' ^a	<i>R. rugosa</i>	1	G	1.000	-	R	-
		2	G	1.000	-	R	-
		3	G, M, P	1.000	0.815	R	R
		4	G, M, P	1.000	1.000	R	R
		5	G, P	1.000	-	R	-
Ile-aux-Coudres, Québec, Canada N 47°25', W 70°21' ^a	Mixed	16	G, M, P	1.000	0.875	R	R
		17	G, M, P	1.000	0.916	R	R
		18	G, M, P	1.000	0.807	R	R
		19	G, M, P	1.000	0.889	R	R
		20	G, M	1.000	0.863	R	R
		21	G, M, P	0.487	0.383	F ₁	F ₁
		22	G, M, P	0.000	0.108	B	B
		23	G, M, P	0.000	0.100	B	B
		24	G, M, P	0.000	0.053	B	B
		25	G, M, P	0.487	0.498	F ₁	F ₁
		26	G, M, P	0.487	0.294	F ₁	F ₁
		27	G, M, P	0.609	0.303	F ₁	F ₁
		28	G, M, P	1.000	0.861	R	R
		29	G, M, P	1.000	0.873	R	R
		30	G, M, P	0.487	0.452	F ₁	F ₁
		31	G, M, P	0.487	0.366	F ₁	F ₁
		32	G, M, P	0.487	0.398	F ₁	F ₁
33	G, M, P	0.487	0.418	F ₁	F ₁		
34	G, M, P	0.487	0.373	F ₁	F ₁		
35	G, M, P	0.000	0.097	B	B		
36	G, M, P	0.487	0.288	F ₁	B		
37	G, M, P	0.000	0.083	B	B		
St-Joseph-de-la-rive, Québec, Canada N 47°27'22.6", W 70°22'04.6"	<i>R. blanda</i>	38	G, M, P	0.000	0.124	B	B
		39	G, M, P	0.000	0.050	B	B
		40	G, M, P	0.000	0.078	B	B
		41	G, M, P	0.000	0.071	B	B
Cap-aux-Oies, Québec, Canada N 47°29'54.4", W 70°13'54.1"	<i>R. blanda</i>	42	G, M, P	0.000	0.069	B	B
		43	G, M, P	0.000	0.114	B	B
		44	G, M, P	0.000	0.135	B	B
Port-au-Persil, Québec, Canada N 47°48'27.0", W 69°53'46.5"	Mixed	45	G, M, P	0.011	0.100	B	B
		46	G, M, P	0.011	0.093	B	B
		47	G, M	1.000	0.787	R	R
		48	G, M, P	0.609	0.445	F ₁	F ₁
		49	G, M, P	0.609	0.535	F ₁	F ₁
		50	G, M, P	0.609	0.507	F ₁	F ₁
		51	G, M, P	0.487	0.441	F ₁	F ₁
		52	G, M, P	1.000	0.752	R	R
Notre-Dame-du-Portage, Québec,	Mixed	53	G, M, P	1.000	0.874	R	R

Locality Coordinates	Population	Voucher ID	Use	Mol. HI	Morph. HI	NH	KM
Canada N 47°47'37.5", W 69°35'24.0"		54	G, M, P	0.000	0.115	B	B
		55	G, M, P	0.487	0.402	F ₁	F ₁
		56	G, M, P	0.487	0.412	F ₁	F ₁
		57	G, M, P	0.000	0.050	B	B
		58	G, M, P	0.487	0.468	F ₁	F ₁
		59	G, M, P	0.000	0.110	B	B
		60	G, M, P	1.000	0.852	R	R
		61	G, M, P	0.000	0.061	B	B
		62	G, M	0.487	0.482	F ₁	F ₁
		63	G, M, P	0.487	0.298	F ₁	F ₁
		65	G, M, P	0.487	0.508	F ₁	F ₁
		66	G, M	0.618	0.577	-	-
		67	G, M	0.618	0.554	-	-
		68	G, M, P	0.000	0.099	B	B
Kamouraska, Québec, Canada N 47°33'43.8", W 69°52'27.3"	Mixed	69	G, M, P	1.000	0.859	R	R
		70	G, M	1.000	0.945	R	R
		71	G, M, P	0.487	0.455	F ₁	F ₁
		72	G, M, P	0.487	0.581	F ₁	F ₁
		73	G, M, P	1.000	0.807	R	R
		74	G, M, P	0.487	0.445	F ₁	F ₁
		75	G, M, P	0.487	0.525	F ₁	F ₁
		76	G, M	0.487	0.596	F ₁	F ₁
		77	G, M, P	1.000	0.795	R	R
		78	G, M, P	0.000	0.052	B	B
		79	G, M, P	0.000	0.074	B	B
St-Roch-des-Aulnaies, Québec, Canada N 47°18'57.0", W 70°10'17.6"	Mixed	80	G, M, P	0.000	0.330	B	F ₁
		81	G, M, P	0.000	0.067	B	B
		82	G, M, P	0.000	0.062	B	B
		83	G, M	0.875	0.725	-	-
St-Jean-Port-Joli, Québec, Canada N 47°10'44.4", W 70°18'15.8"	<i>R. blanda</i>	84	G, M	0.011	0.068	B	B
		85	G, M, P	0.000	0.097	B	B
		86	G, M, P	0.000	0.062	B	B
		87	G	0.011	-	B	-
Lincolntonville, Maine, U.S.A. N 44°16'42.3", W 69°00'23.8"	<i>R. rugosa</i>	92	G, M, P	1.000	0.851	R	R
		95	G, M, P	1.000	0.915	R	R
		96	G, M, P	1.000	0.690	R	R
Biddeford, Maine, U.S.A. N 43°25'35.5", W 70°22'39.8"	<i>R. rugosa</i>	97	G, M, P	1.000	0.824	R	R
		100	G, M	1.000	0.851	R	R
		101	G, M, P	1.000	0.782	R	R
Ipswich, Massachusetts, U.S.A. N 42°41'05.5", W 70°45'58.3"	<i>R. rugosa</i>	103	G, M, P	1.000	0.825	R	R
		106	G	1.000	-	R	-
Cape Cod, Massachusetts, U.S.A. N 41°53'27.0", W 69°57'51.8"	<i>R. rugosa</i>	108	G, M	1.000	0.835	R	R
		112	G, M	1.000	0.916	R	R
		113	G, M	1.000	0.785	R	R
		114	G, M, P	1.000	0.943	R	R
		115	G, M	1.000	0.791	R	R
		116	G, M	1.000	0.776	R	R
Trois-Pistoles, Québec, Canada N 48°07', W 69°11' ¹⁸	Mixed	120	G, M	0.875	0.746	-	-
		121	G, M, F	0.011	0.099	B	B
		122	G, M, F	0.609	0.495	F ₁	F ₁
		123	G, M, F	0.487	0.391	F ₁	F ₁
		124	G, M, F	0.000	0.051	B	B
125	G, M, F	0.609	0.480	F ₁	F ₁		

Locality Coordinates	Population	Voucher ID	Use	Mol. HI	Morph. HI	NH	KM
		126	G, M, F	0.487	0.512	F ₁	F ₁
		127	G, M, F	1.000	0.873	R	R
		128	G, M, F	0.487	0.521	F ₁	F ₁
		129	G, M, F	0.000	0.175	B	B
		130	G, M, F	0.609	0.490	F ₁	F ₁
		131	G, M	1.000	0.807	R	R
Parc national du Bic, Québec, Canada N 48°21'24.1", W 68°47'47.9"	Mixed	132	G, M, F	0.487	0.532	F ₁	F ₁
		133	G, M, F	1.000	0.801	R	R
		134	G, M, F	0.487	0.258	F ₁	F ₁
		135	G, M, F	0.487	0.428	F ₁	F ₁
		136	G, M	0.618	0.741	-	-
		137	G, M, F	0.000	0.046	B	B
		138	G, M, F	1.000	0.901	R	R
		139	G, M, F	0.487	0.455	F ₁	F ₁
		140	G, M	0.743	0.613	-	-
		141	G, M, F	0.487	0.451	F ₁	F ₁
		142	G, M, F	0.000	0.038	B	B
		143	G, M, F	0.487	0.537	F ₁	F ₁
		144	G, M, F	0.011	0.030	B	B
		145	G, M, F	0.487	0.393	F ₁	F ₁
		146	G, M, F	0.000	0.086	B	B
		148	G, M, F	0.000	0.060	B	B
		149	G, M, P, F	1.000	0.832	R	R
		150	G, M, F	0.000	0.056	B	B
		151	G, M, F	0.487	0.408	F ₁	F ₁
		152	G, M	0.327	0.318	-	-
		153	G, M, F	0.011	0.154	B	B
		154	G, M, F	0.609	0.486	F ₁	F ₁
		155	G, M, F	0.487	0.586	F ₁	F ₁
		156	G, M, F	1.000	0.810	R	R
		157	G, M, F	0.487	0.365	F ₁	F ₁
		158	G, M, F	0.000	0.099	B	B
		159	G, M, F	1.000	0.846	R	R
		160	G, M, F	0.211	0.286	-	-
St-Ulric-de-Matane, Québec, Canada N 48°46'06.7", W 67°46'04.7"	Mixed	161	G, M, F	1.000	0.858	R	R
		162	G, M, F	0.000	0.087	B	B
		163	G, M, F	0.487	0.555	F ₁	F ₁
		164	G, M, F	0.487	0.479	F ₁	F ₁
		165	G, M, F	0.487	0.631	F ₁	F ₁
		166	G, M, F	1.000	0.869	R	R
Cap-des-Rosiers, Québec, Canada N 48°51'22.0", W 64°12'08.5"	<i>R. blanda</i>	167	G	0.011	-	B	-
		168	G	0.011	-	B	-
		169	G	0.000	-	B	-
Port-Daniel, Québec, Canada N 48°10'47.7", W 64°56'41.3"	<i>R. blanda</i>	172	G, M, F	0.000	0.096	B	B
		173	G	0.000	-	B	-
		174	G, M, F	0.000	0.088	B	B
		175	G, F	0.000	-	B	-
		176	G, F	0.000	-	B	-
Paspébiac, Québec, Canada N 48°01'02.5", W 65°14'51.3"	Mixed	177	G, M, F	0.487	0.473	F ₁	F ₁
		178	G, M, F	1.000	0.763	R	R
		179	G, M, F	0.487	0.531	F ₁	F ₁
		180	G, F	0.487	-	F ₁	-
		181	G, F	0.000	-	B	-
		183	G, M, F	0.487	0.336	F ₁	F ₁

Locality Coordinates	Population	Voucher ID	Use	Mol. HI	Morph. HI	NH	KM
		184	G, M, F	0.487	0.598	F ₁	F ₁
New Richmond, Québec, Canada N 48°10'27.3", W 65°53'11.9"	<i>R. rugosa</i>	185	G, M, F	1.000	0.795	R	R
		186	G, M, F	1.000	0.875	R	R
		187	G, M, F	1.000	0.838	R	R
Belledune, New Brunswick, Canada N 47°53'14.2", W 65°48'47.0"	Mixed	188	G, M, F	0.011	0.091	B	B
		189	G, M	0.211	0.203	-	-
		190	G, M, F	0.487	0.360	F ₁	B
		191	G, M, F	0.487	0.407	F ₁	F ₁
		192	G, M, F	0.000	0.030	B	B
		193	G	0.487	-	F ₁	-
Notre-Dame-du-Lac, Québec, Canada N 47°36'39.2", W 68°47'05.9"	<i>R. blanda</i>	194	G, M	0.000	0.064	B	B
		195	G, M	0.000	0.078	B	B
		196	G, M	0.000	0.074	B	B
		197	G, M	0.000	0.000	B	B
		198	G, M	0.000	0.007	B	B
Rivière-Ouelle, Québec, Canada N 47°26'16.6", W 70°02'34.4"	Mixed	199	G, M	0.609	0.395	-	-
		200	G, M, F	0.609	0.653	F ₁	F ₁
		201	G, M	1.000	0.756	R	R
		202	G, M, F	0.487	0.214	F ₁	F ₁
		203	G, M	0.875	0.847	-	-
		204	G, M, F	1.000	0.904	R	R
		205	G, M, F	0.487	0.247	F ₁	B
		206	G, M	0.211	0.143	-	-
L'Islet-sur-mer, Québec, Canada N 47°07'36.2", W 70°22'26.4"	<i>R. blanda</i>	207	G, M, F	0.000	0.079	B	B
		208	G, M, F	0.000	0.102	B	B
Hokkaido Bot. Garden, Japan N/A	<i>R. rugosa</i>	209	G	1.000	-	R	-
Ishikari Beach, Hokkaido, Japan N/A	<i>R. rugosa</i>	210	G	1.000	-	R	-
		211	G	1.000	-	R	-
Usedom Island, Germany N/A	<i>R. rugosa</i>	212	G	1.000	-	R	-

* Coordinates approximate because GPS readings are not available for these localities

Notes: Vouchers 92 to 120 were collected by M. Mercure and É.-A. Faubert; voucher 209 by T. Azuma, voucher 210 and 211 by Y. Hashidoko and voucher 212 by C. Ritz; remaining vouchers were collected by M. Mercure and J. Brouillard. Vouchers are deposited at MT.

2.4.2 Molecular markers

Total DNA was extracted with the CTAB extraction method of Doyle and Doyle (1987) with modifications as described by Joly et al. (2006). To develop five nuclear codominant markers and one chloroplast marker markers, we used *R. blanda* sequences generated by Joly et al. (2006 and unpublished) for the low-copy nuclear introns of the genes glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*; GenBank accessions DQ091014-DQ091039), malate synthase (*MS*; GenBank accessions DQ201055-DQ201078), and triose phosphate isomerase (*TPI*; GenBank accessions DQ200986-DQ201005). We additionally sequenced a minimum of five individuals of *R. rugosa* from allopatric populations using the following primers: *TPI*: TPI5F (Joly et al., 2006) and TPI7R (Strand et al., 1997); *GAPDH*: GPDx7F and GPDx9Rb (Joly et al., 2006); *MS*: ms400f and ms943r (Lewis and Doyle, 2001). Ten individuals of each species were also sequenced for a ferredoxin-NADP reductase precursor gene (*FENR*) using the primers FENR F and FENR R (Choi et al., 2004). To trace the maternal parents of hybrids, the *trnL-trnF* region was amplified and sequenced with the primers *trnL*-C and *trnL*-F of Taberlet et al. (1991) for a minimum of five individuals of each species. The 25 µl PCR reaction contained 1X PCR reaction buffer (Roche Diagnostics, Laval, Québec; final MgCl₂ concentration of 1.5 mM), 0.05% Tween 20 and 2.5 µg bovine serum albumin (both for nuclear loci only), 1 mM of each primer, 200 µM of each dNTP, one unit of *Taq* DNA polymerase, and approximately 150 ng of genomic DNA. Amplification conditions consisted in an initial denaturation step of 3 min at 95°C, followed by 35 (cpDNA) or 40 (nDNA) cycles of denaturation at 95°C for 30 sec, annealing at 48°C for 30 sec and elongation at 72°C for 2 min, ending with an extension step of 10 min at 72°C. The annealing temperature was adjusted to 52°C and “hot start” (addition of *Taq* DNA polymerase after an initial denaturation step of 95°C for 3 min) was used for *TPI*. Amplification products were purified with PEG as described by Joly et al. (2006). Sequencing was done with BigDye terminator chemistry (ver 1.1; Applied Biosystems, Foster City, CA) on an automated sequencer (3100-Avant Genetic Analyzer, Applied Biosystems). Contigs were assembled and sequences edited with Sequencher (ver 4.1; GeneCodes Inc., Ann Arbor, MI). One representative sequence of

R. rugosa per locus (accessions: *GAPDH*: Mercure & Brouillard 186, EF579679; *MS*: Mercure & Faubert 100, EF579680; *TPI*: Mercure & Faubert 100, EF579681; *FENR*: Mercure & Faubert 101, EF579677) and one of *R. blanda* for the locus *FENR* (Mercure & Brouillard 197, EF579678) were deposited in GenBank.

Sequences of the five genes were examined for the presence of fixed species-specific single nucleotide polymorphisms (SNPs), which were then used as primer binding sites. Mismatch Amplification Mutation Assay (MAMA) primers (Cha et al., 1992) were designed for each species based on the most selective combinations of mismatches found by Li et al. (2003) and tested for specificity on 10 allopatric individuals of each parental species. MAMA primers have one mismatch with both species at the penultimate position of the 3' end and a second consecutive mismatch with one of the species at the 3' end, effectively preventing its amplification. For the locus *FENR*, regular rather than MAMA allele-specific primers were used since two diagnostic sites were available within a 20 bp region. A common primer of similar melting temperature was designed to use with both allele-specific primers for each locus. Individuals were assayed consecutively with each allele-specific primer. Amplification with these primers was as described above, using 40 cycles and appropriate annealing temperatures (Table 2.2). "Hot starts" were used for *TPI* and *FENR*. PCR products (5 µl) were run on a 0.7% agarose gel. Whenever two loci showed different patterns for an individual, it was sequenced for all four nuclear loci to ensure reliability of the amplification. A total of 179 individuals were genotyped for the molecular study (Table 2.1).

Table 2.2 Primers designed for species-specific amplification of the chloroplast and nuclear genes used in the molecular study of *Rosa blanda*, *R. rugosa* and their hybrids. Optimal annealing temperature of the allele-specific primers and size of the fragment when amplified with the general primer are provided.

Locus	Primer name	Use	Primer sequence 5' - 3'	Annealing temp. (°C)	Size (bp)
<i>trnL-F</i>	<i>trnLFgenf</i>	General forward	ATTGGTTATGGTTCGCAGTG	-	-
	<i>trnLFbl</i>	MAMA (<i>R. blanda</i>)	AAGTATTATCCAGGCCCTCG	54	263
	<i>trnLFrug</i>	MAMA (<i>R. rugosa</i>)	AAGTATTATCCAGGCCCTCT	48	262
FENR	FENR	General forward	GTGATTGATTACTGATTCT	-	-
	<i>FENRbl</i>	<i>R. blanda</i> -specific	GAGAAATCATTCTTATCATTG	55	574
	<i>FENRrug</i>	<i>R. rugosa</i> -specific	GAGAAATCATTCTGATCATTG	57	566
GAPDH	<i>GPDgenf</i>	General forward	CTATGACCAGATCAAGGCTG	-	-
	<i>GPDbl</i>	MAMA (<i>R. blanda</i>)	TCTGTACGTAGTACTCCATC	50	269
	<i>GPDrug</i>	MAMA (<i>R. rugosa</i>)	TCTGTACGTAGTACTCCACG	49	269
MS	<i>MSgenr</i>	General reverse	AATCCATATCTTCGCTCC	-	-
	<i>MSbl</i>	MAMA (<i>R. blanda</i>)	CATTATTTATACTTGTTTGTC	52	111
	<i>MSrug</i>	MAMA (<i>R. rugosa</i>)	CATTATTTATACTTGTTTGTCG	48	111
TPI	<i>TPIgenf</i>	General forward	ACAAGTCTTGATCTATAACC	-	-
	<i>TPIbl</i>	MAMA (<i>R. blanda</i>)	CAATTATACCCGTAATAATGC	57.5	393
	<i>TPIrug</i>	MAMA (<i>R. rugosa</i>)	CAATTATACCCGTAATAATGT	56.5	393

2.4.3 Molecular analyses

Each individual was scored for presence/absence of a band for the eight allele-specific primer pairs corresponding to the four nuclear loci. The binary matrix was analyzed using the program NewHybrids (ver 1.1b; Anderson and Thompson, 2002). Two generations of hybridization were assumed to have occurred because assignment to more advanced generations requires a high number of informative markers (Boecklen and Howard, 1997) and can be biased by selection for certain genotypes (Rieseberg and Linder, 1999). Given our goals, this is sufficient to document hybridization and introgression. Uninformative priors (Jeffreys type; Anderson and Thompson, 2002) were chosen for the allelic frequencies and mixing proportions parameters. Parental individuals from pure populations of *R. blanda* were used to inform the priors on parental allelic frequencies using the “v” and “s” options in NewHybrids. The MCMC chain was run for 100,000 sweeps after discarding an initial burnin of 25,000 sweeps.

Convergence to the target distribution presumably was reached because starting the chain from different random seeds did not affect the estimated parameters and the individual posterior probabilities. Individuals were assigned to the class for which the posterior probability was the highest. The genetic marker data also were used to calculate a molecular hybrid index for each individual based on the maximum likelihood method of Rieseberg et al. (1998) for codominant markers using the program Hindex (ver 1.42; Buerkle, 2005). The parental allelic frequencies observed in the pure populations were used in building the index.

2.4.4 Morphological measurements

The main dataset comprised 17 characters that appeared to vary between the species (Table 2.3) measured on 161 herbarium specimens from individuals genotyped in the molecular study (Table 2.1). The remaining individuals were not used for the morphological study because of missing characters due to their immaturity, damage, or poor preservation. Five measures of each character were taken on every specimen, except when the available material was limited (mostly for the number of flowers per inflorescence, NFLINF). Leaflets were counted on 8 to 10 leaves per specimen. The mean of the measurements was calculated for each individual. Length measurements were made with a digital calliper with a 0.01 mm precision. Trichome densities were measured with a dissecting microscope under a 50× enlargement. Additionally, three size characters and two shape ratios of mature fruits (Table 2.3) were measured for a reduced data set of 24 *R. blanda*, 13 *R. rugosa* and 30 F₁s (Table 2.1).

Table 2.3 Description of the 22 characters used in the morphological study of the natural hybridization between *Rosa blanda* and *R. rugosa*.

Character	Description
<i>Main characters (main dataset)</i>	
NLFT	Number of leaflets per leaf
NSER	Number of serrations on one side of the terminal leaflet, including the terminal teeth
LLFT	Length of the terminal leaflet from the base of the limb to the tip (mm)
LISER/LLFT	Ratio of the length of the terminal leaflet along the midrib from the base of the limb to first serration and the length of the leaflet
MAXW/LLFT	Ratio of the maximum width of the terminal leaflet and the length of the leaflet
LMAXW/LLFT	Ratio of the length of the terminal leaflet along the midrib from the base of the limb to the widest part of the limb and the length of the leaflet
PULFT	Number of trichomes on a 4 mm ² area of the adaxial surface toward the middle of the terminal leaflet
P2VEIN	Number of trichomes along 2 mm of a secondary vein of the abaxial surface toward the middle of the terminal leaflet
GBLFT	Number of glands on a 1 mm ² surface of the abaxial surface toward the middle of the terminal leaflet
LSTP	Length of the fused portion of the stipule along the petiole from its base to the beginning of the auricle (mm)
LAUR	Length of the auricle from its base on the petiole to the tip (mm)
WAUR	Width of the auricle perpendicular to the petiole, from the middle of the petiole to the tip of the auricle (mm)
WSTP	Width of the stipule at the midpoint of its fused portion on the petiole (mm)
P1YW	Number of prickles visible along 1 cm on one side of the first year wood
P2YW	Number of prickles visible along 1 cm on one side of the second year wood
LSEP	Length of the sepal at fruiting stage
NFLINF	Number of flowers per inflorescence
<i>Fruit characters (reduced dataset)</i>	
LFRU	Length of the fruit from its base to the point of attachment of the sepals
MAXWFRU	Width of the fruit at its widest part
LMAXWFRU	Length of the fruit from its base to its widest part
MAXW/LFRU	Ratio of the width of the fruit at its widest part and its length excluding sepals
LMAXW/LFRU	Ratio of the length of the fruit from its base to its widest part and its length excluding the sepals

2.4.5 Morphological analyses

2.4.5.1 Univariate analyses

The distribution of each character was compared visually for the two parental and F_1 groups defined in the molecular analyses using box-plot diagrams. Only the two parental and F_1 classes were abundant enough to be compared. The mode of expression (parental, intermediate, transgressive) of each character was evaluated with univariate analyses. The residuals of a single factor analysis of variance (ANOVA) were tested for normality using the Kolmogorov-Smirnov test. Homoscedasticity of the variables among the classes was tested using the Bartlett (normal data) or Fligner-Killeen (non-normal data) tests (Conover et al., 1981). Box-Cox (NSER, MAXW/LLFT, P2VEIN, LAUR, WAUR, WSTP, LSEP), log (P1YW, NFLINF) and square root (PULFT, GBLFT, P2YW) transformations were applied to normalize as much as possible the listed variables. Some of the transformations were preferred to the others usually recommended for the type of data (e.g., arcsin for ratios) because attempts with several of these showed that they would worsen the skewness or kurtosis of the distribution. A one-way ANOVA was used on normally distributed characters with homogeneous variances among groups, followed by post-hoc Tukey-Kramer HSD tests when significant differences were detected. Groups with unequal variances (LMAXW/LLFT, WSTP, LSEP, MAXWFRU, LMAXWFRU, MAXW/LFRU) were compared with Games-Howell post-hoc tests. For the remaining variables in which normality of the residuals was rejected, Kruskal-Wallis non-parametric tests were applied. In case of rejection of H_0 , all three pairs of groups were compared with Mann-Whitney tests to which Holm's corrections for multiple testing were applied. Box-Cox transformations and Kolmogorov-Smirnov tests were performed in the R Package (Casgrain and Legendre, 2001) and Games-Howell tests in SPSS (release 11.5.0; SPSS Inc., Chicago, U.S.A.). The remainder of the analyses were performed in R (R Development Core Team, 2005).

2.4.5.2 *Multivariate analyses*

Multivariate analyses were done on the 17 morphological characters of the main dataset. Because the molecular data suggested that there were few backcrosses, we expected three distinct morphological groups, the two parents and F₁ hybrids. Putative second generation hybrids from the molecular analysis were removed as they could blur the delimitation of the three groups. A *K*-means clustering analysis was performed to define three morphological groups on the remaining 149 individuals for which we had both molecular and morphological data. The cluster to which each individual belonged was used as a classification criterion in a “stepdisc” procedure in SAS (V8; SAS Institute Inc., Cary, U.S.A.) to eliminate poorly discriminating variables. Using the variables of the resulting reduced model, the *K*-means analysis was repeated. This iterative procedure prevented the misclassification of individuals due to the inclusion of noisy variables. The assignments of individuals in the second clustering analysis formed the basis on which the training sets were defined in the following simple discriminant analysis for the morphological hybrid index.

A PCA of the normalized and standardized characters of the reduced model was used to compare visually the concordance between the molecular and morphological datasets when no classification is provided *a priori*. It also offered a graphical support to show the groups found in the second *K*-means. The PCA was performed with the same 149 individuals as in the *K*-means analysis in order to assess the morphological relationship of the hybrid classes to the parents in a multivariate reduced space. The PCA was performed with the “vegan” package (Oksanen et al., 2006) and *K*-means clustering analysis with the “cascadeKM” package (Durand et al., 2006) in R (R Development Core Team, 2005).

2.4.5.3 *Morphological hybrid index and correlation with molecular hybrid index*

To create a morphological hybrid index that is independent from the molecular classification, a simple discriminant analysis was performed on all 161 individuals for

which morphological characters were measured. Unlike for the molecular index, the parental individuals forming the training set of the discriminant function were not restricted to pure populations because of the limited number of individuals for which morphological data were collected. Instead, parents were defined based on the second *K*-means classification. A “stepdisc” procedure excluding the hybrids eliminated the variables with low discriminatory power to get the maximum separation between the parental species. The simple discriminant function was calculated with this subset of characters using all individuals morphologically classified as parents in the training set. The discriminant function was used to calculate the canonical variate scores of all individuals in SPSS in order to produce their morphological hybrid indices. The hybrid index was scaled between 0 and 1 to make comparisons with the molecular index more straightforward. Given the discontinuous distribution of the molecular index, an artifact of the low number of markers used, we measured the correlation between the molecular and morphological hybrid indices of all 161 individuals with the Spearman *r* correlation coefficient to statistically test the concordance between the two sets of data.

2.4.5.4 Best characters for classification in parental or F_1 classes

Canonical discriminant analysis (or canonical variate analysis, CVA) was used to select the best characters for field identification of hybrids. This analysis was not part of the comparison between morphological and molecular characters, but aimed at defining the most useful characters for classification. Hence, the information from the molecular analysis was used to predefine three groups, the two parental species and F_1 s. Again, putative second generation hybrids were excluded. The “stepdisc” procedure of SAS was performed to select the most significant variables for discriminating the three groups before performing the CVA. A cross-validation was performed with the selected variables. A random subset of 80% of the individuals formed the training set on which the discriminant function was calculated (Albert et al., 1997). The remaining individuals then were classified with this function. This step was repeated five times, and the results were pooled to quantify the misclassification rate.

2.4.6 Pollen viability

To compare the male reproductive success of hybrids to that of the parental species, we estimated pollen viability. Pollen staining is frequently used as a proxy for male reproductive fitness of hybrids (Lewis and Basye, 1961; Carney et al., 2000; Crespel and Gudin, 2003; Brock, 2004; Tauleigne-Gomes and Lefèbvre, 2005). Rose pollen germination rates are significantly correlated to pollen staining rates, although some morphologically normal pollen grains lack the ability to germinate (Pearson and Harney, 1984). Therefore, pollen stainability was used as a surrogate for maximum (not realized) pollen viability in a subset of the individuals used in the molecular study for which flowers were available (23 *R. rugosa*, 26 *R. blanda* and 23 F₁). Anthers from a flower at or shortly after anthesis were removed from herbarium specimens, dissected in a few drops of 1% Tween 20 solution, and allowed to release pollen on a microscope slide. Once most water had evaporated, debris was removed, pollen was resuspended in a few drops of Alexander's stain (Alexander, 1969, 1980) and left to stain overnight. Alexander's stain allows the discrimination of aborted pollen by differentially staining exines (green) from cytoplasm (red). Percentage of stained pollen grains was counted by randomly selecting fields along the slide until a minimum of 200 grains was reached. Grains that were shrivelled or not fully stained were regarded as aborted while fully stained plump grains were counted as viable.

2.5 Results

2.5.1 Geographical extent, species involved and North American *R. rugosa*

A non-exhaustive search revealed that mixed populations occur predominantly in the regions of Charlevoix and Bas-St-Laurent, from Ile d'Orléans, Québec to Belledune, New Brunswick. *Rosa multiflora* and *R. virginiana* were the only other rose species observed in the populations sampled for this study but no individual appeared morphologically intermediate between these species and *R. rugosa*. The sequences of individuals collected from North America were identical to the three sequences of

R. rugosa from Japan and the single one from Germany for all genes.

2.5.2 Molecular analyses

2.5.2.1 Parental allelic frequencies

The SNP markers chosen for the *trnL-F*, *GAPDH*, *MS*, and *TPI* loci appeared fixed in the pure populations investigated (Table 2.4) although the sample size of each species is limited. *Rosa rugosa* was apparently fixed for the *FENR* locus but not *R. blanda* in which the allele (R) fixed in *R. rugosa* was found at a relatively low frequency (0.071).

Table 2.4 Observed parental allelic frequencies in pure populations of *Rosa blanda* and *R. rugosa* used for the calculation of the molecular hybrid index. The letter (B or R) designating the allele refers to the species in which it is most frequent.

Locus	<i>Rosa blanda</i>		<i>Rosa rugosa</i>	
	B allele	R allele	B allele	R allele
<i>trnL-F</i>	1.000	0.000	0.000	1.000
<i>GAPDH</i>	1.000	0.000	0.000	1.000
<i>MS</i>	1.000	0.000	0.000	1.000
<i>TPI</i>	1.000	0.000	0.000	1.000
<i>FENR</i>	0.923	0.071	0.000	1.000

2.5.2.2 NewHybrids assignment test

Of the 179 genotyped individuals, most were assigned to *R. rugosa* (53 individuals), *R. blanda* (58) or F₁ categories (56) with a posterior probability higher than 0.9 (Fig 2.2; Table 2.1). The remaining 12 individuals could not be assigned to a particular class and may represent backcrosses or later generation hybrids (Fig. 2.3). Of these 12 individuals, only individual 199 obtained substantial support (0.89). However, in all of them except for individual 120, the sum of the posterior probabilities for the second generation hybrid classes (F₂ and backcross classes) was higher than the sum of the probabilities of being parents or F₁s. Individual 120 was collected from an allopatric

pure population of *R. rugosa*. Trials with Jeffreys or uniform priors on the parental allelic frequencies and mixing proportions parameters generally led to similar results (not shown) except for inconsistencies in the 12 putative later generation hybrids.

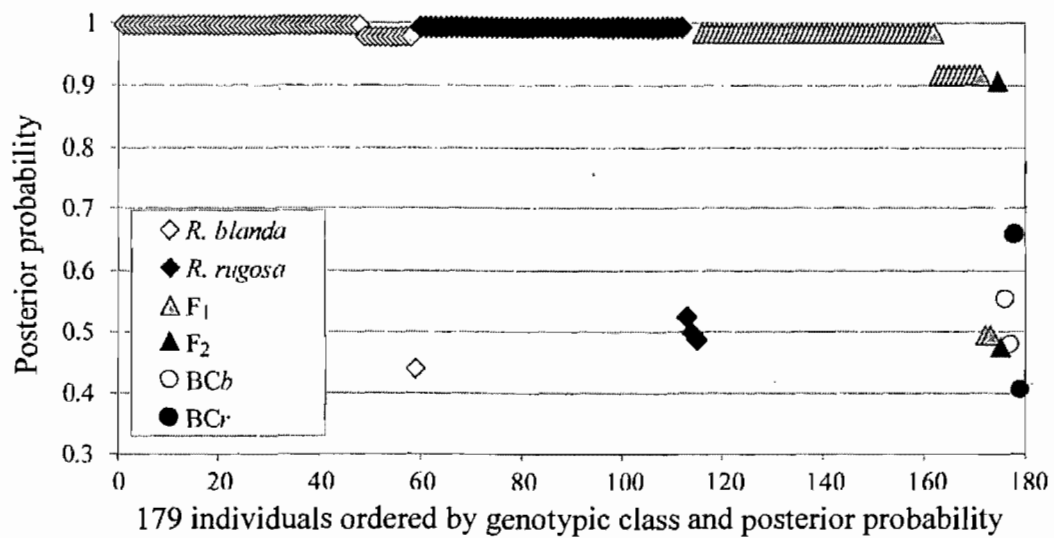


Figure 2.2 Posterior probabilities (y axis) of the class to which each individual was assigned (x axis) in the molecular analysis of NewHybrids in the study of hybridization between *Rosa blanda* and *R. rugosa*. Individuals are ordered by genotypic class then by decreasing probabilities within the classes. BCb refers to backcrosses to *R. blanda* and BCr to backcrosses to *R. rugosa*.

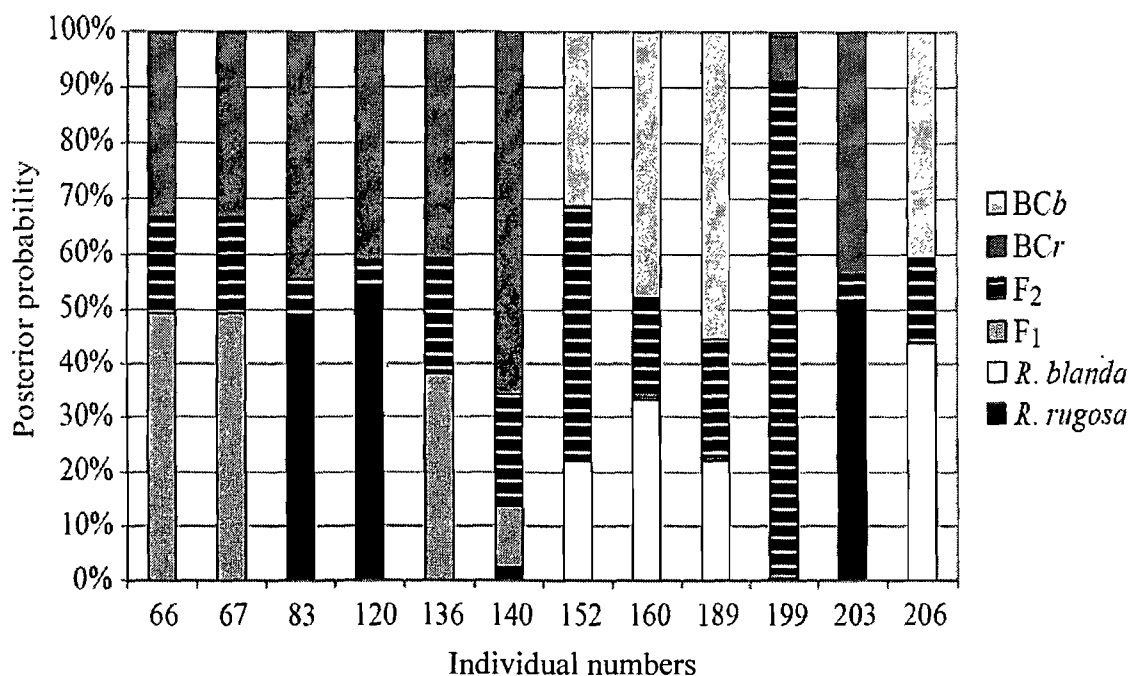


Figure 2.3 Posterior probabilities of each class in NewHybrids for twelve putative second generation hybrids between *Rosa rugosa* and *R. blanda*. BCb refers to backcrosses to *R. blanda* and BCr to *R. rugosa*.

2.5.2.3 Chloroplast marker

Of the 56 individuals assigned to the F₁ category with a high probability by NewHybrids, *R. blanda* acted as the maternal parent in 38 individuals (67.86 %) and *R. rugosa* in 18 (32.14 %). In two of the 12 putative second generation hybrids, the genotype at the maternally-inherited *trnL-F* locus provided additional evidence to inform the assignments, assuming allele fixation in both species and no event of past chloroplast capture. Individual 83 had the chloroplast marker of *R. blanda*. Hence, it could not be assigned to *R. rugosa*, increasing the likelihood of being a cross in which *R. rugosa* gave pollen to a F₁ with the chloroplast of *R. blanda*, or a F₂ (Fig. 2.3). Similarly, individual 206 had the chloroplast marker of *R. rugosa*, which increased its probability of being either a cross in which *R. blanda* was the pollen donor to a F₁ possessing the *R. rugosa* chloroplast or a F₂. The remaining individuals had chloroplast

genotypes that were consistent with the results of the NewHybrids analysis, i.e., if an individual had a non-null probability of being a *R. rugosa*, it had the marker of *R. rugosa*.

2.5.2.4 Molecular hybrid index

Parents were represented by a hybrid index of 0 and 0.058 (*R. blanda*) or 1 (*R. rugosa*; Table 2.1; Fig. 2.6). F₁ hybrids as determined by NewHybrids obtained intermediate values of 0.491 and 0.614. Because of the low number of nuclear markers used, the distribution of the molecular hybrid index is discontinuous.

2.5.3 Morphological analyses

2.5.3.1 Univariate analyses

Box-plots of the morphological variables (Fig 2.4) and Table 2.5 show the results of the univariate analyses and the position of hybrids relative to the parents. Of the 22 characters analyzed, leaflet length (LLFT), stipule length (LSTP) and the ratio of the length to maximum width over the length of the fruit (LMAXW/LFRU) were not significantly different across the three groups formed by the parents and the F₁s. In 14 characters, the three groups differed significantly and in all the hybrids were intermediate to their parents. F₁s differed from *R. blanda* but not from *R. rugosa* for the number of leaflets (NLFT) and the fruit length to maximum width (LMAXWFRU) characters. In contrast, F₁s were statistically different from *R. rugosa* but not *R. blanda* for the number of serrations (NSER) and the ratio of the length to the first serration over leaflet length (L1SER/LLFT) characters. The parents differed significantly for the ratio of leaflet length to maximum width and total length (LMAXW/LLFT) but insufficiently for the hybrid to differ significantly from either.

Table 2.5 Mean and standard deviation of 22 morphological characters and one reproductive fitness measure used in the study of natural hybridization between *Rosa blanda* and *R. rugosa*. The coefficients (loadings) of the morphological characters in the two discriminant analyses (eight characters for the morphological hybrid index and 11 characters for the CVA of the three groups) are given. Pattern in hybrids reflects whether each character is statistically intermediate (I), not statistically different ($\alpha=0.05$) from *R. blanda* (B) or *R. rugosa* (R). N/A indicates that parents are not statistically different for that character.

	Mean (standard deviation)			Loading in index	Loading in CVA of three groups	Pattern in hybrids
	<i>R. blanda</i>	<i>R. rugosa</i>	F ₁			
<i>Morphological characters (main dataset)</i>						
NLFT	6.5 (0.6)	7.2 (0.5)	7.2 (0.6)	--	-0.112	R
NSER	15.6 (2.5)	19.3 (3.1)	16.0 (2.5)	--	--	B
LLFT	35.3 (5.7)	34.1 (6.4)	34.6 (5.1)	--	--	N/A
L1SER/LLFT	0.30 (0.07)	0.15 (0.08)	0.28 (0.07)	-0.227	0.131	B
MAXW/LLFT	0.53 (0.06)	0.64 (0.08)	0.57 (0.07)	--	-0.275	I
LMAXW/LLFT	0.55 (0.05)	0.58 (0.06)	0.57 (0.04)	--	--	I
PULFT	36.6 (31.5)	0.1 (0.2)	25.1 (36.3)	-0.368	0.895	I
P2VEIN	18.8 (10.1)	83.3 (17.4)	36.5 (16.8)	0.511	-1.309	I
GBLFT	0.0 (0.1)	26.6 (6.4)	5.6 (7.4)	0.450	-1.504	I
LSTP	19.0 (2.6)	17.8 (3.0)	19.0 (2.31)	--	--	N/A
LAUR	6.0 (1.2)	10.2 (2.9)	7.6 (1.8)	--	--	I
WAUR	3.6 (0.8)	6.9 (2.0)	5.0 (1.0)	0.237	-0.499	I
WSTP	3.6 (0.8)	6.7 (1.9)	4.8 (1.3)	--	--	I
P1YW	0.7 (3.7)	39.8 (18.4)	15.2 (13.3)	0.625	-0.910	I
P2YW	2.0 (6.7)	37.2 (20.0)	26.3 (19.4)	--	0.014	I
LSEP	15.4 (2.7)	30.4 (12.1)	21.0 (4.5)	0.213	-0.677	I
NFLINF	2.9 (1.8)	1.8 (1.0)	2.2 (1.0)	-0.238	0.355	I
<i>Fruit characters (reduced dataset)</i>						
LFRU	13.9 (2.3)	18.4 (2.5)	16.5 (2.3)	--	--	I
MAXWFRU	12.8 (1.8)	27.1 (6.0)	18.5 (3.3)	--	--	I
LMAXWFRU	8.0 (2.0)	9.5 (0.8)	9.5 (2.0)	--	--	R
MAXW/LFRU	0.94 (0.14)	1.46 (0.20)	1.14 (0.25)	--	--	I
LMAXW/LFRU	0.57 (0.07)	0.52 (0.07)	0.57 (0.08)	--	--	N/A
<i>Reproductive fitness measure</i>						
Pollen stainability	56.0% (24.2%)	71.9% (21.7%)	44.8% (26.2%)	--	--	B

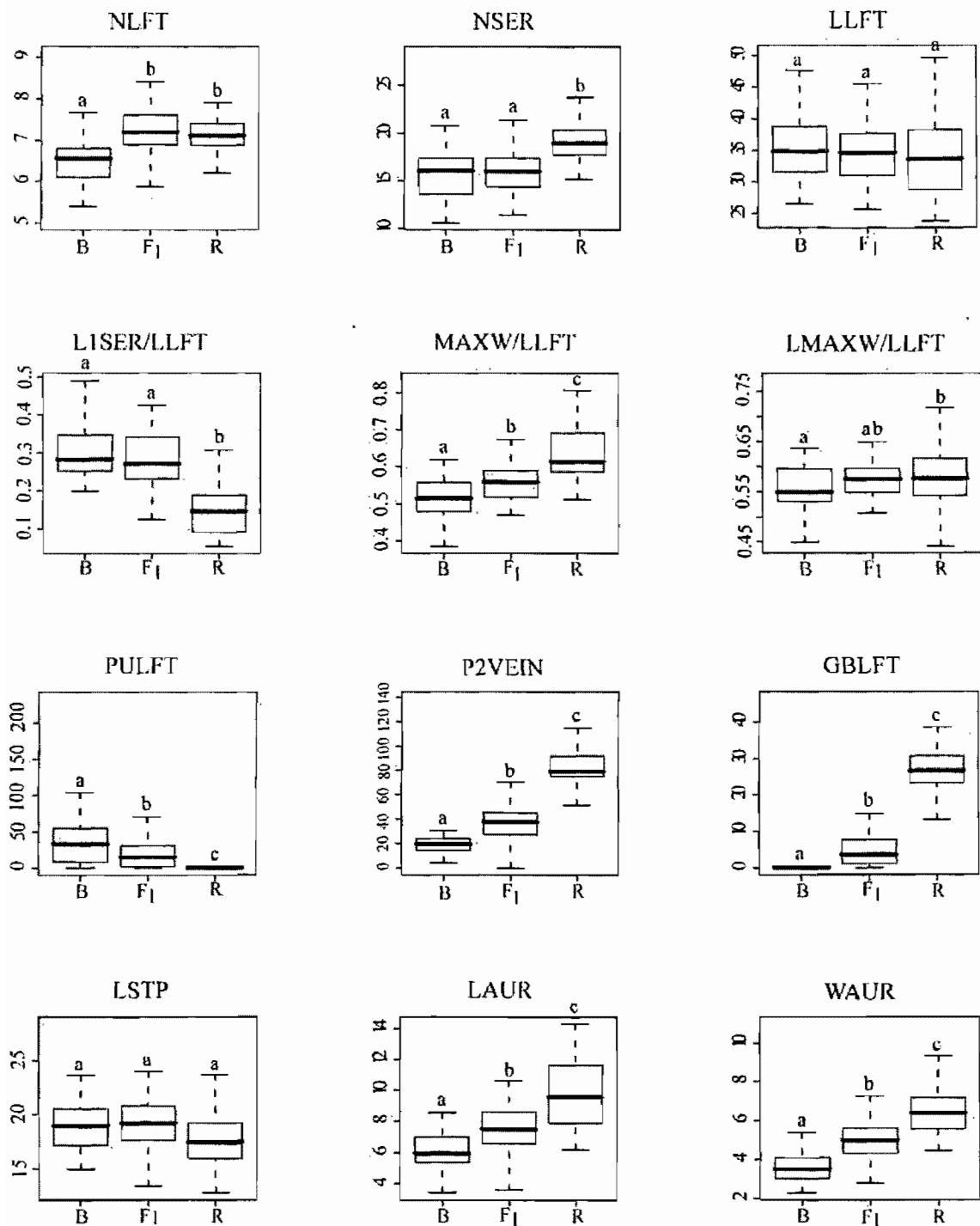


Figure 2.4 Box-plots showing the distribution prior to transformation of 22 morphological characters and maximum pollen viability for the parents and F₁ classes in the study of natural hybridization between *Rosa blanda* and *R. rugosa*. Genealogical status of individuals was determined by NewHybrids. Groups sharing a letter do not differ statistically ($\alpha=0.05$) for that character.

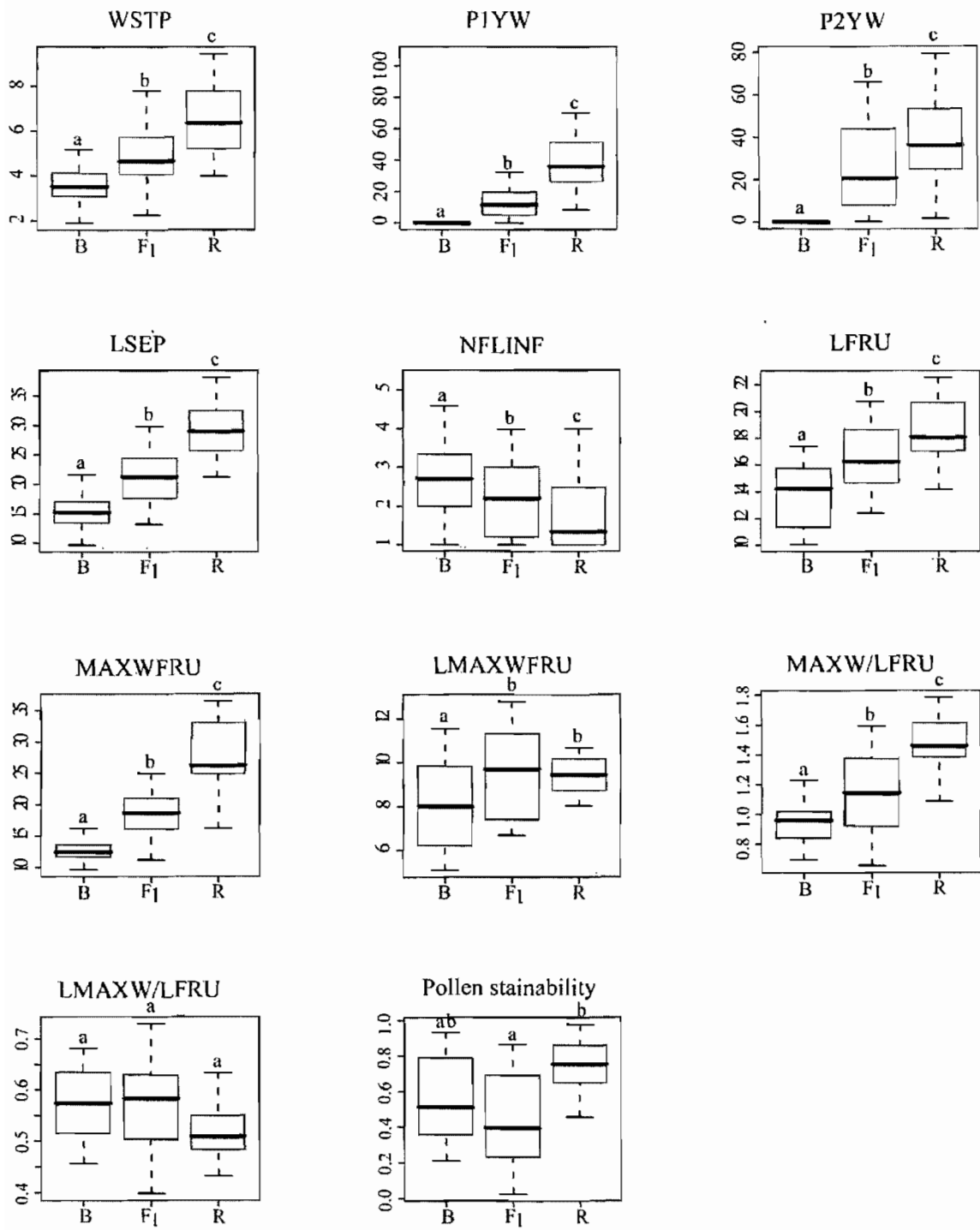


Figure 2.4 ...continued

2.5.3.2 *K*-means clustering and principal components analyses

The main morphological groups defined by the *K*-means clustering and principal components analyses were used to guide the morphological hybrid index analysis independently from the molecular study. After an initial clustering analysis with all variables, backward selection of variables kept a subset of 13 variables in the model, eliminating stipule width (WSTP) and length (LSTP), leaflet length (LLFT) and the ratio of leaflet length to maximum width and total length (LMAXW/LLFT). However, forward and stepwise selection procedures both additionally eliminated the characters number of serrations (NSER) and auricle width (WAUR) so they were excluded from the second *K*-means analysis. The resulting partition in three groups closely paralleled the three groups of *R. blanda*, *R. rugosa* and their F₁ hybrids defined by the molecular analyses (Fig. 2.5). However, individual 36 grouped with *R. blanda* instead of with the F₁s as in the molecular analyses, and individual 80 grouped with the F₁s instead of with *R. blanda* (shown by arrows in Fig. 2.5).

In the PCA performed with the 11 variables selected above (Fig. 2.5), only the first two axes were significant based on their eigenvalues that were higher than the mean (Legendre and Legendre, 1998; results not shown). Axis one showed 50.84 % of the variance and axis 2, 10.15 %, for a total of 60.99 % of the variance represented by two dimensions. Three contiguous but non-overlapping groups corresponding to the clusters of the second *K*-means analysis are discernable on the first axis. Incongruence between the molecular and the *K*-means assignments for individual 80 was noticeable. However, in the PCA individual 36 appeared closer to the F₁ group than to the *R. blanda* group to which it was assigned by the *K*-means analysis.

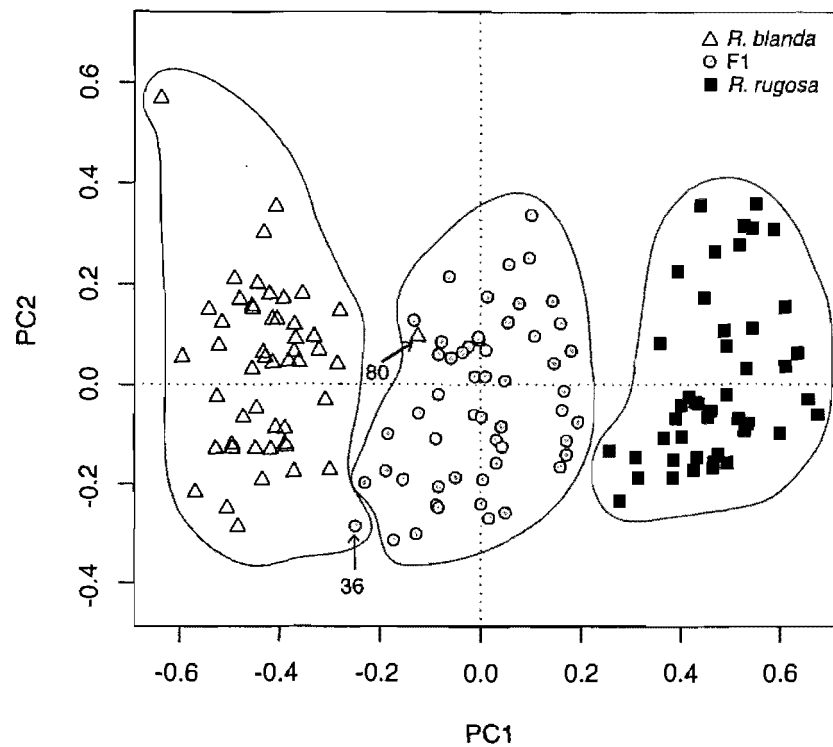


Figure 2.5 Principal component analysis (PCA) of 11 morphological characters used in the study of natural hybridization between *Rosa blanda* and *R. rugosa*. The first axis represents 50.84 % of the variance and the second 10.15 %. Symbols in the legend correspond to the molecular identifications resulting from the NewHybrids analysis. Results of a *K*-means clustering analysis of the same 11 characters are superimposed, the partition into three groups being shown by the lines. The arrows point to two individuals for which the morphological assignment by *K*-means differs from the molecular assignment by NewHybrids.

2.5.3.3 Morphological hybrid index and correlation with molecular hybrid index

Forward, backward and stepwise selections of the variables with the stepdisc procedure all selected the same eight variables for the calculation of the discriminating function used to build the morphological index (Table 2.5). Excluding individual 36 and 80, the morphological hybrid index ranged from 0 to 0.175 for *R. blanda*, 0.214 to 0.653 for *F*₁s, and 0.690 to 1 for *R. rugosa* (Table 2.1; Fig 2.6). Unlike in the *K*-means analysis where it was classified as a *R. blanda*, individual 36 had a hybrid index of 0.288, placing it in the lower range of *F*₁s and thus supporting the results of the PCA and of the molecular analyses. However, individual 80 had a morphological hybrid index of 0.330, again in the lower range of the *F*₁ class, while its molecular status was pure *R. blanda* (Fig. 2.6). The molecular and morphological hybrid indices of the 12 putative

backcrosses and F₂ were largely concordant except for individual 199, which had a molecular hybrid index of 0.614 and a morphological hybrid index of 0.295, albeit both in the ranges of F₁s (Fig. 2.6). For all 161 individuals, the concordance between the molecular and morphological hybrid index was high as demonstrated by their significant positive correlation (Spearman $r = 0.940$, $p < 0.001$; Fig. 2.6).

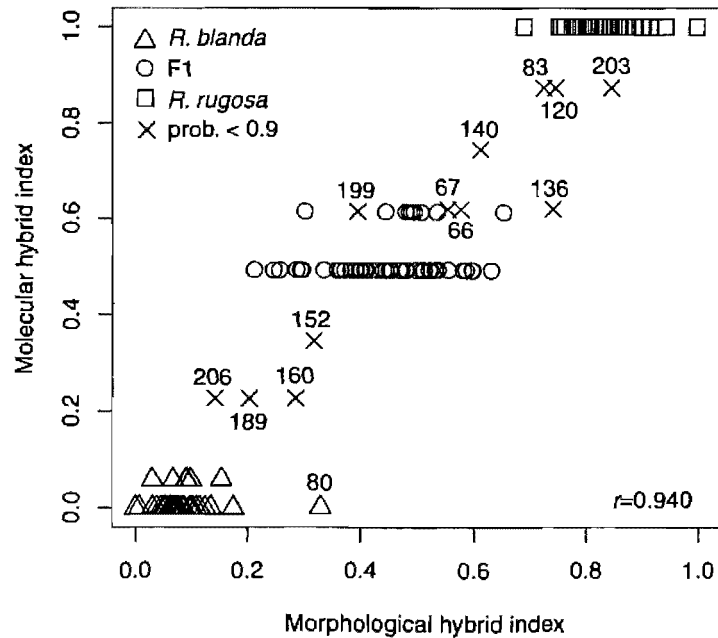


Figure 2.6 Plot of the morphological against molecular hybrid indices in the study of natural hybridization between *Rosa blanda* and *R. rugosa*. The symbol representing each individual is based on the molecular assignment in the NewHybrids analysis. The 12 putative second generation hybrids are shown by an \times and their number. Spearman r correlation coefficient is given.

2.5.3.4 Evidence for the presence of second generation hybrids

Among the twelve putative second generation hybrids in the Bayesian assignment test, four individuals (152, 160, 189, 206) shared their probabilities between *R. blanda*, backcross to *R. blanda*, or F₂. Their molecular hybrid index values (Table 2.1; Fig. 2.6), intermediate to F₁ hybrids and *R. blanda*, supported an assignment to the backcross class. This was not contradicted by their morphological index values (Table 2.1; Fig. 2.6), ranging between the higher values of pure *R. blanda* and the lower values

of F₁ hybrids. On the PCA (Fig. 2.5), these individuals indeed were found at the interface of pure *R. blanda* and F₁ hybrids. Five individuals (66, 67, 136, 140, 199) shared their probabilities between backcrosses to *R. rugosa*, F₁ and F₂ hybrids. Only individual 140, which had the highest posterior probability of being a backcross in NewHybrids, had a molecular hybrid index that was intermediate to the values of F₁s and *R. rugosa*, as would be expected of a backcross. The values of the remaining four individuals did not differ from lower values of F₁ hybrids. Morphologically, individual 199 had the hybrid index of a F₁, supporting the hypothesis that it is not a backcross but rather a first or second generation hybrid. It was homozygous for alternate species at three nuclear loci and heterozygote at a fourth, a pattern consistent with the F₂ hybrid hypothesis strongly supported in NewHybrids. Individuals 66, 67, 136 and 140 had morphological hybrid indices and positions along the first axis of the PCA that ranged between the higher values of F₁s and the lower values of *R. rugosa*, as would be expected from backcrosses. Finally, three individuals (83, 120, 203) had posterior probabilities indicating potential assignments to *R. rugosa*, F₂ hybrids and backcrosses to *R. rugosa*. Their molecular hybrid index values placed them as intermediate to but distinct from *R. rugosa* and hybrids. However, the morphological hybrid index of individual 120 and its position in the PCA was closer to pure *R. rugosa*. Given that it was collected in an allopatric *R. rugosa* population, its assignment to this class is more probable.

Therefore, among the 179 individuals sampled, molecular and morphological evidence established the presence of one F₂ hybrid, four backcrosses to *R. blanda*, and three to *R. rugosa*. Morphological characters also suggested three additional putative backcrosses to *R. rugosa*, but the lack of resolution of molecular markers could not rule out an assignment to the F₁ class for these individuals.

2.5.3.5 Canonical discriminant analyses

Forward, backward and stepwise selections of the variables with the stepdisc procedure all selected the same 11 variables (for which the coefficient is provided in

Table 2.5) in a discriminant analysis of *R. blanda*, *R. rugosa* and F₁s based on the molecular status of individuals. The three groups were statistically different in multivariate space ($\chi^2=231.8$, $p<0.001$). Only the first (97.39 %) and second (2.61 % of the total variance) discriminant axes were significantly discriminant (Fig. 2.7). However, since the groups mostly were separated on the first axis and since the second axis contributed little in explaining the variance, our interpretation was based solely on the coefficients of the first axis. The characters with the highest loadings on the first axis were, in decreasing order, gland density (GBLFT; -1.504) and secondary veins pubescence (P2VEIN; -1.309) on the abaxial leaflet epidermis, young wood prickles density (P1YW; -0.910), and adaxial leaf surface pubescence (PULFT; 0.895). The macroscopic characters sepal length (LSEP; -0.677) and auricle width (WAUR; -0.499) also contributed to a greater extent in the discriminant function. In a cross-validation of the function, all individuals were correctly classified in the group to which they were assigned in the molecular study.

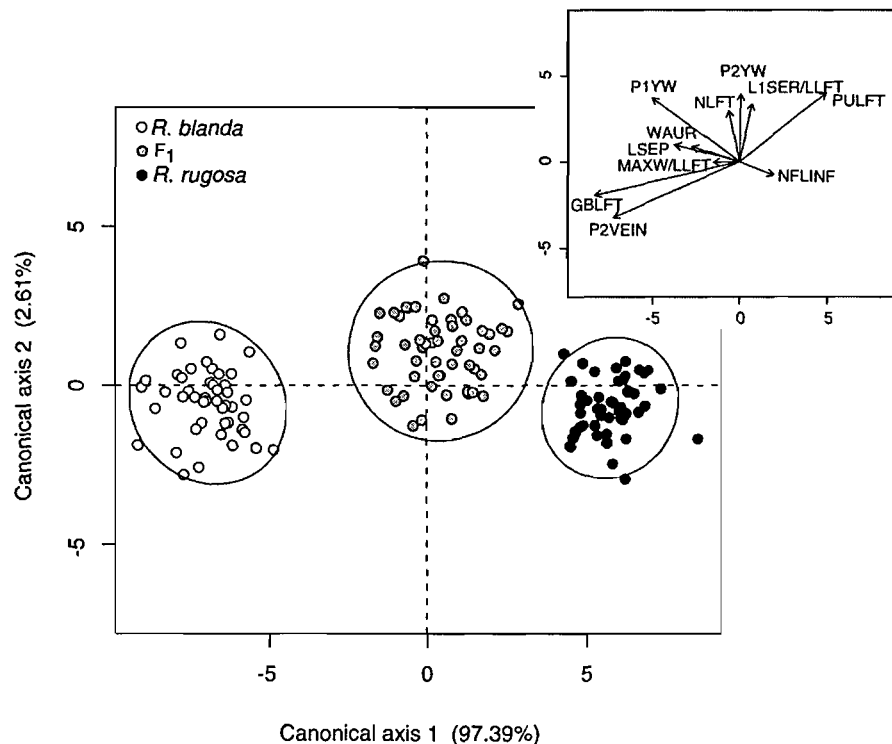


Figure 2.7 Canonical discriminant analysis of 11 morphological characters measured for 149 individuals in the study of natural hybridization between *Rosa blanda* and *R. rugosa*. Confidence ellipses (95 %) are shown around the groups. The vectors of the characters, scaled to one in multidimensional space, are displayed in the inset. The percentage of the variance is provided for each axis.

2.5.4 Pollen viability

Maximum pollen viability, as measured by the percentage of non-aborted (stained cytoplasm and full-size) pollen grains, was highly variable among individuals in both parents and hybrids. Pollen stainability ranged from 21.1 % to 94.5 % for *R. blanda*, 14.9 % to 97.9 % for *R. rugosa*, and 2.5 % to 86.6 % for F₁ hybrids (Table 2.5; Fig. 2.4). Although marginally higher, the pollen stainability of *R. blanda* was not statistically different from that of F₁ hybrids, their respective means being 56.0 and 44.8 %. However, *R. rugosa* exhibited a significantly lower rate of pollen abortion with a mean pollen stainability of 71.9 %.

2.6 Discussion

2.6.1 Use of morphological characters for detecting hybrids

Although morphological markers can be problematic for the identification of hybrids because of their environmental plasticity and unknown mode of expression (Carney et al., 2000; Hardig et al., 2000), most characters proved to be intermediate in our analysis of hybrids between *R. blanda* and *R. rugosa*. Intermediacy of morphological characters in hybrids is concordant with oligogenic or multigenic control hypothesis, as already deduced for stem armature in roses based on segregation ratios (Erlanson, 1937; Gudin, 2000; Crespel et al., 2002). In a review of 46 studies of morphological trait expression in hybrids, Rieseberg and Ellstrand (1993) reported that unlike here, only 45% of the morphological characters were intermediate, while 45% showed parental dominance and 10% were transgressive (see also McDade, 1990). Consequently, several studies have found that morphological characters do not allow adequate detection of hybrids (Carney et al., 2000; Hardig et al., 2000; Setoguchi and Watanabe, 2000; Tsukaya et al., 2003; Cattell and Karl, 2004), while morphology proved useful in other hybrid zones (Gallagher et al., 1997; Ishida et al., 2003; Little, 2004; Tovar-Sanchez and Oyama, 2004; Tsukaya, 2004). In the *R. rugosa* – *R. blanda* hybrid zone, the molecular and morphological datasets produced highly correlated hybrid indices and generally

identical assignation of F₁ hybrids and parental species classes. Conflict was apparent for individuals 36 and 80, but only in the *K*-means clustering analysis for the former. With an error rate of 1.12 %, morphology was a good predictor of the status of hybrids and therefore constituted a valid form of independent evidence for the identification of F₁ hybrids between *R. blanda* and *R. rugosa*.

Field monitoring of the hybrid zone as well as control of the invasive species and its hybrids requires appropriate identification of the latter. Other than prickly density, three of the four best characters identified in the canonical discriminant analysis of F₁ hybrids and their parents are density characters that require a dissecting scope for observation. However, glandular trichome density, prickliness, and other useful characters distinguishing *R. rugosa* and *R. blanda* are based on the presence of certain morphological structures in the former and their absence in the latter. For instance, *R. blanda* does not have glandular trichomes on the abaxial leaf surface while their density varies in hybrids and is high in *R. rugosa*. Used in combination, presence/absence characters allow the differentiation of most hybrids from their parents. Since hybrids generally exhibit intermediate densities in these characters, the distinction from *R. rugosa* is more problematic than from *R. blanda*. The only character present in *R. blanda* and to a lesser extent in the hybrids but absent from *R. rugosa* is adaxial leaf surface pubescence. Because some morphological segregants of *R. blanda* (i.e., *R. johannensis* Fern.) and their hybrids are glabrous, additional quantitative characters such as prickly density and auricle width should complement the identification. The reproductive characters sepal length and maximum width of the fruit also differ significantly between the classes. To avoid subjective scoring, we excluded some important qualitative characters that likely also would support the class assignments obtained with quantitative characters. Hybrids display thicker, more rugose leaves than *R. blanda*, but not as reticulate and shiny as those of *R. rugosa*. The abaxial leaf epidermis of *R. rugosa* is covered with white papillae; these are completely absent from *R. blanda* and are not very noticeable in the hybrids. The revolute margin of *R. rugosa* is generally not found in hybrids and never occurs in *R. blanda*.

Given the low number of putative introgressants and their uncertain status, we do not know whether the morphology would be powerful enough as a tool to clearly distinguish these classes with a few characters in the field. However, our results (Fig. 2.6) suggest that the morphological hybrid index of F_1 s and parents almost form a continuum that would prevent the detection of backcrosses with certainty. Moreover, later generation hybrids are known to be highly variable in the expression of morphological characters, which make their identification difficult (Rieseberg and Ellstrand, 1993). Because of their current rarity, backcrosses and F_2 hybrids should not create a high error rate in classification. Nevertheless, adequate monitoring of sympatric populations will require molecular tools because introgressants are an important determinant of the evolutionary consequences of hybridization.

2.6.2 Use of molecular markers for identifying hybrids

Boecklen and Howard (1997) showed that four or five diagnostic codominant markers should be enough to differentiate first generation backcrosses from F_1 hybrids. The use of allele-specific primers like those developed in this study has rarely been reported to document hybridization (see Rauscher et al., 2002). Because these markers only require PCR amplification and verification on agarose gel, they are both practical and economical while previous studies have demonstrated the high reliability of the MAMA-PCR technique (Cha et al., 1992; Rauscher et al., 2002). Here, after an initial screening of potential SNPs, three codominant markers proved species-specific and one almost diagnostic. However, the uncertainty related to parental and F_1 hybrid identification was high in the Hindex analysis (results not shown) and even higher for putative backcrosses in both NewHybrids and Hindex molecular analyses. In the analysis of NewHybrids (Fig. 2.3), only one individual could be assigned to a second generation of hybridization class with substantial support. Simulations have shown that a faulty assignment of backcrosses to parental classes is the most frequent type of error in analysis of hybrid zones using NewHybrids (Vähä and Primmer, 2006). Differentiating backcrosses from parents or F_1 s requires a larger number of markers than distinguishing F_1 s from parents, even if markers are highly specific (Boecklen and Howard, 1997;

Epifanio and Philipp, 1997; Vähä and Primmer, 2006). Sequencing of these putative backcrosses and F₂ hybrids restricted the probability that PCR errors generated the band patterns. Although we cannot rule out the possibility that incomplete lineage sorting has created the genotypic constitution found in putative backcrosses, concordant morphological characters provide additional support for their assignment to this class. Adding a few highly diagnostic markers might improve the resolution and robustness of our assignments.

2.6.3 Genetic structure of hybrid zone

2.6.3.1 Frequency of hybrids

Hybrids were found across the area of sympatry, in every mixed population surveyed. The apparent lack of prezygotic barriers between these species and their high interfertility (Ratsek et al., 1939) easily explain the abundance of first generation hybrids found in this study. The short two-weeks flowering period of *R. blanda* in June (Erlanson, 1930; Soper and Heimburger, 1982) overlaps with that of *R. rugosa*, which has recurrent blooming periods (Verrier, 1991; Bruun, 2005). Generalist insect pollinators have been observed on both species (Bruun, 2005; V. MacPhail, University of Guelph, unpubl. data) and may increase the likelihood of hybridization by preventing assortative mating (Carney et al., 1996; Levin et al., 1996; Campbell et al., 2003). Outcrossing in these two species (Ueda et al., 1996; V. MacPhail, unpubl. data) also facilitates hybridization by decreasing the competitive ability of intraspecific pollen (Levin et al., 1996; Carney et al., 2000; Bleeker, 2004). A drawback of our sampling strategy is that the proportion of hybrids found in our study probably is an overestimate of the hybridization rate because we deliberately sampled the greatest diversity of morphotypes. Yet, hybrids were frequent in these populations based on our results and on the morphological intermediacy of many individuals observed *in situ*.

Even though frequent, hybridization between these species remains localized rather than dispersed because it mostly concerns mixed populations. Generally, no trace

of interspecific gene flow was detected in single-species populations. In only two hybrid populations (St-Roch-des-Aulnaies, Québec, Canada and Belledune, New Brunswick, Canada) was one of the parental species, *R. rugosa*, absent. In both populations, all individuals sampled all had the chloroplast markers of *R. blanda*. Because in both cases the population was near a roadside, gene flow could have occurred from cultivated *R. rugosa*, though none was observed at the time of sampling. It is also possible that pure *R. rugosa* once present had disappeared or been locally assimilated in hybrids. The absence of dispersed introgression most likely results from the restricted pollen and seed dispersal between populations combined with the short period since the first contact between the species. Environmental selection is probably not an important factor in maintaining the integrity of pure *R. blanda* populations near mixed-species populations because sites generally offered similar conditions.

2.6.3.2 Weak introgression

Molecular and morphological evidence indicate weak bilateral introgression between *R. blanda* and *R. rugosa*. The pattern found here, in which F₁ hybrids dominate the hybrid classes, is contrary to the situation frequently observed in other hybrid zones where reproductive barriers render the formation of F₁ hybrids infrequent (e.g., Carney et al., 1996; Jiggins and Mallet, 2000; Broyles, 2002; Cattell and Karl, 2004). Generally, once formed, these rare F₁ hybrids act as catalysts for the formation of abundant backcrosses, which are more easily produced than F₁s (Arnold and Bennett, 1993; Hodges et al., 1996; Emms and Arnold, 2000). Though less common, other hybrid zones are mostly restricted to F₁s because of sterility barriers in the latter, hybrid breakdown or ecological barriers (e.g., Nason et al., 1992; Ferguson et al., 1999; Milne et al., 2003; Moccia et al., 2007).

The pattern of abundant hybridization and the low rates of introgression between *R. rugosa* and *R. blanda* may be explained by the recent formation of the hybrid zone not yet having reached its maturity. The earliest herbarium specimens of *R. rugosa* from the province of Québec date from 1920 (DAO, cultivated) and 1931 (DAO, probably

escaped). Marie-Victorin (1935) and Scoggan (1950) reported it as escaped from cultivation in Québec in the Bic region, where mixed populations are currently found. We expect the evolution of the hybrid zone to be slower in long-lived shrubs than in annuals like sunflowers (Carney et al., 2000) because of the reduced number of generations since the time of contact. The clonal growth of *R. rugosa* also could slow the turnover of individuals and restrict the implantation of hybrids. For instance, in black oaks, competition between later generation hybrids and parents apparently prevents the establishment of introgressants and restricts the hybrid zone to the presence of F₁ hybrids (Nason et al., 1992).

Alternatively, a low fitness of F₁ hybrids because of postzygotic reproductive barriers could prevent the formation of backcrosses. Although we do not have complete information about the relative fitnesses of the different classes, we observed that F₁ hybrids displayed normal growth in the field, an indication that their vegetative fitness does not seem to be impaired. However, a thorough comparison of the relative fitness of hybrids would require reciprocal transplant experiments (e.g., Vilà and D'Antonio, 1998a; Johnston et al., 2003; Campbell and Waser, 2007). In addition, hybrids between *R. blanda* and *R. rugosa* are male fertile, as indicated by pollen viability counts (Table 2.5; Fig. 2.4). However, variability in pollen size and the presence of large, apparently unreduced pollen grains also was observed in hybrids, possibly indicating anomalies in meiosis (El Mokadem et al., 2002; Crespel and Gudin, 2003; Crespel et al., 2006; Suehs et al., 2006). Although not formerly evaluated, hybrids likely are not female sterile because we observed apparently normal fruit and seed set in the field. Even if F₁ hybrids are fully or partially fertile, hybrid breakdown could still occur in later generations, increasing the mortality of backcrosses and F₂S and explaining their scarcity in the hybrid populations studied.

2.6.3.3 Direction of hybridization and introgression

Although *R. blanda* is more abundant on a regional basis, many mixed populations visited showed a higher proportion of *R. rugosa*, which often occurred in

dense colonies. Even though hybrids will represent a greater proportion of the progeny of *R. blanda* than that of *R. rugosa* in such populations where *R. rugosa* predominates, the first generation hybrids should have both maternal parents in equal proportion in the absence of assortative mating. However, *R. rugosa* was found to be the maternal parent of most first generation hybrids. This also is unexpected given the results of reciprocal pollination experiments by Ratsek et al. (1939), where crosses in which *R. blanda* acted as the maternal parent yielded 115% more seeds than open-pollinated ones, while the reciprocal crosses yielded 69% of the seeds obtained from open-pollinated *R. rugosa*. These results suggested a potential for asymmetric hybridization towards the more fertile *R. blanda*, whereas the opposite was found here.

In addition to sampling bias, mechanisms involved in asymmetrical reproductive barriers are known to affect the direction of hybridization. Pollinator behavior can affect the direction of interspecific gene flow (e.g., Campbell et al., 1998, 2002b; Emms and Arnold, 2000). *Rosa rugosa* produces bigger flowers on taller shrubs, in dense patches, probably making it more attractive to pollinators and potentially affecting their visitation patterns (Emms and Arnold, 2000; Broyles, 2002; Suehs et al., 2006). Post-pollination mechanisms such as pollen competition, selective pollen-tube attrition or embryo abortion also could explain the directionality of hybridization (Carney et al., 1994; 1996), although pollen competition experiments have shown that *R. rugosa* pollen grows faster than heterospecific pollen on *R. rugosa* stigmas (Fagerlind, 1944 in Bruun, 2005). In addition, because *R. rugosa* is a strict outcrosser (Ueda et al., 1996) whereas *R. blanda* is able of self-fertilization (V. MacPhail, unpubl. data), their reproductive biology could increase hybridization rates in *R. rugosa* relative to *R. blanda* and explain the asymmetry observed at the first generation and potentially at later generations (Ferguson et al., 1999). Additional post-zygotic mechanisms such as cytonuclear incompatibilities (Tiffin et al., 2001) or maternal effects favouring one type of F₁ over the other (Campbell and Waser, 2001; Burgess and Husband, 2004; Kirk et al., 2005) could also be involved. If the two F₁ types differ in survival and fertility, their relative abundance could affect the potential for introgression (Ferguson et al., 1999).

2.6.4 Conservation implications of the hybridization between *Rosa rugosa* and *R. blanda*

2.6.4.1 Evolutionary consequences for *Rosa blanda*

Hybridization with introduced species may have important evolutionary and ecological implications affecting the integrity and survival of native species. Firstly, repeated backcrossings may cause genetic assimilation of a species (Rieseberg, 1991b; Levin et al., 1996; Rhymer and Simberloff, 1996). Asymmetrical factors such as numerical superiority or reproductive output of the introduced taxon (e.g., Nason et al., 1992; Anttila et al., 1998; Carney et al., 2000; Burgess et al., 2005) or unequal reproductive barriers, combined with a lack of assortative mating, can lead to the rapid loss of a native species (Levin, 1975; Huxel, 1999; Epifanio and Philipp, 2001; Wolf et al., 2001). Because of its greater height, showier flowers and local abundance and density in mixed populations, *R. rugosa* likely is more conspicuous to pollinators and has a higher effective gamete representation. Even though it is less abundant than *R. blanda* on a regional scale, these factors would promote backcrossing towards *R. rugosa* and the consequent genetic assimilation of the *R. blanda* in mixed populations (Burgess et al., 2005). Moreover, clonal growth in *R. rugosa* could both favour its long-term persistence in the face of introgression and increase the likelihood of hybridization with *R. blanda* (Cattell and Karl, 2004; Vanden Broeck et al., 2005).

Even if the threat of assimilation appears to be presently limited to populations along the St. Lawrence River estuary, these populations harbour a significant part of the genetic diversity and contribute to the wide ecological tolerance of *R. blanda*. Mixed populations of *R. blanda* and *R. rugosa* are concentrated along the coast, which offers different environmental conditions than found in the rest of the range of *R. blanda*. Several controversial segregants of *R. blanda* have been named based on the great morphological variability of leaf pubescence, sepal, fruit and stipule characters (Fernald, 1918; Rydberg, 1918; Erlanson, 1934; Scoggan, 1978). Among them, the St. Lawrence endemics *R. rousseauiorum* Boivin and *R. williamsii* Fern., once of particular

conservation status in Québec, both have been shown to be invalid taxonomic species (Bruneau et al., 2005). However, their ecological and morphological characteristics still confer them a distinctiveness that deserves conservation, particularly the *R. williamsii* ecotype which prefers more saline or calcareous habitats, has glandular sepals and exhibits a smaller stature than typical *R. blanda* (Fernald, 1918; Erlanson, 1934).

Hybridization with an introduced plant such as *R. rugosa* has other potential consequences for the native *R. blanda*. Alleles from introduced or cultivated species are often misadaptive in wild populations (de Wet and Harlan, 1975; Ellstrand et al., 1999; Haygood et al., 2003) and the replacement of locally adapted alleles or genotypes may cause outbreeding depression in the native species (Rieseberg, 1991b; Levin et al., 1996; Rhymer and Simberloff, 1996; Allendorf et al., 2001). If the immigration rate is important, the replacement of locally adapted alleles could occur even if introduced alleles have a negative selection coefficient. In addition, because of founder effect, the genetic diversity of cultivated plants like *R. rugosa* material is often narrow (Ellstrand et al., 1999). Hence, abundant gene flow to *R. blanda* could result in a decrease of neutral genetic diversity, limiting its future evolutionary potential.

2.6.4.2 Ecological consequences of hybridization between *Rosa blanda* and *R. rugosa*

Heterosis and evolutionary novelty in hybrids between native and introduced species or between two exotic species have favoured their invasiveness in many hybrid zones (reviewed by Ellstrand et al., 1999; Ellstrand and Schierenbeck, 2000; Abbott et al., 2003; Ellstrand, 2003; e.g., O'Hanlon et al., 1999; Milne and Abbott, 2000; Bleeker, 2003). Although *R. rugosa* is an outcrosser (Ueda et al., 1996), the founder effect related to its introduction from a limited stock is also expected to cause some degree of inbreeding depression. Release from this condition by hybridization with *R. blanda*, combined to new allelic and genotypic variation produced by recombination, could contribute to a boost in fitness in the hybrids (Ellstrand and Schierenbeck, 2000; Hails and Morley, 2005; Rhode and Cruzan, 2005). Fixation of heterozygosity in hybrids through clonal reproduction as in *R. rugosa* or through allopolyploidy and apomixis, two

processes known to occur in the genus *Rosa* (Werlemark and Nybom, 2001; Joly et al., 2006), could allow the long-term persistence of such aggressive hybrid genotypes (Grant, 1981; Abbott, 1992; Ellstrand and Schierenbeck, 2000; Moody and Les, 2002).

Several other traits could increase the competitive abilities of hybrids relative to *R. blanda*. This might occur if hybrid genotypes exhibited both the high resistance and vegetative vigour of *R. rugosa* and the larger ecological tolerance and local adaptations of *R. blanda*. Seawater and various bird species are the main dispersal agents of *R. rugosa* allowing invasion of new territory (Bruun, 2005). Because hybrids display both seed buoyancy (Lewis and Basye, 1961) and abundant, conspicuous and fleshy fruits, they could colonize new coastal habitats and be more attractive to dispersal agents than the small fruits of *R. blanda* (e.g., Vilà and D'Antonio, 1998a). The strong suckering habit of *R. rugosa* quickly forms large impenetrable thickets that competitively exclude most native dune scrub and dry coastal vegetation in its introduced European range (Isermann, 2003; Bruun, 2005; Weidema, 2006; Kollmann et al., 2007) and in North America as well, based on our observations. If this aggressive growth form is transmitted to hybrids, *R. blanda* and other native species would suffer an even more important competition in these populations. The vigorous growth of hybrids between native and introduced species already threaten the vegetation communities of estuary or open coastal ecosystems elsewhere in North America (Vilà and D'Antonio, 1998b; Ayres et al., 1999, 2004). In Québec, one of the largest mixed populations was found in the Bic National Park, which is a refuge for many rare species (Scoggan, 1950). Measures of relative hybrid fitness and niche overlap with *R. blanda* in various natural habitats where the parents are found are necessary to verify whether the hybrids between *R. blanda* and *R. rugosa* would become an ecological threat to these habitats.

Many invasive taxa recently have been shown to be cryptic hybrids between two introduced species or differentiated genotypes (Milne and Abbott, 2000; Schaal et al., 2003), or between an introduced and a native species (Moody and Les, 2002; see also Ellstrand and Schierenbeck, 2000). Because *R. rugosa* has been introduced repeatedly

and under different forms (including hybrids of unknown parentage) in Europe (Bruun, 2005), is fertile with most rose diploid species (Ratsek et al., 1939), and has been frequently used in ornamental breeding programs (Verrier, 1991), it was possible that a similar scenario could have contributed to its invasiveness in its introduced range. Hybridization has been invoked as one of the hypothesis explaining the success of *R. rugosa* in Europe (Bruun, 2006), but the sequences of *R. rugosa* material obtained in this study showed that this is not the case in North America.

2.6.4.3 Likelihood of hybridization between *Rosa rugosa* and other native roses

The invasive *R. rugosa* hybridizes spontaneously with a few native species in Europe (Bruun, 2005). Hybridization with other North American species also is probable because most rose diploids are interfertile (Ratsek et al., 1939; Ratsek et al., 1940; Lewis and Basye, 1961). Although we have observed *R. rugosa* growing with the exotic *R. multiflora* along the Atlantic Coast, no morphologically intermediate individual was found. The two species hybridize in their native range (Ohwi, 1965), but their hybrid is apparently sterile (Ratsek et al., 1939; Lewis and Basye, 1961). Other than *R. virginiana*, a tetraploid species found along seashores in eastern North America, we observed no other indigenous rose species growing in sympatry with *R. rugosa*. Hybridization with *R. virginiana* would result in triploids, rarely reported in roses and generally highly sterile (Erlanson, 1929; 1931; 1934), as it is the case for their artificial hybrid (Erlanson, 1937). Although crosses involving pollen from *R. rugosa* and ovules from the diploids *R. palustris* or *R. nitida* yield respectively semi-fertile and highly sterile F₁s (Erlanson, 1931; 1934), it is likely that differences in habitat requirements would make hybridization with other indigenous rose less likely for *R. rugosa* than with *R. blanda*. *Rosa nitida* and *R. palustris* are mostly found in wetlands or bogs (Joly et al., 2006), habitats unsuitable to *R. rugosa* that prefers mesic to dry soils (Schlätzer, 1974).

2.6.5 Conclusion

Rosa blanda and *R. rugosa* are one further example of interfertile North American - East Asian disjuncts, which present a high potential for hybridization when put into contact because of their low ecological and genetic divergence (Wen, 1999; Burgess and Husband, 2006). Many hybrids between these two species were found in mixed populations and low rates of introgression were detected. This hybridization could locally threaten the integrity of native *R. blanda* populations and have important ecological impacts on the dry coastal ecosystem of the estuary. In European dunes, the establishment of *R. rugosa* appears limited by seed production and predation rather than habitat differentiation (Kollmann et al., 2007). If *R. rugosa* is mostly limited by seed production in North America as well, it is possible that its range is still under expansion, increasing chances for the formation of hybrid populations in the future. Our analyses demonstrate that the issue of interfertility with indigenous species should be considered before introducing ornamental species. Exotic species are not only threatening local biodiversity by competition or predation, but they also can affect their genetic and morphological integrity. Because anthropogenic causes of hybridization like habitat modification and species movement will amplify with the increase of human population and mobility, hybridization is likely to take an even greater place as a conservation issue in the future.

CHAPITRE 3

Conclusion

Ce mémoire a discuté l'hybridation entre le rosier inerme indigène *Rosa blanda* (Rosaceae) et le rosier rugueux introduit *R. rugosa*. Le chapitre 1 avait pour objet l'étude des impacts de l'hybridation anthropique sur la flore indigène, en lumière des évidences théoriques et empiriques rapportées dans la littérature. L'humain augmente les taux d'hybridation de deux manières, d'abord en perturbant le milieu naturel mais surtout en introduisant des espèces interfertiles avec un ou plusieurs congénères indigènes. Le cas de *R. blanda* et *R. rugosa*, examiné au chapitre 2, en est un exemple. Les principales conséquences négatives pour la biodiversité locale qui peuvent découler de l'hybridation sont l'assimilation génétique, la dépression due à des croisements distants, une réduction de la diversité génétique et la création d'hybrides envahissants ou plus compétitifs que le parent indigène.

Le rosier rugueux, une espèce ornementale asiatique introduite en Amérique du Nord au milieu du XIX^e siècle, se retrouve dans plusieurs populations mixtes avec le rosier inerme le long de l'estuaire du Fleuve St-Laurent. Le principal objectif de cette étude était de documenter l'hybridation entre ces espèces, d'en évaluer l'étendue géographique et surtout la structure génétique. À cette fin, un échantillonnage à travers l'aire de sympatrie a permis de localiser plusieurs populations contenant des hybrides putatifs entre l'île d'Orléans, Québec et Belledune, Nouveau-Brunswick. Des marqueurs moléculaires simples d'utilisation et économiques ont été développés à partir de SNP diagnostiques pour génotyper les individus récoltés à quatre locus nucléaires et un chloroplastique. Les données moléculaires ont été analysées par un test d'assignation bayésien et un indice hybride moléculaire. Les résultats ont montré une hybridation fréquente entre ces espèces, tant au niveau géographique que génétique. En effet, des hybrides F₁ ont été trouvés dans chacune des populations mixtes visitées. Il existe donc

peu de barrières prézygotiques entre ces espèces, puisque l'hybridation se produit chaque fois qu'elles sont mises en contact.

Toutefois, malgré le nombre élevé de F_1 , l'étendue génétique de l'hybridation est limitée. Nonobstant un manque de résolution des marqueurs moléculaires pour les générations avancées d'hybridation, l'introggression semble restreinte car peu de F_2 ou de rétrocroisements ont été détectés. Deux premières explications de ce phénomène sont une stérilité réduite des F_1 et/ou une mortalité élevée des générations avancées. L'examen du taux de viabilité du pollen hybride et la production de graines apparemment normales chez les F_1 réfutent la première alors que les données disponibles ne permettent pas de valider la seconde. Une alternative plausible est que la zone hybride est à un stade précoce de son évolution. Étant donné la longévité des rosiers et la reproduction clonale du rosier rugueux, il est probable que le remplacement d'individus se fait à un taux faible, ce qui contribuerait à la rareté des introgressants. Cette hybridation, autant à la première génération qu'à la deuxième, est bidirectionnelle. Cependant, le rosier rugueux semble servir de parent maternel dans la plupart des croisements. Il est possible que l'auto-incompatibilité stricte du rosier rugueux, plus relâchée chez le rosier inerme, en soit responsable.

Répondant à un objectif auxiliaire, le séquençage requis pour développer marqueurs moléculaires a montré que les séquences de rosier rugueux nord-américains étaient identiques aux séquences de rosier rugueux récoltés dans l'aire d'origine. Contrairement à d'autres espèces introduites, le caractère envahissant du rosier rugueux ne provient donc pas d'une hybridation cryptique précédant sa naturalisation.

Un autre objectif était d'évaluer si les caractères morphologiques permettaient une détection adéquate des hybrides et, le cas échéant, de dégager les caractères les plus utiles pour assurer le suivi de la zone hybride sur le terrain. À cette fin, 17 caractères morphologiques ont été mesurés sur 161 individus ainsi que cinq caractères de fruits sur un nombre restreint d'individus. Les données morphologiques ont été traitées par des analyses de variance (ANOVA), en composantes principales, de groupement K -means et

des analyses discriminantes. Un indice hybride morphologique a également été élaboré. Les résultats de ces analyses étaient largement concordants avec ceux des analyses moléculaires et ont montré que la plupart des caractères mesurés sont intermédiaires chez les hybrides F_1 . Les caractères morphologiques constituent donc une évidence indépendante valide pour identifier les parents et les F_1 . La présence d'épines sur le bois jeune et de glandes sur la surface foliaire abaxiale distinguent l'hybride du rosier inerme, alors que la pubescence de la surface foliaire adaxiale, le caractère mat de cette dernière et la marge non-enroulée des feuilles différencient l'hybride du rosier rugueux. La longueur des sépales, la largeur des stipules ainsi que la largeur des fruits permettent de compléter l'identification en cas de doutes. La présence occasionnelle de rétrocroisements dans certaines populations pourrait néanmoins requérir l'usage des outils moléculaires développés dans cette étude.

Un dernier objectif était d'évaluer les conséquences potentielles de cette hybridation pour les deux parents, telles que discutées au premier chapitre. Pour cela, nous disposons de l'information récoltée sur la structure génétique de la zone hybride et l'aptitude reproductive male des hybrides par rapport à leur parent. Le faible taux d'introggression actuel montre que le risque d'assimilation génétique est très restreint pour le moment. Cependant, si ce taux augmente avec l'évolution de la zone hybride en formation, le risque d'assimilation génétique locale du rosier inerme s'élèverait dans les populations mixtes. Il faudrait donc effectuer des transplantations réciproques pour déterminer si la rareté des introgressants provient en effet de l'immaturité de la zone hybride ou si une mortalité élevée des générations avancées en est aussi la cause. Estimer l'aptitude relative des hybrides et rétrocroisements par rapport à leurs parents ainsi qu'évaluer le degré de chevauchement de leurs niches écologiques permettrait également de mieux cerner si l'hybridation crée une menace écologique pour le rosier inerme ou les habitats côtiers de l'estuaire. Avec ces informations, on serait davantage en mesure d'évaluer plus finement les conséquences évolutives et écologiques de l'hybridation entre le rosier rugueux et le rosier inerme.

3.1 Recommandations pour la gestion du rosier rugueux et des hybrides

Parce que la zone hybride est jusqu'à présent presque exclusivement restreinte à la première génération d'hybridation, la suppression du rosier rugueux introduit et des hybrides est une mesure appropriée. Ce serait facilité par la possibilité de distinguer les hybrides F_1 des parents sur le terrain en utilisant les caractères morphologiques mentionnés plus haut. Cependant, le contrôle du rosier rugueux demeure une initiative complexe à cause de sa grande résistance et de son caractère stolonifère (Bruun, 2005; Weidema, 2006). Les brûlis contrôlés, le fauchage et le contrôle chimique peuvent parfois réduire la croissance à court terme mais ne parviennent souvent qu'à stimuler la croissance du plant à plus long terme. Une application de glyphosate en fin d'été semble cependant parvenir à affecter également les racines. L'excavation des rhizomes est coûteuse et a un lourd impact sur l'habitat puisque les racines atteignent parfois une profondeur de deux mètres (Schlätzer, 1974). Cela pourrait aussi conduire par inadvertance à la propagation végétative par boutures de racines si des fragments demeurent dans le sol. Il est probable que les hybrides montrent un degré quelconque des caractéristiques qui rendent le contrôle du rosier rugueux problématique. Les perspectives pour le biocontrôle semblent restreintes puisque peu d'insectes monophages se nourrissent du rosier rugueux et que ce dernier est généralement plus résistant que les autres espèces de roses (Bruun, 2006).

Il appert donc que la façon la plus efficace d'empêcher l'introgession est d'éviter la plantation de rosiers rugueux dans les habitats où il tend à s'échapper et s'hybride avec le rosier inerme. Cela concerne surtout la région côtière de l'estuaire du St-Laurent, où les populations mixtes sont fréquentes. Il est difficile d'estimer la distance d'isolation appropriée pour empêcher l'hybridation chez les roses interfertiles. En utilisant des cultivars auto-incompatibles, Debener et al. (2003) ont montré qu'une séparation de 250 mètres n'est pas suffisante pour empêcher le flux génique. Chez les tournesols, également pollinisés par les insectes, un flux génique interspécifique a été détecté jusqu'à plus de 1000 mètres de la population source (Arias and Rieseberg, 1994). La prévention des perturbations d'habitat peut aussi aider à contrôler la naturalisation du

rosier rugueux puisque les perturbations facilitent son établissement (Kollmann et al., 2007). En conclusion, il est nécessaire de déterminer le potentiel de naturalisation des hybrides horticoles du rosier rugueux, dont la populaire série «Explorateurs», et de vérifier leur interfertilité avec le rosier inerme.

Bibliographie

- Abbott, R. J. 1992. Plant invasions, interspecific hybridization and the evolution of new plant taxa. *Trends in Ecology and Evolution* 7:401-405.
- Abbott, R. J., J. K. James, R. I. Milne, and A. C. M. Gillies. 2003. Plant introductions, hybridization and gene flow. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences* 358:1123-1132.
- Albert, M. E., C. M. D'Antonio, and K. A. Schierenbeck. 1997. Hybridization and introgression in *Carpobrotus* spp. (Aizoaceae) in California. I. Morphological evidence. *American Journal of Botany* 84:896-904.
- Alexander, M. P. 1969. Differential staining of aborted and nonaborted pollen. *Stain Technology* 44:117-122.
- Alexander, M. P. 1980. A versatile stain for pollen, fungi, yeast, and bacteria. *Stain Technology* 55:13-18.
- Allendorf, F. W., R. F. Leary, P. Spruell, and J. K. Wenburg. 2001. The problems with hybrids: setting conservation guidelines. *Trends in Ecology and Evolution* 16:613-622.
- Anderson, E. 1948. Hybridization of the habitat. *Evolution* 2:1-9.
- Anderson, E. C. 1949. *Introgressive hybridization*. John Wiley & Sons, New York.
- Anderson, E., and L. Hubricht. 1938. Hybridization in *Tradescantia*. III. The evidence for introgressive hybridization. *American Journal of Botany* 25:396-402.
- Anderson, E. C., and G. L. J. Stebbins. 1954. Hybridization as an evolutionary stimulus. *Evolution* 8:378-388.
- Anderson, E. C., and E. A. Thompson. 2002. A model-based method for identifying species hybrids using multilocus genetic data. *Genetics* 160:1217-1229.
- Anttila, C. K., C. C. Daehler, N. E. Rank, and D. R. Strong. 1998. Greater male fitness of a rare invader (*Spartina alterniflora*, Poaceae) threatens a common native (*Spartina foliosa*) with hybridization. *American Journal of Botany* 85:1597-1601.
- Arias, D. M., and L. H. Rieseberg. 1994. Gene flow between cultivated and wild sunflowers. *Theoretical and Applied Genetics* 89:655-660.

- Arnold, J. 1993. Cytonuclear disequilibria in hybrid zones. *Annual Review of Ecology and Systematics* 24:521-554.
- Arnold, M. L. 1997. *Natural hybridization and evolution*. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Arnold, M. L. 2004. Transfer and origin of adaptations through natural hybridization: were Anderson and Stebbins right? *The Plant Cell* 16:562-570.
- Arnold, M. L., and B. D. Bennett. 1993. Natural hybridization in Louisiana irises: genetic variation and ecological determinants. *In* R. G. Harrison [ed.], *Hybrid zones and the evolutionary process*, 115-139. Oxford University Press.
- Arnold, M. L., B. D. Bennett, and E. A. Zimmer. 1990. Natural hybridization between *Iris fulva* and *Iris hexagona*: pattern of ribosomal DNA variation. *Evolution* 44:1512-1521.
- Arnold, M. L., A. C. Bouck, and R. S. Cornman. 2003. Verne Grant and Louisiana irises: Is there anything new under the sun? *New Phytologist* 161:143-149.
- Arnold, M. L., C. M. Buckner, and J. J. Robinson. 1991. Pollen-mediated introgression and hybrid speciation in Louisiana irises. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States* 88:1398-1402.
- Arnold, M. L., M. R. Bulger, J. M. Burke, A. L. Hempel, and J. H. Williams. 1999. Natural hybridization: how low can you go and still be important? *Ecology* 80:371-381.
- Arnold, M. L., and S. A. Hodges. 1995. Are natural hybrids fit or unfit relative to their parents. *Trends in Ecology and Evolution* 10:67-71.
- Arnold, M. L., E. D. Kentner, J. A. Johnston, S. Cornman, and A. Bouck. 2001. Natural hybridisation and fitness. *Taxon* 50:93-104.
- Avise, J. C., P. C. Pierce, M. J. Van Den Avyle, M. H. Smith, W. S. Nelson, and M. A. Asmussen. 1997. Cytonuclear introgressive swamping and species turnover of bass after an introduction. *Journal of Heredity* 88:14-20.
- Ayres, D. R., D. Garcia-Rossi, H. G. Davis, and D. R. Strong. 1999. Extent and degree of hybridization between exotic (*Spartina alterniflora*) and native (*S. foliosa*) cordgrass (Poaceae) in California, U.S.A. determined by random amplified polymorphic DNA (RAPDs). *Molecular Ecology* 8:1179-1186.

- Ayres, D. R., D. L. Smith, K. Zaremba, S. Klohr, and D. R. Strong. 2004. Spread of exotic cordgrasses and hybrids (*Spartina* sp.) in the tidal marshes of San Francisco Bay, California, U.S.A.. *Biological Invasions* 6:221-231.
- Bacilieri, R., A. Ducouso, R. J. Petit, and A. Kremer. 1996. Mating system and asymmetric hybridization in a mixed stand of European oaks. *Evolution* 50:900-908.
- Barbour, R. C., B. M. Potts, and R. E. Vaillancourt. 2006. Gene flow between introduced and native *Eucalyptus* species: Early-age selection limits invasive capacity of exotic *E. ovata* X *nitens* F₁ hybrids. *Forest Ecology and Management* 228:206-214.
- Barbour, R. C., B. M. Potts, R. E. Vaillancourt, W. N. Tibbits, and R. J. E. Wiltshire. 2002. Gene flow between introduced and native *Eucalyptus* species. *New Forests* 23:177-191.
- Barton, N. H., and G. M. Hewitt. 1985. Analysis of hybrid zones. *Annual Review of Ecology and Systematics* 16:113-148.
- Beebe, S., O. Toro Ch., A. V. Gonzalez, M. I. Chacon, and D. G. Debouck. 1997. Wild-weed-crop complexes of common bean (*Phaseolus vulgaris* L., Fabaceae) in the Andes of Peru and Columbia, and their implications for conservation and breeding. *Genetic Resources and Crop Evolution* 44:73-91.
- Belcher, C. R. 1977. Effect of sand cover on the survival and vigor of *Rosa rugosa* Thunb. *International Journal of Biometeorology* 21:276-280.
- Bicknell, E. P. 1911. The ferns and flowering plants of Nantucket - VIII Rosaceae (continued). *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 38:447-460.
- Bleeker, W. 2003. Hybridization and *Rorippa austriaca* invasion in Germany. *Molecular Ecology* 2003:1831-1841.
- Bleeker, W. 2004. Genetic variation and self-incompatibility within and outside a *Rorippa* hybrid zone (Brassicaceae). *Plant Systematics and Evolution* 246:35-44.
- Bleeker, W., and H. Hurka. 2001. Introgressive hybridization in *Rorippa* (Brassicaceae): gene flow and its consequences in natural and anthropogenic habitats. *Molecular Ecology* 10:2013-2022.

- Boecklen, W. J., and D. J. Howard. 1997. Genetic analysis of hybrid zones: numbers of markers and power of resolution. *Ecology* 78:2611-2616.
- Boivin, B. 1945. Notes sur le genre *Rosa* dans le Québec. *Le Naturaliste Canadien* 72:225-228.
- Brock, M. T. 2004. The potential for genetic assimilation of a native dandelion species, *Taraxacum ceratophorum* (Asteraceae), by the exotic congener *T. officinale*. *American Journal of Botany* 91:656-663.
- Broyles, S. B. 2002. Hybrid bridges to gene flow: a case study in milkweeds (*Asclepias*). *Evolution* 56:1943-1953.
- Bruneau, A., S. Joly, J. R. Starr, and J.-N. Drouin. 2005. Molecular markers indicate that the narrow Québec endemics, *Rosa rousseauiorum* and *R. williamsii*, are synonymous with the widespread *R. blanda*. *Canadian Journal of Botany* 83:386-398.
- Bruneau, A., J. R. Starr, and S. Joly. 2007. Phylogenetic relationships in the genus *Rosa*: new evidence from chloroplast DNA sequences and an appraisal of current knowledge. *Systematic Botany* 32:366-378.
- Bruun, H. H. 2005. Biological flora of the British Isles. No. 239. *Rosa rugosa* Thunb. ex Murray. *Journal of Ecology* 93:441-470.
- Bruun, H. H. 2006. Prospects for biocontrol of invasive *Rosa rugosa*. *BioControl* 51:141-181.
- Buerkle, C. A. 2005. Maximum-likelihood estimation of a hybrid index based on molecular markers. *Molecular Ecology Notes* 5:684-687.
- Buerkle, C. A., D. E. Wolf, and L. H. Rieseberg. 2003. The origin and extinction of species through hybridization. In C. A. Bringham, and M. W. Schwartz [eds.], *Population viability analysis in plants. Conservation, management and modeling of rare plants*, 117-141. Springer-Verlag, Berlin.
- Burgess, K. S., and B. C. Husband. 2004. Maternal and paternal contributions to the fitness of hybrids between red and white mulberry (*Morus*, Moraceae). *American Journal of Botany* 91:1802-1808.

- Burgess, K. S., and B. C. Husband. 2006. Habitat differentiation and the ecological costs of hybridization: the effects of introduced mulberry (*Morus alba*) on a native congener (*M. rubra*). *Journal of Ecology* 94:1061-1069.
- Burgess, K. S., M. Morgan, L. Deverno, and B. C. Husband. 2005. Asymmetrical introgression between two *Morus* species (*M. alba*, *M. rubra*) that differ in abundance. *Molecular Ecology* 14:3471-3483.
- Burke, J. M., and M. L. Arnold. 2001. Genetics and the fitness of hybrids. *Annual Review of Genetics* 35:31-52.
- Burke, J. M., T. Voss, and M. L. Arnold. 1998. Genetic interactions and natural selection in Louisiana iris hybrids. *Evolution* 52:1304-1310.
- Campbell, D. R., R. Alarcòn, and C. A. Wu. 2003. Reproductive isolation and hybrid pollen disadvantage in *Ipomopsis*. *Journal of Evolutionary Biology* 16:536-540.
- Campbell, D. R., M. Crawford, A. K. Brody, and T. A. Forbis. 2002a. Resistance to pre-dispersal seed predators in a natural hybrid zone. *Oecologia* 131:436-443.
- Campbell, D. R., C. Galen, and C. A. Wu. 2005. Ecophysiology of first and second generation hybrids in a natural plant hybrid zone. *Oecologia* 144:214-225.
- Campbell, D. R., and N. M. Waser. 2001. Genotype-by-environment interaction and the fitness of plant hybrids in the wild. *Evolution* 55:669-676.
- Campbell, D. R., and N. M. Waser. 2007. Evolutionary dynamics of an *Ipomopsis* hybrid zone: confronting models with lifetime fitness data. *The American Naturalist* 169:298-310.
- Campbell, D. R., N. M. Waser, and G. T. Pederson. 2002b. Predicting patterns of mating and potential hybridization from pollinator behavior. *The American Naturalist* 159:438-450.
- Campbell, D. R., N. M. Waser, and P. G. Wolf. 1998. Pollen transfer by natural hybrids and parental species in an *Ipomopsis* hybrid zone. *Evolution* 52:1602-1611.
- Caraway, V., G. D. Carr, and C. W. Morden. 2001. Assessment of hybridization and introgression in lava-colonizing Hawaiian *Dubautia* (Asteraceae: Madiinae) using RAPD markers. *American Journal of Botany* 88:1688-1694.

- Carney, S. E., M. B. Cruzan, and M. L. Arnold. 1994. Reproductive interactions between hybridizing irises: Analyses of pollen-tube growth and fertilization success. *American Journal of Botany* 81:1169-1175.
- Carney, S. E., K. A. Gardner, and L. H. Rieseberg. 2000. Evolutionary changes over the fifty-year history of a hybrid population of Sunflowers (*Helianthus*). *Evolution* 54:462-474.
- Carney, S. E., S. A. Hodges, and M. L. Arnold. 1996. Effects of differential pollen-tube growth on hybridization in the Louisiana irises. *Evolution* 50:1871-1878.
- Casgrain, P., and P. Legendre. 2001. The R Package for multivariate and spatial analysis, version 4.0 d8. Département des Sciences Biologiques, Université de Montréal, Montréal.
- Cattell, M. V., and S. A. Karl. 2004. Genetic and morphology in a *Borrchia frutescens* and *B. arborescens* (Asteraceae) hybrid zone. *American Journal of Botany* 91:1757-1766.
- Cha, R. S., H. Zarbl, P. Keohavong, and W. G. Thilly. 1992. Mismatch Amplification Mutation Assay (MAMA): Application to the c-H-*ras* gene. *PCR Methods and Applications* 2:14-20.
- Chen, L. J., D. S. Lee, Z. P. Song, H. S. Suh, and B.-r. Lu. 2004. Gene flow from cultivated rice (*Oryza sativa*) to its weedy and wild relatives. *Annals of botany* 93:67-73.
- Chèvre, A. M., F. Eber, H. Darmency, A. Fleury, H. Picault, J. C. Letanneur, and M. Renard. 2000. Assessment of interspecific hybridization between transgenic oilseed rape and wild radish under normal agronomic conditions. *Theoretical and Applied Genetics* 100:1233-1239.
- Choi, H.-K., D. Kim, T. Uhm, E. Limpens, H. Lim, J.-H. Mun, P. Kalo, R. V. Penmetsa, A. Seres, O. Kulikova, B. A. Roe, T. Bisseling, G. B. Kiss, and D. R. Cook. 2004. A sequence-based genetic map of *Medicago truncatula* and comparison of marker colinearity with *M. sativa*. *Genetics* 166:1463-1502.
- Conover, W. J., M. E. Johnson, and M. M. Johnson. 1981. A comparative study of tests for homogeneity of variances, with applications to the outer continental shelf bidding data. *Technometrics* 23:351-361.

- Cozzolino, S., A. M. Nardella, S. Impagliazzo, A. Widmer, and C. Lexer. 2006. Hybridization and conservation of Mediterranean orchids: should we protect the orchid hybrids or the orchid hybrid zones? *Biological conservation* 129:14-23.
- Crespel, L., M. Chirollet, C. E. Durel, D. Zhang, J. Meynet, and S. Gudin. 2002. Mapping of qualitative and quantitative phenotypic traits in *Rosa* using AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics* 105:1207-1214.
- Crespel, L., and S. Gudin. 2003. Evidence for the production of unreduced gametes by tetraploid *Rosa hybrida* L. *Euphytica* 133:65-69.
- Crespel, L., S. C. Ricci, and S. Gudin. 2006. The production of $2n$ pollen in rose. *Euphytica* 151:155-164.
- Cronn, R., and J. F. Wendel. 2003. Cryptic trysts, genomic mergers, and plant speciation. *New Phytologist* 161:133-142.
- Cruzan, M. B., and M. L. Arnold. 1993. Ecological and genetic associations in an *Iris* hybrid zone. *Evolution* 47:1432-1445.
- Cruzan, M. B., and M. L. Arnold. 1994. Assortative mating and natural selection in an *Iris* hybrid zone. *Evolution* 48:1946-1958.
- Cruzan, M. B., M. L. Arnold, S. E. Carney, and K. R. Wollenberg. 1993. cpDNA inheritance in interspecific crosses and evolutionary inference in Louisiana irises. *American Journal of Botany* 80:344-350.
- Daehler, C. C., and D. R. Strong. 1997. Hybridization between introduced smooth cordgrass (*Spartina alterniflora*; Poaceae) and native California cordgrass (*S. foliosa*) in San Francisco Bay, California, U.S.A.. *American Journal of Botany* 84:607-611.
- Darbyshire, S. J. 2003. Inventory of Canadian Agricultural Weeds Agriculture and Agri-Food Canada, Ottawa, Canada.
URL: http://res2.agr.ca/CRECO/weeds_herbes/title-titre_e.htm. Access date: 27 November 2007.
- de Wet, J. M. J., and J. R. Harlan. 1975. Weeds and domesticates: evolution in the man-made habitat. *Economic Botany* 29:99-107.
- Debener, T., A. Dohm, and L. Mattiesch. 2003. Use of diploid self incompatible rose genotypes as a tool for gene flow analyses in roses. *Plant Breeding* 122:285-287.

- den Nijs, H. C. M., D. Bartsch, and J. Sweet. 2004. Introgression from genetically modified plants into wild relatives. CAB International, Oxon, UK.
- Dirr, M. A. 1978. Tolerance of seven woody ornamentals to soil-applied sodium chloride. *Journal of Arboriculture* 4:162-165.
- Dobzhansky, T. 1951. *Genetics and the origin of species*, 3rd ed. edition. Columbia University Press, New York, U.S.A.
- Doyle, J. J., and J. L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19:11-15.
- Durand, S., P. Legendre, and S. K. Juniper. 2006. Sonar backscatter differentiation of dominant macrohabitat types in a hydrothermal vent field. *Ecological Applications* 16:1421-1435.
- Echelle, A. A., and P. J. Connor. 1989. Rapid, geographically extensive genetic introgression after secondary contact between two pupfish species (*Cyprinodon*, Cyprinodontidae). *Evolution* 43:717-727.
- El Mokadem, H., L. Crespel, J. Meynet, and S. Gudín. 2002. The occurrence of $2n$ -pollen and the origin of sexual polyploids in dihaploid roses (*Rosa hybrida* L.). *Euphytica* 125:169-177.
- Ellstrand, N. C. 1992. Gene flow by pollen: implications for plant conservation genetics. *Oikos* 63:77-86.
- Ellstrand, N. C. 2003. Dangerous liaisons? When cultivated plants mate with their wild relatives. The John Hopkins University Press, Baltimore, Maryland, U.S.A..
- Ellstrand, N. C., and D. R. Elam. 1993. Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. *Annual Review of Ecology and Systematics* 24:217-242.
- Ellstrand, N. C., H. C. Prentice, and J. F. Hancock. 1999. Gene flow and introgression from domesticated plants into their wild relatives. *Annual Review of Ecology and Systematics* 30:539-563.
- Ellstrand, N. C., and K. A. Schierenbeck. 2000. Hybridization as a stimulus for the evolution of invasiveness in plants? *Proceedings of the National Academy of Science of the United States* 97:7043-7050.

- Ellstrand, N. C., R. Whitkus, and L. H. Rieseberg. 1996. Distribution of spontaneous plant hybrids. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States* 93:5090-5093.
- Emms, S. K., and M. L. Arnold. 1997. The effect of habitat on parental and hybrid fitness: transplant experiments with Louisiana irises. *Evolution* 51:1112-1119.
- Emms, S. K., and M. L. Arnold. 2000. Site-to-site differences in pollinator visitation patterns in a Louisiana iris hybrid zone. *Oikos* 91:568-578.
- Epifanio, J., and D. Philipp. 2001. Stimulating the extinction of parental lineages from introgressive hybridization: the effects of fitness, initial proportions of parental taxa, and mate choice. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 10:339-354.
- Epifanio, J. M., and D. P. Philipp. 1997. Sources for misclassifying genealogical origins in mixed hybrid populations. *The Journal of Heredity* 88:63-65.
- Erlanson, E. W. 1929. Cytological conditions and evidences for hybridity in north american wild roses. *Botanical Gazette* 87:443-506.
- Erlanson, E. W. 1930. The phenological procession in North American wild roses in relation to the polyploid series. *Papers of the Michigan Academy of Sciences, Arts and Letters* 11:137-150.
- Erlanson, E. W. 1931. Sterility in wild roses and in some species hybrids. *Genetics* 16:75-96.
- Erlanson, E. W. 1934. Experimental data for a revision of the North American wild roses. *The Botanical Gazette* 96:197-259.
- Erlanson, E. W. 1937. Studies in rose heredity. *The American Rose Annual* 22:23-32.
- Ferdy, J.-B., and F. Austerlitz. 2002. Extinction and introgression in a community of partially cross-fertile plant species. *The American Naturalist* 160:74-86.
- Ferguson, C. J., D. A. Levin, and R. K. Jansen. 1999. Natural hybridization between an outcrossing and a selfing *Phlox* (*Polemoniaceae*): the maternal species of F₁ hybrids. *Plant Systematics and Evolution* 218:153-158.
- Fernald, M. L. 1918. *Rosa blanda* and its allies of northern Maine and adjacent Canada. *Rhodora* 20:90-96.
- Fishman, L., and J. H. Willis. 2006. A cytonuclear incompatibility causes anther sterility in *Mimulus* hybrids. *Evolution* 60:1372-1381.

- Frère Marie-Victorin. 1935. Flore laurentienne. Les Presses de l'Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.
- Gallagher, K. G., K. A. Schierenbeck, and C. M. D'Antonio. 1997. Hybridization and introgression in *Carpobrotus* spp. (Aizoaceae) in California II. Allozyme evidence. *American Journal of Botany* 84:905-911.
- Gaskin, J. F., and B. A. Schaal. 2002. Hybrid *Tamarix* widespread in U. S. invasion and undetected in native Asian range. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States* 99:11256-11259.
- Grant, V. 1981. Plant Speciation. Columbia University Press, New York, U.S.A.
- Gudin, S. 2000. Rose: genetics and breeding. *In* J. Janick [ed.], *Plant Breeding Reviews*, volume 17, 159-189. John Wiley & Sons.
- Guéritaine, G., S. Bazot, and H. Darmency. 2003. Emergence and growth of hybrids between *Brassica napus* and *Raphanus raphanistrum*. *New Phytologist* 158:561-567.
- Hails, R. S., and K. Morley. 2005. Genes invading new populations: a risk assessment perspective. *Trends in Ecology and Evolution* 20:245-252.
- Hall, R. J., A. Hastings, and D. R. Ayres. 2006. Explaining the explosion: modelling hybrid invasions. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences* 273:1385-1389.
- Hancock, J. F., R. Grumet, and S. C. Hokanson. 1996. The opportunity for escape of engineered genes from transgenic crops. *HortScience* 31:1080-1083.
- Hänfling, B., P. Bolton, M. Harley, and G. R. Carvalho. 2005. A molecular approach to detect hybridization between crucian carp (*Carassius carassius*) and non-indigenous carp species (*Carassius* spp. and *Cyprinus carpio*). *Freshwater Biology* 50:403-417.
- Hardig, T. M., S. J. Brunsfeld, R. S. Fritz, M. Morgan, and C. M. Orians. 2000. Morphological and molecular evidence for hybridization and introgression in a willow (*Salix*) hybrid zone. *Molecular Ecology* 9:9-24.
- Harrison, R. G. 1993. Hybrids and hybrid zones: historical perspective. *In* R. G. Harrison [ed.], *Hybrid zones and the evolutionary process*, 3-12. Oxford University Press, Oxford, U.K.

- Haygood, R., A. R. Ives, and D. A. Andow. 2003. Consequences of recurrent gene flow from crops to wild relatives. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences* 270:1879-1886.
- Heiser, C. B. J. 1949. Natural hybridization with particular reference to introgression. *The Botanical Review* 15:645-687.
- Heiser, C. B. J. 1973. Introgression re-examined. *The Botanical Review* 39:347-366.
- Hodges, S. A., J. M. Burke, and M. L. Arnold. 1996. Natural formation of iris hybrids: experimental evidence on the establishment of hybrid zones. *Evolution* 50:2504-2509.
- Howard, D. J. 1999. Conspecific sperm and pollen precedence and speciation. *Annual Review of Ecology and Systematics* 30:109-132.
- Hurka, H., W. Bleeker, and B. Neuffer. 2003. Evolutionary processes associated with biological invasions in the Brassicaceae. *Biological Invasions* 5:281-292.
- Hurst, C. C. 1928. Differential polyploidy in the genus *Rosa* L. *Zeitschr. Indukt. Abstam. Vererb. suppl.* 2:866-906.
- Huxel, G. H. 1999. Rapid displacement of native species by invasive species: effects of hybridization. *Biological Conservation* 89:143-152.
- Isermann, M. 2003. *Rosa rugosa* - shrubland in dry coastal dunes. *Verhandlungen der Gesellschaft für Ökologie* 33:146.
- Ishida, T., K. Hattori, H. Sato, and M. Kimura. 2003. Differentiation and hybridization between *Quercus crispula* and *Q. dentata* (Fagaceae): insights from morphological traits, amplified fragment length polymorphisms markers, and leafminer composition. *American Journal of Botany* 90:769-776.
- Jarvis, D. I., and T. Hodgkin. 1999. Wild relatives and crop cultivars: detecting natural introgression and farmer selection of new genetic combinations in agroecosystems. *Molecular Ecology* 8:S159-S173.
- Jiggins, C. D., and J. Mallet. 2000. Bimodal hybrid zones and speciation. *Trends in Ecology and Evolution* 15:250-255.
- Johnston, J. A., M. L. Arnold, and L. A. Donovan. 2003. High hybrid fitness at seed and seedling life history stages in Louisiana irises. *Journal of Ecology* 91:438-446.

- Johnston, J. A., D. J. Grise, L. A. Donovan, and M. L. Arnold. 2001a. Environment-dependent performance and fitness of *Iris brevicaulis*, *I. fulva* (Iridaceae), and hybrids. *American Journal of Botany* 88:933-938.
- Johnston, J. A., R. A. Wesselingh, A. C. Bouck, L. A. Donovan, and M. L. Arnold. 2001b. Intimately linked or hardly speaking? The relationship between genotype and environmental gradients in a Louisiana iris hybrid population. *Molecular Ecology* 10:673-681.
- Joly, S., J. R. Starr, W. H. Lewis, and A. Bruneau. 2006. Polyploid and hybrid evolution in roses east of the Rocky Mountains. *American Journal of Botany* 93:412-425.
- Kirk, H., K. Vrieling, and P. G. L. Klinkhamer. 2005. Maternal effects and heterosis influence the fitness of plant hybrids. *New Phytologist* 166:685-694.
- Klinger, T., and N. C. Ellstrand. 1994. Engineered genes in wild populations: fitness of weed-crop hybrids of *Raphanus sativus*. *Ecological Applications* 4:117-120.
- Knobloch, I. W. 1972. Intergeneric hybridization in flowering plants. *Taxon* 21:97-103.
- Kollmann, J., L. Frederiksen, P. Vestergaard, and H. H. Bruun. 2007. Limiting factors for seedling emergence and establishment of the invasive non-native *Rosa rugosa* in a coastal dune system. *Biological Invasions* 9:31-42.
- Lamont, B. B., T. He, N. J. Enright, S. L. Krauss, and B. P. Miller. 2003. Anthropogenic disturbance promotes hybridization between *Banksia* species by altering their biology. *Journal of Evolutionary Biology* 16:551-557.
- Legendre, P., and L. Legendre. 1998. *Numerical Ecology*, second english edition. Elsevier, Amsterdam.
- Levin, D. A. 1975. Minority cytotype exclusion in local plant populations. *Taxon* 24:35-43.
- Levin, D. A., J. Francisco-Ortega, and R. K. Jansen. 1996. Hybridization and the extinction of rare plant species. *Conservation Biology* 10:10-16.
- Lewis, C. E., and J. J. Doyle. 2001. Phylogenetic utility of the nuclear gene malate synthase in the palm family (Arecaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 19:409-420.

- Lewis, W. H., and R. E. Basye. 1961. Analysis of nine crosses between diploid *Rosa* species. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science* 78:573-579.
- Lexer, C., M. E. Welch, J. L. Durphy, and L. H. Rieseberg. 2003. Natural selection for salt tolerance quantitative trait loci (QTLs) in wild sunflower hybrids: Implications for the origin of *Helianthus paradoxus*, a diploid hybrid species. *Molecular Ecology* 12:1225-1235.
- Li, B., I. Kadura, D.-J. Fu, and D. E. Watson. 2003. Genotyping with *TaqMAMA*. *Genomics* 83:311-320.
- Li, Z., S. R. M. Pinson, A. H. Paterson, W. D. Park, and J. W. Stansel. 1997. Genetics of hybrid sterility and hybrid breakdown in an intersubspecific rice (*Oryza sativa* L.) population. *Genetics* 145:1139-1148.
- Linder, C. R., I. Taha, G. J. Seiler, A. A. Snow, and L. H. Rieseberg. 1998. Long-term introgression of crop genes into wild sunflower populations. *Theoretical and Applied Genetics* 96:339-347.
- Little, D. P. 2004. Documentation of hybridization between californian cypresses: *Cupressus macnabiana* x *sargentii*. *Systematic Botany* 29:825-833.
- Lu, C. M., M. Kato, and F. Kakihara. 2002. Destiny of a transgene escape from *Brassica napus* into *Brassica rapa*. *Theoretical and Applied Genetics* 105:78-84.
- Ma, Y., C. F. Crane, and D. H. Byrne. 1997. Karyotypic relationships among some *Rosa* species. *Caryologia* 50:317-326.
- Mack, R. N., D. Simberloff, W. M. Lonsdale, H. Evans, M. Clout, and F. A. Bazzaz. 2000. Biotic invasions: causes, epidemiology, global consequences, and control. *Ecological Applications* 10:689-710.
- Mallet, J. 2005. Hybridization as an invasion of the genome: Online Appendix 1. Notes on Table 1: Hybridization rates in the wild. doi:10.1016/j.tree.2005.02.010 Access date: May 20 2006.
- Martinsen, G. D., T. G. Whitham, R. J. Turek, and P. Keim. 2001. Hybrid populations selectively filter gene introgression between species. *Evolution* 55:1325-1335.
- Masterson, J. 1994. Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploidy in majority of angiosperms. *Science* 264:421-424.

- McDade, L. A. 1990. Hybrids and phylogenetic systematics I. Patterns of character expression in hybrids and their implication for cladistic analysis. *Evolution* 44:1685-1700.
- Messeguer, J. 2003. Gene flow assessment in transgenic plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 73:202-212.
- Milne, R. I., and R. J. Abbott. 2000. Origin and evolution of invasive naturalized material of *Rhododendron ponticum* L. in the British Isles. *Molecular Ecology* 9:541-556.
- Moccia, M. D., A. Widmer, and S. Cozzolino. 2007. The strength of reproductive isolation in two hybridizing food-deceptive orchid species. *Molecular Ecology*.
- Moody, M. L., and D. H. Les. 2002. Evidence of hybridity in invasive watermilfoil (*Myriophyllum*) populations. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States* 99:14867-14871.
- Mooney, H. A., and E. E. Cleland. 2001. The evolutionary impact of invasive species. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States* 98:5446-5451.
- Nason, J. D., N. C. Ellstrand, and M. L. Arnold. 1992. Patterns of hybridization and introgression in oaks, manzanitas, and irises. *American Journal of Botany* 79:101-111.
- Neuffer, B., H. Auge, H. Mesch, U. Amarell, and R. Brandl. 1999. Spread of violets in polluted pine forests: morphological and molecular evidence for the ecological importance of interspecific hybridization. *Molecular Ecology* 8:365-377.
- O'Hanlon, P. C., R. Peakall, and D. T. Brieseman. 1999. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) reveals introgression in weedy *Onopordum* thistles: hybridization and invasion. *Molecular Ecology* 8:1239-1246.
- Ohwi, J. 1965. *Flora of Japan*. Smithsonian Institution, Washington D. C.
- Oksanen, J., R. Kindt, P. Legendre, and B. O'hara. 2006. vegan: Community Ecology Package, version 1.8-3. URL: <http://cc.oulu.fi/~jarioksa/>. Access date: 25 July 2006

- Olden, J. D., N. L. Poff, M. R. Douglas, and M. E. Douglas. 2004. Ecological and evolutionary consequences of biotic homogenization. *Trends in Ecology and Evolution* 19:18-24.
- Orians, C. M. 2000. The effects of hybridization in plants on secondary chemistry: Implications for the ecology and evolution of plant-herbivore interactions. *American Journal of Botany* 87:1749-1756.
- Orr, H. A., and M. Turelli. 2001. The evolution of postzygotic isolation: accumulating Dobzhansky-Muller incompatibilities. *Evolution* 55:1085-1094.
- Paige, K. N., W. C. Capman, and P. Jennetten. 1991. Mitochondrial inheritance patterns across a cottonwood hybrid zone: cytonuclear disequilibria and hybrid zone dynamics. *Evolution* 45:1360-1369.
- Pearson, H. M., and P. M. Harney. 1984. Pollen viability in *Rosa*. *HortScience* 19:710-711.
- Perry, W. L., D. M. Lodge, and J. L. Feder. 2002. Importance of hybridization between indigenous and nonindigenous freshwater species: an overlooked threat to North American biodiversity. *Systematic Biology* 51:255-275.
- Pimentel, D., L. Lach, R. Zuniga, and D. Morrison. 2000. Environmental and economic costs of nonindigenous species in the United States. *BioScience* 50:53-65.
- R Development Core Team. 2005. R: A language and environment for statistical computing, version 2.2.1. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Randell, R. A., D. G. Howarth, and C. W. Morden. 2004. Genetic analysis of natural hybrids between endemic and alien *Rubus* (Rosaceae) species in Hawai'i. *Conservation Genetics* 5:217-230.
- Ratsek, J. C., W. S. Flory, Jr., and S. H. Yarnell. 1940. Crossing relations of some diploid and polyploid species of roses. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science* 38:637-654.
- Ratsek, J. C., S. H. Yarnell, and W. S. Flory, Jr. 1939. Crossing relations of some diploid species of roses. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science* 37:983-992.

- Rauscher, J. T., J. J. Doyle, and A. H. D. Brown. 2002. Internal transcribed spacer repeat-specific primers and the analysis of hybridization in the *Glycine tomentella* (Leguminosae) polyploid complex. *Molecular Ecology* 11:2691-2702.
- Rehder, A. 1940. *Manual of cultivated trees and shrubs*, Second edition. The MacMillan Company, New York.
- Rhode, J. M., and M. B. Cruzan. 2005. Contributions of heterosis and epistasis to hybrid fitness. *The American Naturalist* 166:E124-E139.
- Rhymer, J. M., and D. Simberloff. 1996. Extinction by hybridization and introgression. *Annual Review of Ecology and Systematics* 27:83-109.
- Rieseberg, L. H. 1991a. Homoploid reticulate evolution in *Helianthus* (Asteraceae): Evidence from ribosomal genes. *American Journal of Botany* 78:1218-1237.
- Rieseberg, L. H. 1991b. Hybridization in rare plants: Insights from case studies in *Cercocarpus* and *Helianthus*. In D. A. Falk, and K. A. Holsinger [eds.], *Genetics and Conservation of Rare Plants*, 171-81. Oxford University Press, New York.
- Rieseberg, L. H. 1995. The role of hybridization in evolution: Old wine in new skins. *American Journal of Botany* 82:944-953.
- Rieseberg, L. H. 1997. Hybrid origins of plant species. *Annual Review of Ecology and Systematics* 28:359-389.
- Rieseberg, L. H., S. J. E. Baird, and A. M. Desrochers. 1998. Patterns of mating in wild sunflower hybrid zones. *Evolution* 52:713-726.
- Rieseberg, L. H., S. Beckstrom-Sternberg, and K. Doan. 1990. *Helianthus annuus* ssp. *texanus* has chloroplast DNA and nuclear ribosomal RNA genes of *Helianthus debilis* ssp. *cucumerifolius*. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States* 87:593-597.
- Rieseberg, L. H., and S. J. Brunsfeld. 1992. Molecular evidence and plant introgression. In P. S. Soltis, D. E. Soltis, and J. J. Doyle [eds.], *Molecular Systematics of Plants*, 151-176. Kluwer Academic Publishers, Boston, MA.
- Rieseberg, L. H., and S. E. Carney. 1998. Plant hybridization. *New Phytologist* 140:599-624.
- Rieseberg, L. H., and N. C. Ellstrand. 1993. What can morphological markers tell us about plant hybridization? *Critical Reviews in Plant Science* 12:213-241.

- Rieseberg, L. H., and D. Gerber. 1995. Hybridization in the Catalina Island mountain mahogany (*Cercocarpus traskae*): RAPD evidence. *Conservation Biology* 9:199-203.
- Rieseberg, L. H., and C. R. Linder. 1999. Hybrid classification: insights from genetic map-based studies of experimental hybrids. *Ecology* 80:361-370.
- Rieseberg, L. H., O. Raymond, D. M. Rosenthal, Z. Lai, K. Livingstone, T. Nakazato, J. L. Durphy, A. E. Schwarzbach, L. A. Donovan, and C. Lexer. 2003. Major ecological transitions in wild sunflowers facilitated by hybridization. *Nature* 301:1211-1216.
- Rieseberg, L. H., and D. E. Soltis. 1991. Evolutionary consequences of cytoplasmic gene flow in plants. *Evolutionary Trends in Plants* 5:65-83.
- Rieseberg, L. H., and J. F. Wendel. 1993. Introgression and its consequences in plants. *In* R. G. Harrison [ed.], *Hybrid zones and the evolutionary process*, 70-109. Oxford University Press, Oxford, U.K.
- Rosenthal, D. M., L. H. Rieseberg, and L. A. Donovan. 2005. Re-creating ancient hybrid species' complex phenotypes from early-generation synthetic hybrids: three examples using wild sunflowers. *The American Naturalist* 166:26-41.
- Rosenthal, D. M., A. E. Schwarzbach, L. A. Donovan, O. Raymond, and L. H. Rieseberg. 2002. Phenotypic differentiation between three ancient hybrid taxa and their parental species. *International Journal of Plant Sciences* 163:387-398.
- Rydberg, A. 1920. Notes on Rosaceae - XII. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 47:45-66.
- Rydberg, P. A. 1918. *Rosa*. *North American Flora* 22:483-533.
- Sanders, R. W. 1987. Identity of *Lantana depressa* and *L. ovatifolia* (Verbenaceae) of Florida and the Bahamas. *Systematic Botany* 12:44-60.
- Schaal, B. A., J. F. Gaskin, and A. L. Caicedo. 2003. Phylogeography, haplotype trees and invasive plant species. *Journal of Heredity* 94:197-204.
- Schlätzer, G. 1974. Some experience from attempts at establishing broadleaved woody plants in some Danish dunelands. *International Journal of Biometeorology* 18:159-167.

- Scoggan, H. J. 1950. The flora of Bic and the Gaspé peninsula, Québec. National Museum of Canada, Ottawa, Canada.
- Scoggan, H. J. 1978. The Flora of Canada. Part 3. National Museums of Canada. Ottawa, Canada.
- Scribner, K. T., K. S. Page, and M. L. Bartron. 2001. Hybridization in freshwater fishes: a review of case studies and cytonuclear methods of biological inference. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 10:293-323.
- Seehausen, O. 2004. Hybridization and adaptive radiation. *Trends in Ecology and Evolution* 19:198-207.
- Setoguchi, H., and I. Watanabe. 2000. Intersectional gene flow between insular endemics of *Ilex* (Aquifoliaceae) on the Bonin Islands and the Ryukyu Islands. *American Journal of Botany* 87:793-810.
- Slatkin, M. 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science* 236:787-792.
- Soper, J. H., and M. L. Heimburger. 1982. Rosa. In J. H. Soper, and M. L. Heimburger [eds.], *Shrubs of Ontario*, 212-225. Royal Ontario Museum, Toronto, Canada.
- Stebbins, G. L. 1969. The significance of hybridization for plant taxonomy and evolution. *Taxon* 18:26-35.
- Stewart, C. N. J., M. D. Halfhill, and S. I. Warwick. 2003. Transgene introgression from genetically modified crops to their wild relatives. *Nature Reviews in Genetics* 4:806-817.
- Strand, A. E., J. Leebens-Mack, and B. G. Milligan. 1997. Nuclear DNA-based markers for plant evolutionary biology. *Molecular Ecology* 6:113-118.
- Suehs, C. M., S. Charpentier, L. Affre, and F. Médail. 2006. The evolutionary potential of invasive *Carpobrotus* (Aizoaceae) taxa: are pollen-mediated gene flow potential and hybrid vigor levels connected? *Evolutionary Ecology* 20:447-463.
- Swanson-Wagner, R. A., Y. Jia, R. DeCook, L. A. Borsuk, D. Nettleton, and P. S. Schnable. 2006. All possible modes of gene action are observed in a global comparison of gene expression in a maize F₁ hybrid and its inbred parents. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States* 103:6805-6810.

- Taberlet, P., L. Gielly, G. Pautou, and J. Bouvet. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17:1105-1109.
- Tauleigne-Gomes, C., and C. Lefèbvre. 2005. Natural hybridization between two coastal endemic species of *Armeria* (Plumbaginaceae) from Portugal. 1. Populational in situ investigation. *Plant Systematics and Evolution* 250:215-230.
- Thompson, C. J., B. J. P. Thompson, P. K. Ades, R. Cousens, P. Garnier-Gere, K. Landman, E. Newbigin, and M. A. Burgman. 2003. Model-based analysis of the likelihood of gene introgression from genetically modified crops into wild relatives. *Ecological Modelling* 162:199-209.
- Tiffin, P., M. S. Olson, and L. C. Moyle. 2001. Asymmetrical crossing barriers in angiosperms. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences* 268:861-867.
- Tovar-Sanchez, E., and K. Oyama. 2004. Natural hybridization and hybrid zones between *Quercus crassifolia* and *Quercus crassipes* (Fagaceae) in Mexico: morphological and molecular evidence. *American Journal of Botany* 91:1352-1363.
- Tsukaya, H. 2004. Gene flow between *Impatiens radicans* and *I. javensis* (Balsaminaceae) in Gunung Pangrango, central Java, Indonesia. *American Journal of Botany* 91:2119-2123.
- Tsukaya, H., T. Fukuda, and J. Yokoyama. 2003. Hybridization and introgression between *Callicarpa japonica* and *C. mollis* (Verbenaceae) in central Japan, as inferred from nuclear and chloroplast DNA sequences. *Molecular Ecology* 12:3003-3011.
- Ueda, Y., D. Takeshita, and T. Ando. 1996. Pollination in *Rosa rugosa* Thunb. ex Murray. *Acta Horticulturae* 424:309-310.
- USDA NRCS. 2007. The PLANTS Database National Plant Data Center, Baton Rouge, LA 70874-4490 U.S.A. URL: <http://plants.usda.gov/>. Access date: 27 November 2006.

- Vähä, J.-P., and C. R. Primmer. 2006. Efficiency of model-based bayesian methods for detecting hybrid individuals under different hybridization scenarios and with different numbers of loci. *Molecular Ecology* 15:63-72.
- Vanden Broeck, A., M. Villar, E. Van Bockstaele, and J. Van Slycken. 2005. Natural hybridization between cultivated poplars and their wild relatives: evidence and consequences for native poplar populations. *Annals of Forestry Science* 62:601-613.
- Verrier, S. 1991. *Rosa rugosa*. Capability's Books, Deer Park, Wisconsin.
- Vilà, M., and C. M. D'Antonio. 1998a. Fruit choice and seed dispersal of invasive vs. noninvasive *Carpobrotus* (Aizoaceae) in coastal California. *Ecology* 79:1053-1060.
- Vilà, M., and C. M. D'Antonio. 1998b. Hybrid vigor for clonal growth in *Carpobrotus* (Aizoaceae) in coastal California. *Ecological Applications* 8:1196-1205.
- Vilà, M., E. Weber, and C. M. D'Antonio. 2000. Conservation implications of invasion by plant hybridization. *Biological Invasions* 2:207-217.
- Weidema, I. 2006. NOBANIS - Invasive Alien Species Fact Sheet - *Rosa rugosa* - from Online Database of the North European and Baltic Network on Invasive Alien Species. URL: www.nobanis.org. Access date: 27 November 2006.
- Wen, J. 1999. Evolution of eastern Asian and eastern North American disjunct distributions in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 30:421-455.
- Werlemark, G., and H. Nybom. 2001. Skewed distribution of morphological character scores and molecular markers in three interspecific crosses in *Rosa* section *Caninae*. *Hereditas* 134:1-13.
- Whitton, J., D. E. Wolf, D. M. Arias, A. A. Snow, and L. H. Rieseberg. 1997. The persistence of cultivar alleles in wild populations of sunflowers five generations after hybridization. *Theoretical and Applied Genetics* 95:33-40.
- Williamson, M. 1996. *Biological invasions*. Chapman & Hall, London, U.K.
- Wissemann, V., and C. M. Ritz. 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* 147:275-290.

- Wolf, D. E., N. Takebayashi, and L. H. Rieseberg. 2001. Predicting the risk of extinction through hybridization. *Conservation Biology* 15:1039-1053.
- Wu, C. A., and D. R. Campbell. 2005. Cytoplasmic and nuclear markers reveal contrasting patterns of spatial genetic structure in a natural *Ipomopsis* hybrid zone. *Molecular Ecology* 14:781-792.