Metody badania przepływu genów u drzew leśnych

Artur DZIALUK, Jarosław BURCZYK

DZIALUK A. & BURCZYK J. 2005. **Methods for gene flow studies in forest trees**. *Wiadomości Botaniczne* **49**(1/2): 7–18.

Gene flow is an important force for maintaining genetic diversity in plant populations. Extensive gene flow may reduce inbreeding or affect progeny fitness, it may also erode the efforts of plant breeders since gene immigration through pollen to isolated plantations from unknown sources may reduce expected genetic gains. It can also provide a conduit for the escape of engineered genes from a transgenic crop into natural, sexually compatible populations. Gene flow is sufficient to counteract genetic drift and moderate directional selection. On the other hand, if gene flow is highly restricted, microgeographic differentiation is readily established. Several methods have been developed to trace gene flow through pollen and seeds. Some of these methods focus on potential gene flow estimating dispersal of seeds and pollen grains. However, effective gene flow can be studied with the aid of genetic markers and sophisticated statistical methods that are based on parentage analyses. In this paper we review state of the art of traditional and current ecological and genetic approaches for studying gene flow. We describe how genetic methods (markers and statistical models) are used to investigate ecological processes (seed and pollen dispersal) which in turn have important genetic consequences.

KEY WORDS: gene flow, seed dispersal, pollen dispersal, genetic markers, statistical models

Artur Dzialuk, Jarosław Burczyk, Uniwersytet Kazimierza Wielkiego, Instytut Biologii i Ochrony Środowiska, Zakład Genetyki, ul. Chodkiewicza 30, 85-064 Bydgoszcz, e-mail: dzialuk@ukw.edu.pl

WSTĘP

Rozmnażanie generatywne jest ważną częścią systemu genetycznego gatunku, bowiem umożliwia zachowanie i przekazywanie informacji genetycznej, a zarazem tworzenie i testowanie zmienności genetycznej o charakterze rekombinacyjnym (Geburek 2001). Drzewa leśne, stanowiące główny element większości ekosystemów lądowych, wytworzyły wiele naturalnych mechanizmów zapewniających utrzymanie wysokiego poziomu zmienności wewnątrzgatunkowej (Palmberg-Lerche 1999). Mechanizmy te, w połączeniu ze zmiennymi warunkami środowiska, spowodowały, że drzewa leśne należą do organizmów najbardziej zmiennych genetycznie (Libby 1987).

Istnieje szereg mechanizmów sprzyjających wysokiej zmienności genetycznej wewnątrz populacji. Wiele gatunków drzew leśnych, zajmując duże obszary, ma mniej lub bardziej ciągły zasięg występowania. Duża liczebność redukuje wrażliwość populacji na dryf genetyczny, który w małych populacjach prowadzi do utraty zmienności genetycznej i powoduje wzrost zróżnicowania genetycznego pomiędzy populacjami. Drzewa zajmują środowiska, które są zmienne zarówno w czasie, jak i przestrzeni. Konieczność

przystosowania się do różnych siedlisk oraz warunków klimatycznych sprzyja wzrostowi zróżnicowania pomiędzy populacjami. Podobnie, stosunkowo długi okres trwania pokoleń powoduje, że drzewa są mniej podatne na tzw. efekt szyjki butelki (ang. *bottle neck*), czyli znaczne fluktuacje liczebności populacji i związane z tym w konsekwencji ograniczenia zmienności genetycznej, niż gatunki charakteryzujące się krótkim cyklem życiowym. Ponieważ drzewa są organizmami długowiecznymi, w skład populacji mogą jednocześnie wchodzić osobniki należące do różnych, często odmiennych genetycznie klas wiekowych. Zróżnicowana wrażliwość tych klas na selekcję może powodować wzrost zmienności genetycznej. Długi cykl życiowy i pokaźne rozmiary drzew sprzyjają kumulowaniu mutacji, czego przykładem może być stosunkowo wysoka liczba genów letalnych (Savolainen et al. 1992, Williams, Savolainen 1996) oraz stosunkowo wysoki polimorfizm markerów genetycznych u drzew leśnych. Wysoka częstość zapłodnień krzyżowych ma duże znaczenie dla zachowania zmienności genetycznej wewnątrz populacji. Sprzyja heterozygotyczności, ukrywając allele recesywne, które w przeciwnym razie mogą podlegać selekcji. Kojarzenie między osobnikami heterozygotycznymi lub homozygotami o odmiennych genotypach prowadzi do rekombinacji i tworzenia nowych kombinacji alleli w pokoleniu potomnym. Generalnie u większości gatunków drzew leśnych zapłodnienia krzyżowe stanowią ponad 75% wszystkich kojarzeń, przy czym u gatunków iglastych, wiatropylnych, często przekraczają 90% (Burczyk 1998, Hamrick et al. 1992).

Jednym z czynników, który w największym stopniu wpływa na zmienność genetyczną jest przepływ genów (Hedrick 2000). Z powodu istnienia terminów bardziej ogólnych, jak np. migracja i dyspersja, termin ten często bywa stosowany nieprecyzyjnie. W sensie ogólnym, migrację można definiować jako przemieszczanie się organizmów (Baker 1978). Z kolei dyspersja jest terminem bardziej precyzyjnym i dotyczy przemieszczania, które powoduje wzrost odległości pomiędzy organizmami, gametami lub propagulami (Baker 1978). Sam przepływ genów rozumiany jest jako przemieszczanie genów w populacji i obejmuje wszelkie sposoby przemieszczania gamet, propagul i osobników, które efektywnie przyczyniają się do zmiany przestrzennego rozmieszczenia genów (Slatkin 1987). U roślin, które są organizmami stacjonarnymi, przepływ genów odbywa się zasadniczo w trakcie dwóch niezależnych stadiów cyklu życiowego: dyspersji pyłku, która zachodzi przed zapłodnieniem oraz dyspersji nasion (owoców) po zapłodnieniu. W tym sensie, przepływ genów można definiować jako efektywne przemieszczanie genów między populacjami lub ich fragmentami, zapłodnienie komórki jajowej przez imigrujące ziarno pyłku, a następnie powstanie siewki (Hamrick, Nason 2000). Przepływ genów można zatem rozumieć jako udział osobników jednej populacji w tworzeniu pokolenia potomnego innej populacji, często charakteryzującej się odmienną częstością alleli (Eriksson, Ekberg 2001). Dwoistość przepływu genów, choć nie jest cechą unikalną roślin, stanowi istotną różnicę pomiędzy roślinami a większością zwierząt. Możliwość rozróżnienia tych dwóch etapów dyspersji genów oraz ich niezależnego badania ma zasadnicze znaczenie dla poznania rozkładu zmienności genetycznej wewnątrz i między populacjami roślin (Levin 1981).

Levin i Kerster (1974) wyróżniają potencjalny oraz faktyczny przepływ genów. Potencjalny przepływ genów rozumiany jest jako funkcja odległości, jaką fizycznie pokonuje ziarno pyłku lub nasienie od źródła wysiewu do punktu sedymentacji. Z kolei faktyczny przepływ genów, to również funkcja odległości od źródła wysiewu, tym niemniej w przypadku pyłku dotyczy odległości do kwiatu żeńskiego, gdzie następuje zapłodnienie, a w przypadku nasion odległości do miejsca, w którym nasienie kiełkuje i daje początek siewce zdolnej w dalszych etapach cyklu życiowego do reprodukcji. Ponieważ nie każde ziarno pyłku powoduje zapłodnienie i nie z każdego nasiona rozwija się zdolna do reprodukcji roślina, to faktyczny przepływ informacji genetycznej może znacznie różnić się od potencjalnego (Pemberton et al. 1995). Biorąc pod

uwagę duże możliwości oddziaływania selekcji na kiełkujące nasiona, a następnie powstające siewki, badanie przepływu genów na poziomie odnowienia naturalnego, dostarcza z kolei informacji o tzw. zrealizowanym przepływie genów (Meagher, Thompson 1987).

ZNACZENIE PRZEPŁYWU GENÓW

Pomimo ogromnego znaczenia przepływu genów zarówno w teorii biologii ewolucyjnej, jak i hodowli roślin, wiedza na temat skali dyspersji pyłku i nasion u drzew leśnych jest w znacznym stopniu ograniczona. Pierwsze próby szacowania intensywności dyspersji pyłku u gatunków wiatropylnych, miały miejsce już na początku XX wieku. Wskazywały one na duży potencjał przepływu informacji genetycznej. Późniejsze obserwacje sugerowały jednak znacznie niższy poziom dyspersji (Levin, Kerster 1974). Niewystarczająca liczba danych empirycznych wywoływała również spory dotyczące znaczenia procesu przepływu genów. Niektórzy autorzy (np. Levin, Kerster 1974) uważali, że ma on niewielki wpływ na kształtowanie struktury genetycznej populacji. Obecnie panuje jednak przekonanie, że przepływ genów pomiędzy populacjami drzew leśnych, w porównaniu do innych grup roślin, jest bardzo intensywny i odgrywa znaczącą rolę w kształtowaniu przestrzennego rozmieszczenia zmienności genetycznej (Hamrick, Nason 2000). Przepływ genów między populacjami hamuje wzrost zróżnicowania genetycznego, powodowanego naturalną selekcją, dryfem genetycznym i mutacjami, a przez to hamuje procesy ewolucyjne, w tym specjację. Z kolei wewnątrz populacji mutacje i przepływ genów powodują zwiększenie zmienności genetycznej, podczas gdy selekcja naturalna i dryf genetyczny ją redukują (Eriksson, Ekberg 2001, Slatkin 1987). W małych populacjach przepływ genów, nawet o niewielkim natężeniu, może niwelować efekty działania selekcji oraz dryfu genetycznego (Hartl, Clark 1989).

Przepływ genów, oprócz wpływu na rozkład zmienności genetycznej wewnątrz populacji i między populacjami, determinuje sposób przestrzennego rozmieszczenia genotypów, poziom heterozygotyczności poszczególnych osobników i całych populacji oraz efektywną wielkość populacji (Adams 1992). Jeśli imigrujące geny nie mają ujemnego wpływu na zdolności adaptacyjne organizmów do lokalnych warunków środowiska, to ich dopływ do lokalnej populacji może być korzystny, ponieważ mogą być źródłem nowych genów lub genów, które zostały utracone na skutek dryfu genetycznego lub działania selekcji (Ellstrand 1992). Badania przepływu genów wnoszą wiele informacji dotyczących biologii gatunków, pozwalają oszacować wpływ czynników ekologicznych na intensywność tego procesu, wreszcie umożliwiają identyfikację czynników wpływających na sukces reprodukcyjny (Adams, Birkes 1991, Burczyk et al. 1996, Godt, Hamrick 1993).

Informacje o poziomie imigracji i odległości na jakie geny mogą być przenoszone między populacjami roślin, mają również duże znaczenie praktyczne w rolnictwie i leśnictwie. Zakres dyspersji pyłku i nasion określa stopień, w jakim lokalne drzewostany są genetycznie izolowane od otaczających lasów. Takie informacje są niezwykle istotne dla ochrony zasobów genowych populacji naturalnych, w tym szczególnie dla zachowania integralności rezerwatów i parków narodowych (Adams, Burczyk 2000). Jeśli np. populacje naturalne będą otoczone intensywnie uprawianymi populacjami sztucznymi, charakteryzującymi się niską zmiennością genetyczną, to imigracja genów z populacji otaczających spowoduje w kolejnych pokoleniach obniżenie zmienności genetycznej populacji naturalnych (Ellstrand, Elam 1993). W skrajnych przypadkach, kiedy sztuczne populacje są słabiej przystosowane do aktualnych bądź zmiennych warunków środowiska, napływ „niekorzystnych genów" może ograniczyć zdolności adaptacyjne populacji naturalnych (Ellstrand 1992). Podobnie hybrydyzacja i introgresja z gatunkami pokrewnymi może prowadzić nawet do zaniku gatunków chronionych (Lewandowski et al. 2005).

Szczególnie pilne wydaje się poznanie intensywności przepływu genów w populacjach drzew leśnych, gdzie intensywny wyrąb pro-

wadzi często do fragmentacji lasu. Uważa się, że gatunki drzew tworzące lasy tropikalne są w najwyższym stopniu zagrożone tym procesem (Dayanandan et al. 1999).

Dane dotyczące skali przepływu informacji genetycznej są również niezbędne do wyznaczenia stopnia izolacji leśnych plantacji nasiennych, potrzebnej do zminimalizowania zanieczyszczenia obcym pyłkiem (Burczyk 1998). Stanowi to obecnie największy problem obniżający wydajność genetyczną plantacji nasiennych (Savolainen 1991), bowiem znacznie redukuje oczekiwany zysk genetyczny (Squillace, Long 1981). Jeśli pyłek pochodzi z drzew nieprzystosowanych do wzrostu w środowisku planowanego wysiewu nasion, to zdolność adaptacyjna nowego pokolenia może być dodatkowo obniżona (Burczyk 1998). Informacje o intensywności dyspersji pyłku powinny być brane pod uwagę przy określaniu minimalnej, akceptowalnej odległości pomiędzy drzewami nasiennymi wykorzystywanymi do zbioru nasion używanych do zalesień oraz zakładania plantacji i drzewostanów nasiennych. W populacjach tych kojarzyć się powinny jedynie tworzące je osobniki, a zanieczyszczenie obcym pyłkiem powinno być minimalizowane (Adams 1992). Poznanie poziomu przepływu genów w populacjach drzew leśnych umożliwia również szacowanie ryzyka niekontrolowanego rozprzestrzeniania genów zmodyfikowanych metodami inżynierii genetycznej (Difazio et al. 2004).

Badania dyspersji nasion są źródłem cennych informacji, które mogą być wykorzystywane w praktyce leśnej. Intensywność i skala rozsiewania nasion powinny być brane pod uwagę przy podejmowaniu decyzji o ewentualnym zastosowaniu odnowienia naturalnego. Zdolność poszczególnych gatunków drzew do dyspersji nasion musi być uwzględniana przy planowaniu metod cięć regeneracyjnych, rozmieszczenia i czasu cięć oraz przygotowania podłoża pod odnowienia (McCaughey et al. 1986).

Badania intensywności dyspersji genów u roślin są szczególnie trudne z uwagi na fakt, że proces ten zachodzi przy udziale zarówno gamet (pyłek), jak i zygot (nasiona). Istnieją dwie grupy metod służących do oceny intensywności przepływu informacji genetycznej: metody pośrednie i bezpośrednie.

METODY POŚREDNIE BADANIA PRZEPŁYWU GENÓW

Przepływ genów można badać pośrednio w oparciu o analizy częstości alleli w populacjach. Jednakże sam ich przestrzenny rozkład nie dostarcza informacji o intensywności tego procesu (Slatkin 1987). W tym celu, konieczne jest oszacowanie parametru statystycznego, opisującego rozmieszczenie markerów genetycznych (częstości alleli) w badanych populacjach, a następnie wykorzystanie modelu genetycznego w celu odpowiedzi na pytanie: jak intensywny musiał być przepływ genów pomiędzy populacjami, aby spowodować obserwowany rozkład częstości alleli (Neigel 1997). Idealną metodą pośrednią byłaby taka, która umożliwiałaby badanie przestrzennego rozkładu częstości alleli będącego efektem działania jedynie przepływu genów, wyłączając naturalną selekcję, dryf genetyczny oraz mutacje. Taka sytuacja w praktyce nie istnieje, konieczne jest więc stosowanie uproszczonych modeli, zakładających, że zróżnicowanie genetyczne między populacjami jest efektem wyłącznie przepływu genów poprzez migrację osobników. Większość metod pośrednich oparta jest na tzw. modelu wyspowym (ang. *infinite island model*; Wright 1969) lub modelu kolejnych kroków (ang. *stepping stone model*; Kimura 1953). Pierwszy model zakłada istnienie nieskończenie wielkiej populacji źródłowej, która zasila migrantami, ze stałą częstością, jedną lub więcej skończonych subpopulacji (wysp). Możemy tu mieć do czynienia zarówno z pojedynczą, nieskończenie wielką populacją („kontynent") lub też z nieskończoną liczbą skończonych subpopulacji (całkowita populacja), które zarówno produkują, jak i są zasilane migrantami („nieskończone wyspy").

W przeciwieństwie do modelu wyspowego, gdzie każda subpopulacja może być źródłem migrantów, model kolejnych kroków zakłada, że migracja zachodzi jedynie pomiędzy sub-

populacjami sąsiadującymi ze sobą. Przepływ genów pomiędzy populacjami oddalonymi może odbywać się wyłącznie poprzez łączące je subpopulacje (Neigel 1997).

Stopień zróżnicowania genetycznego między populacjami najczęściej opisywany jest za pomocą parametru F_{st} (Wright 1951), który wyraża prawdopodobieństwo, że dwa losowo wybrane allele z subpopulacji charakteryzują się identycznym pochodzeniem. W populacjach znajdujących się w równowadze Hardy-Weinberga, F_{st} jest miarą redukcji heterozygotyczności spowodowanej różnicami genetycznymi pomiędzy populacjami (Berg, Hamrick 1997, Sork et al. 1998):

$$F_{st} = \frac{H_T - H_S}{H_T},$$

gdzie: H_T – całkowita różnorodność genetyczna, H_S – różnorodność genetyczna wewnątrz populacji.

Parametr F_{st} wykorzystuje się do oceny przepływu genów wyrażonego jako efektywna liczba migrantów na pokolenie (N_em) (Hamrick, Nason 2000):

$$N_em = \frac{1 - F_{st}}{4F_{st}},$$

gdzie: N_e – efektywna liczba osobników w populacji, m – tempo imigracji.

Uważa się, że przepływ genów na poziomie jednego migranta na pokolenie jest już wystarczający by zapobiec utracie zmienności genetycznej powodowanej przez dryf genetyczny (Wright 1969). Miarą zróżnicowania międzypopulacyjnego jest również parametr G_{st} (Nei 1973):

$$G_{st} = \frac{D_{ST}}{H_T},$$

gdzie: D_{ST} – średnia różnorodność genetyczna wśród populacji, H_T – całkowita zmienność genetyczna.

Wartości parametrów F_{st} i G_{st} mogą wahać się w granicach od 0 do 1, a poziom niższy niż 0,05 świadczy o niewielkim zróżnicowaniu genetycznym, tzn. 95% całkowitej zmienności genetycznej znajduje się wewnątrz, a jedynie 5% pomiędzy populacjami. Poziom pomiędzy 0,05 a 0,15 wskazuje na średni, 0,11–0,25 wysoki, a powyżej 0,25 bardzo wysoki poziom zróżnicowania genetycznego między populacjami (Berg, Hamrick 1997).

Główną wadą pośrednich metod badania przepływu genów jest fakt, że stanowią one uśredniony pomiar przepływu genów, obejmujący duży przedział czasowy, czyli wiele pokoleń. Stąd wyniki uzyskane w ten sposób trudno odnieść do pojedynczego pokolenia i aktualnego poziomu przepływu genów, co umożliwiłoby wnikliwą charakterystykę populacji oraz gatunku. Dodatkowo, stosując te metody, nie sposób rozdzielić przepływu genów zachodzącego poprzez pyłek i poprzez nasiona, bowiem uzyskane szacunki stanowią niejako średnią obu procesów (Ellstrand 1992, Sork et al. 1998). Metody pośrednie wymagają stosowania modeli genetycznych, a co za tym idzie, spełnienia wielu założeń. Założenia te są często nierealne lub rzadko spełniane w populacjach naturalnych, np.: stan równowagi genetycznej oraz demograficznej w badanych populacjach, równowaga między dryfem genetycznym a migracją, nieistotność mutacji i selekcji, równy udział imigracji i emigracji pomiędzy badanymi populacjami (Bossard, Pashley Prowell 1998, Slavov et al. 2002). Metody pośrednie nie uwzględniają ponadto dynamiki przepływu genów i dlatego bardziej przydatne są do badań ewolucyjnych.

METODY BEZPOŚREDNIE BADANIA PRZEPŁYWU GENÓW

Badania aktualnego przepływu genów w populacjach roślin prowadzi się w oparciu o metody bezpośrednie. Istotą tych metod jest próba określenia fizycznej odległości, jaką pokonują pyłek i nasiona. Szacowanie intensywności tego procesu odbywa się na podstawie pomiaru odległości dyspersji od punktu wysiewu pyłku i nasion, do miejsca ich sedymentacji (potencjalny przepływ genów), bądź wykorzystując

markery genetyczne do oceny sukcesu kojarzenia i sukcesu reprodukcyjnego osobników rozsiewających pyłek i nasiona (faktyczny przepływ genów) (Levin et al. 1999).

ŚLEDZENIE LOTU PYŁKU I NASION

Pierwsze metody badania przepływu genów opierały się na obserwacji fizycznych możliwości rozprzestrzeniania pyłku i nasion (Slavov et al. 2002). Polegały one na „śledzeniu" lotu ziaren pyłku lub nasion, bądź organizmów je przenoszących, i lokalizowaniu ich w różnych odległościach oraz kierunkach od punktowego źródła dyspersji, którym mógł być pojedynczy osobnik lub względnie mała populacja. Receptorami pyłku mogą być płytki (np. szkiełka mikroskopowe) pokryte wazeliną, a w przypadku nasion proste pułapki nasienne. Dyspersję pyłku i nasion zachodzącą w ramach drzewostanu można również badać stosując barwniki, znakowanie radioaktywne bądź fluorescencyjne, pod warunkiem jednak, że stosowane znaczniki nie wpływają na zdolność dyspersji (Wang, Smith 2002).

Niewątpliwą zaletą takich metod badania przepływu genów jest ich prostota oraz niskie koszty. Dodatkowo, wykorzystując dane dotyczące wysokości, z jakiej pyłek i nasiona są uwalniane, prędkość i kierunek wiatru, turbulencje oraz prędkość opadania, łatwo stworzyć mechanistyczny model przemieszczania pyłku i nasion. Uzyskane dane można wykorzystać do modelowania przepływu genów w większej skali przestrzennej. W przypadku drzew leśnych, bezpośrednie obserwacje lotu pyłku i nasion, jak i organizmów przenoszących je z drzewa na drzewo, bądź z jednej populacji do innej, są raczej trudne do przeprowadzenia (Hamrick, Nason 2000). Drzewa charakteryzują się pokaźnymi rozmiarami, są często wysokie oraz występują w znacznym zagęszczeniu. W tych warunkach ocena długości lotów na dużą skalę i na duże odległości jest w znacznym stopniu utrudniona (Adams 1992). Odpowiedni wybór izolowanych źródeł pyłku lub nasion jest szczególnie trudny podczas badania przepływu genów na duże odległości. Pomiar rozprzestrzeniania ze źródła punktowego uniemożliwia obserwację przemieszczania cząsteczek na odległości większe niż te, wyznaczone przez najdalsze pułapki, nie uwzględnia także możliwości powtórnego ich rozprzestrzeniania przez zwierzęta (Ellstrand 1992). Dodatkowo, populacje drzew leśnych trudno jest uznać za źródło punktowe. Wykorzystanie tej metody jest zatem praktycznie ograniczone do specyficznych układów eksperymentalnych, rzadko spotykanych w populacjach drzew leśnych (Hamrick, Nason 2000).

Bezpośrednie obserwacje dyspersji pyłku i nasion w przestrzeni umożliwiają jedynie ocenę potencjalnego przepływu genów, bowiem faktyczny przepływ zależy nie tylko od zdolności pyłku i nasion do rozprzestrzeniania, ale także od wielu czynników decydujących o możliwości zapłodnienia przez pyłek lub możliwości wykiełkowania nasiona i dalszego wzrostu siewki (Slatkin 1987). Adams (1992) uważa, że takie czynniki, jak konkurencja pomiędzy pyłkiem pochodzącym z różnych źródeł, synchronizacja kwitnienia oraz żerowanie zwierząt, mogą powodować, że faktyczny przepływ genów jest inny niż wynikałoby to z fizycznych zdolności rozprzestrzeniania pyłku i nasion.

ANALIZA RODZICIELSTWA

W badaniach faktycznego przepływu genów zachodzącego w danym cyklu reprodukcyjnym znacznie bardziej przydatne są metody genetyczne oparte na analizie rodzicielstwa. W przypadku drzew, najczęściej bada się w ten sposób przepływ genów poprzez pyłek (analiza ojcostwa). Nasiona zbiera się zazwyczaj z drzew matecznych o znanym genotypie, a analiza ojcostwa polega na określeniu genotypów gamet pyłkowych poprzez porównanie genotypów zarodków nasion z genotypem drzewa matecznego, a następnie porównanie ich z genotypami wszystkich potencjalnych osobników ojcowskich w ramach badanej populacji. Szczególnie dogodnym obiektem badań w tego typu analizach są drzewa iglaste, bowiem w ich nasionach występuje diploidalny zarodek oraz haploidalna

tkanka megagametofitu o genotypie (haplotypie) identycznym z genotypem komórki jajowej tworzącej zarodek. Porównanie genotypu zarodka z haplotypem megagametofitu tego samego nasienia pozwala na jednoznaczne określenie haplotypu gamety męskiej tworzącej zarodek, a dostarczonej przez pyłek (Guries, Ledig 1978, Müller 1977). Z kolei haplotyp megagametofitu nasiona zebranego po wysiewie do pułapek nasiennych, może być wykorzystany do badania przepływu genów poprzez nasiona.

Do określenia genotypów rodziców, jak i potomstwa, wykorzystywane są markery genetyczne, czyli cechy jakościowe organizmu, które podlegają prostym regułom dziedziczenia, zgodnym z prawami Mendla. Można je podzielić na trzy główne klasy: (i) markery morfologiczne (np. brak chlorofilu, specyficzny kształt łusek nasiennych, charakterystyczny kolor liści), (ii) biochemiczne (izoenzymy, terpeny, antygeny) oraz (iii) markery DNA. Wprowadzenie izoenzymów do badań przepływu informacji genetycznej w populacjach drzew leśnych w znacznym stopniu przyczyniło się do rozszerzenia zakresu badań oraz poznania intensywności tego procesu. W ostatnim czasie obserwuje się znaczny wzrost zainteresowania wykorzystaniem markerów DNA, w tym szczególnie mikrosatelitów oraz markerów występujących w DNA chloroplastowym lub mitochondrialnym (Dzialuk, Burczyk 2001).

W najprostszym układzie analiza rodzicielstwa polega na tym, że osobniki dorosłe, które z uwagi na niedopasowanie genotypowe nie mogły uczestniczyć w produkcji badanych osobników potomnych, są kolejno wykluczane z dalszych analiz (metoda wykluczania genotypów). Jeśli prawdopodobieństwo wykluczenia genotypów, które zależy od liczby użytych markerów genetycznych i ich polimorfizmu, jest wystarczająco wysokie, nie wykluczony pozostaje jedynie prawdziwy rodzic lub para rodzicielska. W przypadku, kiedy dla danego osobnika potomnego nie zidentyfikowano żadnych potencjalnych rodziców, traktuje się go jako imigranta. Niestety, z uwagi na niedoskonałość stosowanych obecnie markerów oraz często nielosowy rozkład zmienności genetycznej w populacjach, sytuacja taka w praktyce jest zazwyczaj niemożliwa do osiągnięcia. Metoda wykluczania rodzicielstwa może być zatem efektywna jedynie w przypadku oceny poziomu imigracji pyłku spoza lokalnej populacji. Dokładność tej metody zależy jednak również od jakości użytych markerów. Zdarzyć się może, że imigrujące nasiona lub pyłek będą miały genotypy, które mogą być utworzone przynajmniej przez jednego z osobników lokalnej populacji. Taki ukryty przepływ genów można nadal oceniać – jednak wymaga to zastosowania zaawansowanych metod statystycznych (Burczyk, Chybicki 2004). W badaniach dyspersji genów wewnątrz populacji, z powodu niemożności jednoznacznego przypisania rodzicielstwa jej przydatność jest niewielka.

Alternatywą może być wykorzystanie metody najbardziej prawdopodobnego rodzicielstwa (ang. *most likely method*; Meagher 1986), która zakłada, że osobnikiem ojcowskim jest ten, dla którego odnotowano najwyższą wartość prawdopodobieństwa tranzycji (prawdopodobieństwa segregacji mendlowskiej) (Meagher 1986). Można je definiować jako prawdopodobieństwo utworzenia genotypu danego osobnika potomnego przez określonego rodzica lub parę rodziców (Neff et al. 2001), które wynika z prostych segregacji mendlowskich. Prawdopodobieństwo takie, określone na podstawie wielu loci, pozwala na stosunkowo wierne opisanie struktury kojarzenia w ramach populacji. Prawdopodobieństwo tranzycji jest równe zero, kiedy zarówno matka, jak i ojciec są wykluczeni jako potencjalni rodzice. W tej procedurze, jeśli dla jakiegoś potomka odnaleziono więcej niż jednego osobnika ojcowskiego o jednakowym prawdopodobieństwie, wówczas takiego osobnika potomnego odrzuca się z dalszych analiz. Metoda ta może jednak prowadzić do błędnych szacunków, bowiem faworyzuje ojców posiadających rzadkie allele oraz układ homozygotyczny alleli odpowiadających potomstwu (Brown 1979, Devlin, Ellstrand 1990). Prawdopodobieństwo ojcostwa można jednak podzielić pomiędzy wszystkie niewykluczone osobniki, odpowiednio do ich prawdopodobieństwa tranzycji

(Adams 1992, Devlin, Ellstrand 1990). Metoda częściowego ojcostwa (ang. *fractional paternity*; Devlin, Ellstrand 1990), umożliwia w ten sposób badanie wszystkich osobników potomnych, przy czym niektóre z nich mają ojcostwo przypisane do więcej niż jednego potencjalnego osobnika ojcowskiego. Z biologicznego punktu widzenia wydaje się, że użyteczność tej metody jest niewielka, bowiem w naturze potomstwo może mieć tylko jednego ojca oraz jedną matkę, natomiast częściowe rodzicielstwo w ogóle nie istnieje (Jones, Arden 2003). Badania wskazują jednak na to, że uzyskiwane wyniki charakteryzują się dużą efektywnością statystyczną, szczególnie gdy do badań wykorzystuje się pulę potomstwa znacznie liczniejszą od puli potencjalnych osobników rodzicielskich (Devlin, Ellstrand 1990, Smouse, Maegher 1994). Wykorzystanie dodatkowych informacji dotyczących czynników wpływających na sukces kojarzenia, takich jak odległość i lokalizacja potencjalnych rodziców i nasion, zgodność fenologiczna czy intensywność pylenia, mogą dodatkowo zwiększyć dokładność oceny prawdopodobieństwa ojcostwa (Adams 1992, Neff et al. 2001).

Analiza rodzicielstwa jest stosunkowo prostą metodą, bowiem z reguły nie wymaga informacji o czynnikach wpływających na dyspersję genów. Precyzja uzyskanych wyników jest tym większa, im wyższe jest prawdopodobieństwo wykluczenia oraz mniejsza liczba potencjalnych osobników rodzicielskich. Wykorzystanie tej metody do badania przepływu genów w naturalnych populacjach drzew leśnych jest jednak w znacznym stopniu ograniczone koniecznością zbadania genotypów dużej liczby potencjalnych osobników rodzicielskich, a co za tym idzie, wysokimi kosztami prac laboratoryjnych. Znacznie częściej metodę tę wykorzystuje się do badania przepływu genów w populacjach sztucznych. Główną wadą metod analizy rodzicielstwa jest konieczność stosowania markerów genetycznych o wysokiej sile wykluczania, która jest zdeterminowana przez liczbę loci oraz poziom polimorfizmu (Chakraborty et al. 1998). Jak dotąd, głównym typem markerów genetycznych wykorzystywanych w tym celu były izoenzymy. Wykorzystanie markerów o wyższej sile dyskryminacji, jak np. mikrosatelity, znacznie zwiększa możliwości badawcze, a nawet umożliwia równoczesne badanie przepływu genów poprzez pyłek i nasiona w oparciu o genotypy siewek (Dow, Ashley 1996, Isagi et al. 2000, Konuma et al. 2000). Szacunki przepływu genów z wykorzystaniem analizy rodzicielstwa mogą być jednak zaniżone z powodu tzw. ukrytego przepływu genów, gdy rozróżnienie pomiędzy gametą imigrującą a tą powstałą w lokalnej populacji jest niemożliwe (Devlin, Ellstrand 1990, Savolainen 1991). Podobnie, błędy genotypowania wynikające z występowania alleli typu *null*, mutacje i błędy w odczytywaniu wyników mogą prowadzić do wykluczania rzeczywistych rodziców. Problemy te mogą być szczególnie istotne przy wykorzystaniu wysoce polimorficznych markerów, jak np. mikrosatelity czy AFLP (Ewen et al. 2000, Pemberton et al. 1995).

METODA RZADKICH ALLELI

Metoda rzadkich alleli jest stosunkowo prostym sposobem badania dyspersji genów, wymaga jednak identyfikacji w badanej populacji osobników posiadających rzadkie markery genetyczne. Analiza polega na próbie identyfikacji rzadkich alleli w pokoleniu potomnym. Efektywną dyspersję pyłku szacuje się poprzez zebranie nasion z drzew matecznych rosnących w różnych odległościach od drzewa ojcowskiego posiadającego rzadki allel. Z kolei ocenę dyspersji nasion można prowadzić w oparciu o analizę nasion lub siewek odnajdywanych w różnych odległościach od drzewa matecznego, u którego stwierdzono występowanie takiego allelu. Zazwyczaj w populacji występuje zaledwie kilka drzew posiadających rzadkie markery, stąd trudno na tej podstawie wnioskować o intensywności dyspersji genów dla całego gatunku (Müller-Starck 1982, Yazdani et al. 1989).

METODY MODELU KOJARZENIA

W badaniach przepływu genów coraz szerzej wykorzystywane są metody, które polegają na modelowaniu struktury prawdopodobieństwa

całej próby genotypów potomstwa i szacowaniu parametrów opisujących przepływ genów (Adams et al. 1996, Elle, Meagher 2000, Morgan, Conner 2001, Smouse et al. 1999). Parametry dyspersji genów szacowane są za pomocą metod największej wiarygodności bądź innych procedur estymacji, na podstawie częstości występowania genotypów w potomstwie, a nie, jak w analizie rodzicielstwa, w oparciu o zidentyfikowane pary rodzic–potomstwo (Adams 1992). Przykładem tego typu oceny przepływu genów jest model kojarzenia w sąsiedztwie, który zakłada, że potomstwo danego drzewa matecznego powstaje na podstawie trzech procesów:

- samozapłodnienia, kiedy pyłek pochodzi od tego samego drzewa matecznego,
- zapłodnienia krzyżowego z osobnikami męskimi znajdującymi się w bliskim, dowolnie zdefiniowanym sąsiedztwie,
- zapłodnienia krzyżowego z osobnikami męskimi spoza określonego obszaru sąsiedztwa.

Model kojarzenia umożliwia określenie przepływu genów za pośrednictwem pyłku i nasion w obrębie sąsiedztwa i dopływu spoza lokalnej populacji, określenie poziomu samozapłodnienia, zbadanie związków pomiędzy sukcesem kojarzenia osobników z obszaru sąsiedztwa a czynnikami wpływającymi na ten sukces, zbadanie najbardziej prawdopodobnego kierunku napływu pyłku i nasion oraz ocenę efektywnej wielkości populacji (Adams et al. 2002, Burczyk et al. 2004).

Ostatnio Smouse i współautorzy (2001) zaproponowali nową metodę, określaną mianem TwoGener, która w przeciwieństwie do analizy ojcostwa nie wymaga określenia genotypów wszystkich potencjalnych ojców. Metoda ta polega na porównaniu zróżnicowania genetycznego wewnątrz i między pulami gamet pyłkowych tworzących potomstwo wybranych drzew matecznych. Duże zróżnicowanie świadczy tu o ograniczonej dyspersji. Metoda ma wiele założeń, np. brak przestrzennej struktury genetycznej, nie bierze również pod uwagę zróżnicowania intensywności pylenia osobników męskich oraz problemów zgodności fenologii kwitnienia itd. Jest to jednak metoda stosunkowo nowa i stale udoskonalana. Obecnie prowadzi się wiele prac zmierzających do zbadania jej efektywności i właściwości statystycznych (Austerlitz et al. 2004, Dyer et al. 2004).

Żadna z omówionych metod badania przepływu genów nie jest metodą uniwersalną. Każda prezentuje unikalny zestaw wad i zalet. Przyjmuje się, że jeśli jest to tylko możliwe, metody pośrednie oraz bezpośrednie powinny być wykorzystywane jednocześnie, ponieważ charakteryzują różne aspekty przepływu genów (Raybould et al. 1987), a ich wnikliwa analiza pozwala na dogłębne poznanie przepływu genów u roślin.

PODSUMOWANIE

Dyspersja pyłku oraz nasion jest przedmiotem badań ekologów. Zagadnieniem rozprzestrzeniania pyłku zajmuje się także palinologia. Literatura w tym zakresie jest niezwykle bogata (Cain et al. 2000, Farmer 1997, Lanner 1998). Informacje uzyskane drogą bezpośrednich obserwacji długości lotów pyłku i nasion nie są jednak wystarczające dla pełnego poznania strategii reprodukcyjnych poszczególnych gatunków. Metody genetyczne umożliwiają badanie faktycznego przepływu genów zarówno poprzez pyłek (na etapie nasion zebranych z osobników matecznych), jak i poprzez nasiona (na etapie nasion po naturalnym wysiewie). Dodatkowym atutem takich badań jest także możliwość badania intensywności przepływu genów w warunkach naturalnych, tzn. w drzewostanach, gdzie źródłem pyłku i nasion mogą być teoretycznie wszystkie zdolne do reprodukcji osobniki tworzące daną populację. Badania dyspersji metodami bezpośrednimi często ograniczają się do określenia średniej odległości przebytej przez pyłek lub nasiona ze źródła punktowego (np. balonu lub wieży), a znacznie rzadziej z izolowanej populacji bądź skraju lasu. Uzyskane w ten sposób wyniki są obarczone znacznym błędem, ponieważ zakładają, że drzewostan jest zbiorem źródeł punktowych, a dyspersja w takiej populacji jest wynikiem prostego nakładania się dyspersji z wielu drzew. Takie podejście stanowi

znaczne uproszczenie, bowiem całkowicie ignoruje możliwość zróżnicowanego udziału poszczególnych osobników danej populacji w procesach reprodukcyjnych. Z kolei wyniki uzyskane w populacjach izolowanych i na skrajach lasu wydają się być słuszne wyłącznie dla badanych układów eksperymentalnych, w których panują specyficzne warunki klimatyczne, w znacznym stopniu odbiegające od tych, które spotykamy w naturalnych zwartych drzewostanach. Metody bezpośrednie pomijają możliwość zmienności dyspersji genów w czasie lub też uzyskane wyniki podawane są z zastrzeżeniem, że odnoszą się do lat dobrego bądź słabego urodzaju. Wykorzystanie markerów genetycznych pozwala badać nie tylko dyspersję pyłku i nasion, ale także identyfikować czynniki wpływające na męski oraz żeński sukces reprodukcyjny (Burczyk et al. 2004, Burczyk et al. 1996, Dow, Ashley 1996, Dow, Ashley 1998).

Pomimo dużego znaczenia teoretycznego oraz praktycznego, wiedza na temat przepływu genów w populacjach drzew leśnych jest w dużej mierze ograniczona. Znaczna część literatury w tym zakresie dotyczy w zasadzie jedynie fizycznej dyspersji pyłku i nasion. Metody genetyczne umożliwiają poszerzenie naszej wiedzy w tym zakresie. W ostatnim dziesięcioleciu obserwuje się bardzo intensywny rozwój nowych technik laboratoryjnych umożliwiających badanie zmienności genetycznej na poziomie DNA oraz rozwój nowych metod statystycznych (Austerlitz et al. 2004, Burczyk et al. 2002, Burczyk, Chybicki 2004, Smouse et al. 2001). W badaniach przepływu genów najbardziej przydatnymi markerami są sekwencje mikrosatelitarne DNA. W połączeniu z możliwością badania u drzew trzech genomów (jądrowego, chloroplastowego oraz mitochondrialnego), które często nawet w obrębie poszczególnych gatunków charakteryzują się odmiennym sposobem dziedziczenia, metody genetyczne dają zupełnie nowe możliwości badawcze. Należy się spodziewać, że w najbliższych latach narzędzia te będą niezwykle intensywnie wykorzystywane w badaniach przepływu genów wewnątrz- i pomiędzy populacjami (Burczyk et al. 2004).

LITERATURA

Adams W. T. 1992. Gene dispersal within forest tree populations. *New Forests* **6**: 217–240.

Adams W. T., Birkes D. S. 1991. Estimating mating patterns in forest tree populations. W: S. Fineschi, M. E. Malvolti, F. Cannata, H. H. Hattemer (red.), Biochemical markers in the population genetics of forest trees. SPB Academic Publishing, Haga, s. 157–172.

Adams W. T., Burczyk J. 2000. Magnitude and implications of gene flow in gene conservation recerves. W: A. Young, D. Boshier, T. Boyle (red.), Forest Conservation genetics: principles and practice. SCIRO Publishing, Collingwood, s. 215–244.

Austerlitz F., Dick C. W., Dutech C., Klein E. K., Oddou-Muratorio S., Smouse P. E., Sork V. L. 2004. Using genetic markers to estimate the pollen dispersal curve. *Mol. Ecol.* **13**: 937–954.

Baker R. R. 1978. The evolutionary ecology of animal migration. Holmes & Meier, New York, USA.

Berg E. E., Hamrick J. L. 1997. Quantification of genetic diversity at allozyme loci. *Canad. J. Forest Res.* **27**: 415–424.

Bossard J. L., Pashley Prowell D. 1998. Genetic estimates of population structure and gene flow: limitations, lessons and new directions. *Tree* **13**: 202–206.

Brown A. H. D. 1979. Enzyme polymorphism in plant populations. *Theor. Pop. Biol.* **15**: 1–42.

Burczyk J. 1998. Systemy kojarzenia drzew iglastych. Wydawnictwo Uczelniane WSP, Bydgoszcz.

Burczyk J., Chybicki I. 2004. Cautions on direct gene flow estimation in plant populations. *Evolution* **58**: 956–963.

Burczyk J., Adams W. T., Shimizu J. Y. 1996. Mating patterns and pollen dispersal in a natural knobcone pine (*Pinus attenuata* Lemmon) stand. *Heredity* **77**: 251–260.

Burczyk J., Difazio S. P., Adams W. T. 2004. Gene flow in forest trees: How far do genes really travel? *Forest Genet.* **11**: 179–192.

Burczyk J., Adams W. T., Moran G. F., Griffin A. R. 2002. Complex patterns of mating revealed in a *Eucalyptus regnans* seed orchard using allozyme markers and the neighborhood model. *Mol. Ecol.* **11**: 2379–2391.

Cain M. L., Milligan B. G., Strand A. E. 2000. Long-distance seed dispersal in plant populations. *Am. J. Bot.* **87**: 1217–1227.

Chakraborty R., Meagher T. R., Smouse P. E. 1998. Parentage analysis with genetic markers in natural populations. I. The expected proportion of offspring with unambiguous paternity. *Genetics* **118**: 527–536.

DAYANANDAN S., DOLE J., BAWA K., KESSELI R. 1999. Population structure delineated with microsatellite markers in fragmented populations of a tropical tree *Carapa guianensis* (Meliaceae). *Mol. Ecol.* **8**: 1585–1592.

DEVLIN B., ELLSTRAND N. C. 1990. The development and application of refined method for estimating gene flow from angiosperm paternity analysis. *Evolution* **44**: 248–259.

DEVLIN B., ROEDER K., ELLSTRAND N. C. 1988. Fractional paternity assignment: theoretical development and comparison to other methods. *Theor. Appl. Genet.* **76**: 369–380.

DIFAZIO S. P., SLAVOV G. T., BURCZYK J., LEONARDI S., STRAUSS S. H. 2004. Gene flow from tree plantations and implications for transgenic risk assessment. W: C. WALTER, M. CARSON (red.), Plantation Forest Biotechnology for the 21st Century. Research Signpost, Kerala, s. 405–422.

DOW B. D., ASHLEY M. V. 1996. Microsatellite analysis of seed dispersal and parentage of saplings in bur oak (*Quercus macrocarpa*). *Mol. Ecol.* **5**: 615–627.

DOW B. D., ASHLEY M. V. 1998. Factors influencing male mating success in bur oak, *Quercus macrocarpa*. *New Forests* **15**: 161–180.

DYER R. J., WESTFALL R. D., SORK V. L., SMOUSE P. E. 2004. Two-generation analysis of pollen flow across a landscape V: a stepwise approach for extracting factors contributing to pollen structure. *Heredity* **92**: 204–11.

DZIALUK A., BURCZYK J. 2001. Molekularne markery DNA jako narzędzie badawcze genetyki drzew leśnych. *Sylwan* **8**: 67–83.

ELLE E., MEAGHER T. R. 2000. Sex allocation and reproductive success in the andromonoecious perennial *Solanum carolinense* (Solanaceae). II. Paternity and functional gender. *Am. Nat.* **6**: 622–636.

ELLSTRAND N. C. 1992. Gene flow among seed plant populations. *New Forests* **6**: 241–256.

ELLSTRAND N. C., ELAM D. R. 1993. Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **24**: 217–242.

ERIKSSON G., EKBERG I. 2001. An introduction to forest genetics. Uppsala.

EWEN K. R., BAHLO M., TRELOAR S. A., LEVINSON D. F., MOWRY B., BARLOW J. W., FOOTE S. J. 2000. Identification and analysis of error types in high-throughput genotyping. *Am. J. Hum. Gene.* **67**: 727–736.

FARMER R. E. 1997. Seed ecophysiology of temperate and boreal zone forest trees. Dispersal. St. Lucie Press, Delray Beach, s. 45–65.

GEBUREK T. 2001. Sexual reproduction. W: Training Manual: International Training Programme: Conservation and Management of Forest Genetic Resources in Eastern Europe. Gmunden.

GODT M. J. W., HAMRICK J. L. 1993. Patterns and levels of pollen-mediated gene flow in *Lathyrus latifolius*. *Evolution* **47**: 98–110.

GURIES R. P., LEDIG T. F. 1978. Inheritance of some polymorphic isozymes in pitch pine (*Pinus rigida* Mill.). *Heredity* **40**: 27–32.

HAMRICK J. L., GODT M. J., SHERMAN-BROYLES S. L. 1992. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New Forests* **6**: 95–124.

HAMRICK J. L., NASON J. D. 2000. Gene flow in forest trees. W: A. YOUNG, D. BOSHIER, T. BOYLE (red.), Forest Conservation genetics: principles and practice. SCIRO Publishing, Collingwood, s. 81–90.

HARTL D. L., CLARK A. G. 1989. Principles of population genetics. Sinauer Assocs. INC., Sunderland, Massachusetts, USA.

HEDRICK P. W. 2000. Genetics of populations. Jones & Bartlett Pub. Boston, Massachusetts, USA.

ISAGI Y., KANAZASHI T., SUZUKI W., TANAKA H., ABE T. 2000. Microsatellite analysis of regeneration process of *Magnolia obovata* Thunb. *Heredity* **84**: 143–151.

JONES A. G., ARDEN W. R. 2003. Methods of parentage analysis in natural populations. *Mol. Ecol.* **12**: 2511–2523.

KIMURA M. 1953. "Stepping-stone" model of population. *Ann. Rep. Nat. Inst. Genet.* **3**: 62–63.

KONUMA A., TSUMURA Y., LEE C. T., LEE S. L., OKUDA T. 2000. Estimation of gene flow in the tropical rainforest tree *Neobalanocarpus heimii* (Dipterocarpaceae), inferred from paternity analysis. *Mol. Ecol.* **9**: 1843–1852.

LANNER R. M. 1998. Seed dispersal in *Pinus*. W: D. M. RICHARDSON (red.), Ecology and Biogeography of *Pinus*. Cambridge University Press. Cambridge, s. 281–295.

LEVIN D. A. 1981. Dispersal versus gene flow in plants. *Ann. Mo. Bot. Gard.* **68**: 233–253.

LEVIN D. A., KERSTER H. W. 1974. Gene flow in seed plants. W: T. DOBZHANSKY, M. T. HECHT, W. C. STEEVE (red.), Evolutionary biology. Plenum Press, New York, s. 139–220.

LEWANDOWSKI A., BURCZYK J., WACHOWIAK W., BORATYŃSKI A., PRUS-GŁOWACKI W. 2005. Genetic evaluation of seeds of highly endangered *Pinus uliginosa* Neumann from Węgliniec reserve for ex-situ conservation program. *Acta Soc. Bot. Pol.* **74**: 237–242.

LIBBY W. J. 1987. Genetic resources and variation in forest trees. W: Improving vegetatively propagated crops. Academic Press Ltd., s. 199–209.

MCCAUGHEY W. W., SCHMIDT W. C., SHEARER R. C. 1986. Seed-dispersal characteristics of conifers in the inland mountain West. W: R. C. SHEARER. Proceedings – Conifer Tree Seed in the Inland Mountain West Symposium. Ogden, s. 50–62.

MEAGHER T. R. 1986. Analysis of paternity within a natural population of *Chamaelirium luteum*. *Am. Nat.* **128**: 199–215.

MEAGHER T. R., THOMPSON E. 1987. Analysis of parentage for naturally established seedlings of *Chamaelirium luteum* (Liliaceae). *Ecology* **68**: 803–812.

MORGAN M. T., CONNER J. K. 2001. Using genetic markers to directly estimate male selection gradients. *Evolution* **55**: 272–281.

MÜLLER G. 1977. Investigations on the degree of natural self-fertilization in stands of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst. and Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Silvae Genet.* **26**: 207–217.

MÜLLER-STARCK G. 1982. Reproductive systems in conifer seed orchards. 1. Mating probabilities in a seed orchard of *Pinus sylvestris* L. *Silvae Genet.* **31**: 188–197.

NEFF B. D., REPKA J., GROSS M. R. 2001. A Bayesian framework for parentage analysis: The value of genetic and other biological data. *Theor. Popul. Biol.* **59**: 315–331.

NEI M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **70**: 3321–3323.

NEIGEL J. E. 1997. A comparison of alternative strategies for estimating gene flow from genetic markers. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **28**: 105–128.

PALMBERG-LERCHE CH. 1999. Conservation and management of forest genetic resources. *J. Trop. Res.* **11**: 286–302.

PEMBERTON J. M., SLATE J., BANCROFT D. R., BARNETT J. A. 1995. Nonamplifying alleles at microsatellite loci: a caution for parentage and population studies. *Mol. Ecol.* **4**: 249–252.

RAYBOULD A. F., CLARK R. T. 1999. Defining and measuring gene flow. W: BCPC Symposium Proceedings No. 72: Gene flow and agriculture: relevance for transgenic crops, s. 41–48.

SAVOLAINEN O. 1991. Background pollination in seed orchards. W: D. LINDGREN, Proceedings of the IUFRO Meeting of the Nordic Group for Tree Breeding 1991. Swedish University of Agricultural Sciences, Department of Forests Genetics and Plant Physiology, Umea, s. 6–13.

SAVOLAINEN O., KÄRKKÄINEN K., KUITTINEN H. 1992. Estimating numbers of embryonic lethals in conifers. *Heredity* **69**: 308–314.

SLATKIN M. 1987. Gene flow and geographic structure of natural populations. *Science* **236**: 787–792.

SLAVOV G. T., DIFAZIO S. P., STRAUSS S. H. 2002. Gene flow in forest trees: From empirical estimates to transgenic risk assessment. W: Meeting Proceedings: Ecological and Agronomic Consequences of Gene Flow from Transgenic Crops to Wild Relatives. Columbus.

SMOUSE P. E., MAEGHER T. 1994. Genetic analysis of male reproductive contributions in *Chamaelirium luteum* (L.) Gray (Liliaceae). *Genetics* **136**: 313–322.

SMOUSE P. E., DYER R. J., WESTFALL R. D., SORK V. L. 2001. Two-generation analysis of pollen flow across a landscape. I. Male gamete heterogeneity among females. *Evolution* **55**: 260–271.

SMOUSE P. E., MAEGHER T., KOBAK C. 1999. Parentage analysis in *Chamaelirium luteum* (L.) Gray (Liliaceae): why do some males have higher reproductive contributions? *J. Evol. Biol.* **12**: 1069–1077.

SORK V. L., CAMPBELL D., DYER R., FERNANDEZ J., NASON J., PETIT R., SMOUSE P., STEINBERG E. 1998. Proceedings from a workshop on gene flow in fragmented, managed and continuous populations. Research paper No. 3, National Center for Ecological Analysis and Synthesis, Santa Barbara, California.

SORK V. L., NASON J., CAMPBELL D. R., FERNANDEZ J. F. 1999. Landscape approaches to historical and contemporary gene flow in plants. *Tree* **14**: 219–224.

SQUILLACE A. E., LONG E. M. 1981. Proportion of pollen from nonorchard sources. W: E. C. FRANKLIN, Pollen management handbook. US Department of Agriculture, Forest Service, Washington, s. 15–19.

WANG B. J., SMITH T. B. 2002. Closing the seed dispersal loop. *Trends Ecol. Evol.* **17**: 379–395.

WILLIAMS C. G., SAVOLAINEN O. 1996. Inbreeding depression in conifers: implications for breeding strategy. *Forest. Sci.* **42**: 102–117.

WRIGHT S. 1951. The genetical structure of populations. *Ann. Eug.* **15**: 323–354.

WRIGHT S. 1969. Evolution and the genetics of populations, Vol. 2. The theory of gene frequencies. The University of Chicago Press, Chicago.

YAZDANI R., LINDGREN D., STEWART S. 1989. Gene dispersion within a population of *Pinus sylvestris*. *Scand. J. Forest Res.* **4**: 295–306.