



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Genetic structure and post-pollination selection in biennial plants

Korbecka, G.

Citation

Korbecka, G. (2004, December 9). *Genetic structure and post-pollination selection in biennial plants*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/560>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Leiden University Non-exclusive license](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/560>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

SUMMARY

In my thesis, I studied a number processes that have an influence on a genetic constitution of offspring in plants. These processes are (1) mating (pollination), (2) post-pollination selection and (3) selective embryo abortion.

Mating in plants

Plants have little influence on their mate choice before pollination. Since they are unable to move, they can not search for the suitable pollen donor. Instead they depend on pollinators and abiotic factors in transfer of their pollen. The pollinators often transfer pollen among neighboring plants. In populations with a genetic structure, such pollination may lead to crosses among related individuals (biparental inbreeding) and as a result plants may experience inbreeding depression even in seeds that are not selfed. Therefore, a presence of the genetic structure can have an important influence on plant reproduction.

I tested for a genetic structure in two biennial plants *Echium vulgare* and *Cynoglossum officinale* in order to estimate the amount of biparental inbreeding. Both species are pollinated by bumblebees known for their tendency to visit neighboring plants. I mapped and sampled flowering plants from natural populations and analyzed the genetic structure using seven polymorphic microsatellite loci per species. The analysis showed that the genetic structure among the flowering of both species can not intensify inbreeding. The estimated amount of biparental inbreeding does not exceed 2 % for *E. vulgare* and *C. officinale*. The average kinship coefficients per distance class were significantly higher than zero for both species only in the first distance interval, suggesting a genetic structure at a very small scale, probably due to leptocurtosis of gene dispersal curves. The genetic structure of both species appeared to be very weak compared to data published for 17 herbaceous species with similar pollen and seed dispersal.

Post-pollination selection

Because opportunities to choose mates prior to pollination are limited in plants, post-pollination mate choice is essential for sexual selection in plants. Genetically diverse pollen grains landing on a stigma may differ in ability to adhere to the surface of the stigma, to germinate on its surface and to form a pollen tube that can reach the ovule. Many studies have shown also that pollen from different donors may differ with respect to the speed of pollen tube growth and fast growing pollen has higher fertilization success when applied to the stigma in a mixture of pollen from different donors. The term *pollen competition* is frequently used to describe such observations.

Pollen competition is believed to be a mechanism of so called cryptic self-incompatibility (CSI). If self-pollen grows slower than outcross pollen, it will have an equal fertilization success when applied in single donor treatment but a lower success if the two pollen types are applied together to the stigma. The concept of CSI is appealing to many researchers, although it is still unclear whether or not it is a common phenomenon. I studied CSI in *Echium vulgare*, which shows low selfing rates in the field. I chose this species, because its selfing rates are much lower than the theoretical

predictions based on the plant size and pollen dynamics, suggesting that post pollination selection against selfing takes place. I used twenty genotypes, combined in 10 pairs for 3 pollination treatments: self-pollination, outcrossing (reciprocal cross within each pair) and pollination with mix pollen from both donors. A sample of 10 seeds per plant from the mix pollination treatment was genotyped with microsatellite loci. No effects of selection against selfing over all 20 genotypes were found. However, for 2 genotypes we found significant CSI. I detected maternal and paternal effects on pollen tube growth and maternal effects on pollen germination. However, there were no significant differences in pollen germination and growth between self and outcross pollen averaged overall 20 genotypes. Pollen tube growth and germination in the two genotypes that showed CSI were not different from that in plants that did not show CSI. Therefore, I found no evidence that CSI in *E. vulgare* is due to pre-zygotic mechanisms.

Selective embryo abortion

Embryo abortion provides also an opportunity to alter the genetic constitution of the offspring if embryos can be selectively aborted depending on their genotype. Selective embryo abortion (SEA) will be adaptive if embryos of genotypes that would perform worse later in life are preferentially aborted. Then SEA would lead to the investment of resources in the offspring with the highest potential fitness only. Many studies have shown that otherwise viable embryos are aborted. However, only few studies, - all on the level of the phenotype, indeed have shown a correlation between the level of abortion and offspring quality and these studies have been challenged for their experimental design.

I searched for another way of studying of SEA – on the level of genotype. Non-random abortion at the level of molecular markers can be observed as a deviation from Mendelian segregation: over- or under-representation of markers in the offspring. If embryo abortion is commonly found in plants, and if it is selective, many genetic maps of plants should detect non-Mendelian segregation of molecular markers. I reviewed the literature on the genetic maps of plants and found that the level of non-Mendelian segregation found in these genetic maps is high. On average, 11.5 % of the tested markers in the genetic maps of wild species and 14.6 % - in the cultivated ones, show a departure from Mendelian segregation. Based on the six genetic maps, providing sufficient data, I calculated that in 68% of loci segregating in non-Mendelian fashion post-fertilisation selection is involved. This shows that there is a potential for detecting selective embryo abortion using a genetic map.

SAMENVATTING

In mijn proefschrift bestudeer ik een aantal processen die de genetische constitutie van de nakomelingen van een plant beïnvloeden. Deze processen zijn: (1) bestuiving, (2) selectie na bestuiving en (3) selectieve embryo-abortus.

Bestuiving bij planten

Omdat planten zich niet kunnen voortbewegen kunnen ze ook niet op zoek naar de meest geschikte partner. Zij hebben dus weinig invloed op de aanvoer van stuifmeel door andere planten. Daarvoor zijn ze afhankelijk van bestuivers of wind- of waterstromen. Bestuivers verspreiden het pollen vaak tussen naburige planten. In populaties met een sterke genetische structuur kunnen zulke bestuivingen leiden tot kruisingen tussen genetisch verwante individuen (biparental inbreeding). Als resultaat daarvan kunnen planten last hebben van inteeltdepressie, zonder dat de zaden door zelfbestuiving zijn ontstaan. De genetische structuur van de populatie kan daarom een belangrijke invloed hebben op het reproductieve succes van de planten.

Ik heb de genetische structuur bestudeerd van twee tweejarige plantensoorten: *Echium vulgare* (slangekruid) en *Cynoglossum officinale* (veldhondstong). Op basis daarvan heb ik een schatting gemaakt van de hoeveelheid biparental inbreeding. Beide soorten worden bestoven door hommels. Van hommels is bekend dat ze heel vaak naburige planten achter elkaar bezoeken. Ik heb de planten in kaart gebracht en verzameld in natuurlijke populaties en de genetische structuur geanalyseerd met behulp van zeven polymorfe microsatellietloci voor iedere soort. De analyse liet zien dat de genetische structuur van de bloeiende planten zo zwak was dat dit niet leidde tot biparental inbreeding. De geschatte hoeveelheid biparental inbreeding bedroeg ten hoogste 2% voor beide soorten. De gemiddelde verwantschapscoëfficiënt voor de verschillende afstandsklassen was alleen significant groter dan nul voor de kleinste afstandsklasse (tot 1,48 m voor *E. vulgare* en tot 6,49 m voor *C. officinale*). Dit laat zien dat alleen op heel kleine schaal een genetische structuur aanwezig was. Dit laatste is waarschijnlijk het gevolg van een leptokurtische vorm van de genverspreidingscurve. In vergelijking met literatuurdata van 17 andere kruidachtige soorten, met vergelijkbare vormen van pollen- en zaadverspreiding, was de genetische structuur van de door mij onderzochte soorten zwak.

Selectie na bestuiving

Omdat de mogelijkheden voor partnerkeuze voor de bestuiving dus zeer gering zijn, spelen bij planten processen na de bestuiving een essentiële rol bij sexuele selectie. Genetische verschillende pollenkorrels die op een stamper landen kunnen verschillen in het vermogen om zich te hechten aan het oppervlak van de stamper, om te kiemen op het oppervlak van de stamper of om een pollenbuis te vormen die de ovula kan bereiken. Veel studies hebben laten zien dat pollenkorrels van verschillende planten niet allemaal even snel groeiende pollenbuizen maken. Ook hebben zij laten zien dat snelgroeiende pollenbuizen een grotere kans hebben om de ovula te bevruchten wanneer een mix van pollen van verschillende vaders op de stamper aanwezig is. In verband hiermee wordt veelal de term pollenconcurrentie (*pollen competition*) gebruikt.

Pollenconcurrentie wordt geacht medeverantwoordelijk te zijn voor zgn. cryptische zelfincompatibiliteit (CSI). Als pollen van dezelfde plant (eigen pollen) langzamer groeit dan pollen van ander genotype (vreemd pollen), kan het nog steeds hetzelfde bestuivingssucces hebben als vreemd pollen indien per bloem maar één type pollen aanwezig is. Echter wanneer beide type pollen tegelijkertijd op een stigma aanwezig zijn, dan verwachten we dat het vreemde pollen de race om de bevruchting van ovula wint en dus succesvoller is. Het idee van CSI spreekt veel onderzoekers aan, hoewel het nog steeds onduidelijk is hoe vaak het voor komt. Ik bestudeerde CSI bij *Echium vulgare*. Deze soort heeft een lage zelfbestuivingsgraad in natuurlijke populaties. Ik koos deze soort omdat de zelfbestuivingsgraad veel lager bleek te zijn dan wat op grond van theoretische modellen over pollen dynamica voorspeld werd. Dit laatste suggereert dat na de bestuiving selectie tegen eigen pollen kan optreden. Ik gebruikte 20 genotypen die gecombineerd werden in 10 paren. Drie bestuivingstypen werden toegepast: zelfbestuiving, kruisbestuiving (wederzijds binnen ieder paar) en bestuiving met een mix van pollen van beide planten. Vervolgens werd het genotype van 10 zaden van het gemengde bestuivingstype per plant bepaald met behulp van microsatielieten. Gemiddeld over alle 20 planten werd er geen aanwijzing voor selectie tegen zelfbestuiving gevonden. Echter, voor twee moederplanten vonden we statistisch significante aanwijzingen voor CSI. Ik bepaalde de maternale en paternale effecten op pollenbuisgroei en de maternale effecten op pollenkieming. Gemiddeld over alle 20 planten waren hierin geen verschillen tussen zelf en kruisbestuiving. Bovendien bleken de pollenkieming en de pollenbuis groei niet verschillend voor de planten met of zonder CSI. Ik vond dus geen aanwijzingen dat CSI het gevolg is van selectie in de periode tussen bestuiving en bevruchting.

Selectieve embryo abortus (SEA)

Het aborteren van embryo's geeft een mogelijkheid om de genetische samenstelling van het nakomelingschap te beïnvloeden, als de selectie genotype-afhankelijk is. SEA kan adaptief zijn als vooral die embryo's geaborteerd worden die later in het leven weinig kans op succes zouden hebben. SEA leidt er dan toe dat er meer geïnvesteerd kan worden in nakomelingen met een grote kans op succes later in het leven. Veel studies hebben laten zien dat potentieel levensvatbare embryo's geaborteerd worden. Weinig studies hebben echter laten zien dat er een verband is tussen de hoeveelheid aborti en de kwaliteit van de wel geproduceerde zaden. De meeste van deze studies zijn alleen gebaseerd op het fenotype van de nakomelingen en zijn aan kritiek onderhevig vanwege de gebruikte onderzoeksmethoden. Ik heb gezocht naar een betere experimentele benadering gebaseerd op het genotype. Selectieve abortus manifesteert zich als niet-Mendelse overerving op het niveau van moleculaire merkers. Sommige merkers zijn dan onder- of over vertegenwoordigd in het nakomelingschap. Ik heb een literatuurstudie gedaan naar het voorkomen van niet-Mendelse overerving in genetische kaarten. Die studie laat zien dat niet-Mendelse overerving frequent voorkomt. Gemiddeld laat 11.5 % van de geteste merkers bij wilde soorten en 14.6% bij gekweekte soorten een significante afwijking van Mendelse overerving zien. Zes van de onderzochte kaarten boden bovendien de mogelijkheid om te onderzoeken of deze

afwijking het gevolg was van selectie na de bevruchting. Dat bleek in 68% van de merkers die niet-Mendels overerfden het geval. Dit hoge percentage laat zien dat het potentieel heel goed mogelijk is om selectieve abortus aan te tonen met behulp van genetische kaarten.

STRESZCZENIE

W niniejszej pracy badałam wiele procesów mających wpływ na genotyp potomstwa u roślin. Te procesy to: (1) kojarzenia (zapylenie) (2) dobór działający po zapyleniu oraz (3) selektywne aborcje zarodków.

Kojarzenia u roślin

Rośliny mają niewielki wpływ na wybór partnera przed zapyleniem. Ponieważ nie mają zdolności poruszania się, nie mogą szukać odpowiedniego dawcy pyłku. Zamiast tego, są zależne od zapylających owadów lub czynników abiotycznych transportujących pyłek. Owady zapylające często przenoszą pyłek w obrębie sąsiadujących z sobą roślin. W populacjach posiadających strukturę genetyczną, takie zapylenia mogą prowadzić do krzyżowania osobników blisko spokrewnionych (obu rodzicielski chów wsobny, *biparental inbreeding*) w wyniku czego rośliny mogą doświadczać depresji wsobnej, nawet jeśli siewki pochodzą z zapylenia krzyżowego. Tak więc, obecność struktury genetycznej może mieć istotny wpływ na reprodukcję roślin.

W mojej pracy badałam strukturę genetyczną dwóch roślin dwuletnich *Echium vulgare* i *Cynoglossum officinale* w celu oszacowania stopnia obu rodzicielskiego chowu wsobnego. Oba gatunki są zapylane przez trzmiele, znane z tendencji do odwiedzania sąsiadujących ze sobą roślin. Zmapowałam i pobrałam próbki kwitnących roślin z populacji naturalnych, oraz zanalizowałam strukturę genetyczną używając siedmiu polimorficznych loci mikrosatelitarnych dla każdego gatunku. Analiza pokazała, że struktura genetyczna wśród kwitnących osobników obu gatunków nie może wzmacniać oburodzicielskiego chowu wsobnego.

Oszacowany poziom inbredu oburodzicielskiego nie przekracza 2% u *E. vulgare* i *C. officinale*. Średnie współczynniki pokrewieństwa na klasę odległości dla obu gatunków, były istotnie wyższe od zera wyłącznie dla pierwszego przedziału odległości, co sugeruje strukturę genetyczną w bardzo małej skali, prawdopodobnie ze względu na rozkład leptokurtyczny krzywych dyspersji genów. Struktura genetyczna obu gatunków wydaje się być bardzo słaba, w porównaniu z danymi dla 17 gatunków innych roślin zielnych, posiadających podobny sposób przenoszenia pyłku i rozsiewania nasion.

Dobór działający po zapyleniu

Ponieważ u roślin możliwości wyboru partnera przed zapyleniem są ograniczone, dobór działający po zapyleniu ma kluczowe znaczenie dla doboru płciowego. Genetycznie różne ziarna pyłku osiadające na znamieniu mogą różnić się co do zdolności przylegania do znamienia, kiełkowania na jego powierzchni, oraz co do formowania łagiewki, która sięga do woreczka załążkowego. W wielu pracach pokazano, że pyłki pochodzące od różnych dawców, mogą różnić się co do szybkości kiełkowania łagiewki, a szybko kiełkujący pyłek ma większe prawdopodobieństwo zapłodnienia. Termin konkurencja pyłków (*pollen competition*) jest często używany aby opisać podobne zjawisko.

Konkurencja pyłków jest uważana za mechanizm tzw. kryptycznej samo niezgodności (*cryptic self-incompatibility*, CSI). Własny pyłek może kiełkować wolniej niż pyłek pochodzący z innej rośliny. Wolniejsze kiełkowanie nie ma znaczenia gdy pyłek od jednego dawcy sam trafia na znamię. Natomiast gdy własny pyłek i szybciej kiełkujący pyłek od innego dawcy zostaną jednocześnie nałożone na znamię, dochodzi do konkurencji o zapłodnienie zalążków i w efekcie większość nasion będzie efektem zapylenia krzyżowego. Będzie to miało takie same efekty jak proces genetycznej samo niezgodności, ale będzie się ujawniać tylko w warunkach pozwalających na konkurencję pyłków. Do koncepcji CSI u roślin odwołuje się wielu badaczy, mimo że wciąż nie jest do końca wyjaśnione na ile powszechne jest to zjawisko wśród roślin.

Badałam CSI u *Echium vulgare*, który to gatunek w warunkach naturalnych odznacza się niskim stopniem samozapylenia. Wybrałam ten gatunek, ponieważ poziom samozapylenia w populacjach naturalnych jest o wiele niższy niż wynikałoby to z przewidywań teoretycznych opartych na rozmiarach rośliny i dynamice pyłków, sugerując, że dobór działający po zapyleniu ma tutaj miejsce, działając przeciwko samozapyleniu. Użyłam 20 genotypów, połączonych w 10 par, w trzech zabiegach: samozapylenie, zapylenie krzyżowe (wzajemna krzyżówka w obrębie każdej pary) oraz zapylenie z użyciem mieszaniny pyłków pochodzących od obu roślin. Próbkę 10 siewek pochodzących z zabiegu z mieszaniną pyłków została zgenotypowana dla każdej z dwudziestu roślin eksperymentalnych, używając loci mikrosatelitarnych. Nie stwierdzono efektu działającego przeciwko samozapyleniu w analizie uwzględniającej średnie dla wszystkich 20 genotypów. Natomiast w szczegółowej analizie testami nieparametrycznymi, tylko dla dwóch genotypów wykryto istotne CSI. Oszacowałam efekty matczyne i ojcowskie na kiełkowanie pyłku, jednakże nie było istotnej różnicy pomiędzy kiełkowaniem pyłku i wzrostem pomiędzy pyłkiem pochodzącym z samozapylenia oraz zapylenia krzyżowego, dla średniej z 20 genotypów. Wzrost łagiewki i kiełkowanie u dwóch genotypów u których stwierdzono CSI, nie różniły się od roślin, u których nie stwierdzono CSI. Tak więc, nie znalazłam przesłanek, że CSI u *Echium vulgare* jest spowodowane przez mechanizmy prezygotyczne.

Selektywna aborcja zarodków

Aborcja zarodków zapewnia również możliwość wpływu na genotyp potomstwa, jeśli zarodki mogą być selektywnie usuwane w zależności od ich genotypu. Selektywna aborcja zarodków może być przystosowawcza, jeśli zarodki o genotypach, które mają potencjalnie niższe dostosowanie, będą częściej resorbowane. Wówczas selektywna aborcja zarodków będzie prowadzić do zwiększenia inwestycji zasobów tylko w potomstwo o 'wyższej jakości'. W wielu pracach pokazano, że nawet żywotne zarodki są resorbowane. Jednakże tylko kilka prac – wszystkie na poziomie fenotypowym – pokazało rzeczywiście korelację między poziomem aborcji a jakością potomstwa. Niestety wyniki tych prac są kwestionowane z powodu planu eksperymentalnego i możliwości że opisane efekty są artefaktami pochodzącymi z użytej metody.

Szukałam innej metody badania selektywnych aborcji – na poziomie genotypu. Nielosowe aborcje na poziomie markerów molekularnych będą obserwowane jako odchylenia od segregacji mendelowskiej: zbyt częste, lub zbyt rzadkie występowanie markerów (alleli) w potomstwie. Jeśli aborcje zarodków są powszechne u roślin i jeśli

są selektywne, wówczas wiele map genetycznych powinno pokazać nielosową segregację markerów molekularnych. W literaturze na temat map genetycznych u roślin znalazłam, że poziom segregacji niemendlowskiej jest wysoki. Średnio 11,5 % badanych markerów w mapach genetycznych gatunków dzikich i 14,6% u gatunków uprawnych wykazuje odchylenia od segregacji mendlowskiej. W oparciu o sześć map genetycznych, zapewniających dostateczną ilość danych, wyliczyłam, że w 68% loci segregujących w sposób niemendlowski zaangażowany jest dobór postzygotyczny. To pokazuje, że istnieje potencjał dla wykrycia selektywnych aborcji zarodków w oparciu o mapy genetyczne.

Acknowledgements

This thesis benefited from the direct or indirect contribution of many people, who I would all like to thank here.

Everything started when Nico de Boer recommended me as a suitable candidate for this PhD position (Nico, thank you for believing in me!) In the beginning, I have had more to do with hydrobiology than with plant ecology, so I had to learn a lot about plants. Tom de Jong, Chantal Melser and Marielle Rademaker shared their experiences with *Cynoglossum* and *Echium*, and Karin van der Veen gave me lots of practical pieces of advice on how to grow plants and use climate rooms. Experiments usually involved hundreds of plants and would not have been possible without the help of technicians of the plant ecology group, especially, Henk Nell, Hans de Heiden and Joep Bovenlander. Further, Jeanette Biemans and William Kerssens did a great job working with *Echium* – being their supervisor was really valuable experience to me. My PhD study also had another important component: molecular analysis, which, at first, was a complete 'abracadabra' to me. Marcel Eurlings and Rene Glas helped me find my way in the lab and answered countless questions on a daily basis (I miss you guys! In the lab I work now I am supposed to have answers, not questions!).

I have lots of nice memories of the plant ecology group. I learned a lot from the journal clubs/work discussions and enjoyed all the social gatherings. 'AIO dinners' with my fellow PhD students, Chantal, Nico, Gera, Mirka, Sonja, Grit, Milena and Martina, were really 'gezellig'. I would like to thank my colleagues here who were very supportive during all the disasters that happened in my project: when my review kept coming back like a boomerang, when the AFLP didn't work for *Cynoglossum*, and when the tetraploidy of *Echium* complicated the analysis. Thanks for listening!

The 9 months I spent at Newcastle on Marie-Curie fellowship was an enormous injection of enthusiasm for me. These months were really active and productive. I especially liked the atmosphere of positive thinking at MC training site. I enjoyed coffee break discussions, badminton games and other gatherings with my Newcastle-colleagues: Losia, Laurence, Ingo, Marie and Roddy, Nur, Ranja and Kirstin. And about my other activities in Newcastle, well... I will only say I'm glad I didn't end up with a permanent hand injury :)

During all these years, many people made my life outside biology exciting and fun, too. I fondly remember the long evenings over delicious dinners with Nóra, Marta and Natalia, and the many chats with Marcin, Mark, Péter and Thijs, and in Newcastle, dancing with Kostja and Eda. Getting together with Ann, Ansgar, Arjan, Bart, Emilie, Eric, Freek, Martin and Ward in Maneer Jansen to talk about 'everything and nothing' was not only first class entertainment, but also improved my Dutch a lot.

Now let me write few words for my mother. Kochana mamó, dziękuję za popieranie moich decyzji, za cierpliwość w czekaniu kiedy wreszcie przyjadę do domu i za to, że zawsze się o mnie martwisz.

There were three people closest to me in the final, most stressful stage of my project: Anikó Lipták, Sonja Esch and my sister, Anna. If I could have three paranymphs, one on my right, one on the left and one behind, I would choose all of them. They all were wonderful friends to me in the moments when everything was going wrong. Sonja also took care of many arrangements related to my promotion and the printing of my thesis. She did all of that during the most difficult last few months of her own PhD project. (Sonja, I wish I could help you as much as you helped me.)

And a final 'thank you' to Martin Britijn, who made a lot of effort to prepare the graphical design of this thesis. I can't see the final result while typing this text but I am sure it will look nice.

Curriculum vitae

I was born on 22nd August 1974 Rzeszów (south-east Poland). I started my studies in biology at the Jagiellonian University in Kraków in October 1993. During my study I developed an interest in evolutionary ecology and attended many seminars and workshops in this field. I chose ciliates as model organisms to study prey-predator interactions and inducible defences in my research projects under the supervision of dr Janusz Fyda from the Department of Hydrobiology. In 1997, I went to the Netherlands with a 6-month fellowship supported by the European TEMPUS program to study inducible defences in plants at the section of Plant Ecology of Leiden University. I carried out an experiment testing the herbivory induced withdrawal of resources in *Senecio jacobaea* supervised by Nico de Boer and Eddy van der Meijden. Coming back to Kraków, I continued my experiments on ciliates and wrote an MSc thesis under the supervision of Krzysztof Wiąckowski, entitled "The influence of the presence of food and predator on the activity of ciliates". I defended this thesis with a very good result and received the title Master of Science in June 1998.

In October 1998 I went back to the Netherlands to start a PhD study at the section of Plant Ecology at Leiden University. The project was about selective embryo abortion in plants originally, but I broadened it later to include other processes of post-pollination selection and the study of a population genetic structure. I worked with plants (pollination experiments, field studies) and molecular markers like microsatellites and AFLP. I learned to develop microsatellites from Kirsten Wolff during my 9-month Marie-Curie Fellowship at the University of Newcastle (UK) in 2003. During my whole PhD period I gave six oral and two poster presentations at international congresses.

Between February and September 2004, I worked as a molecular analyst at the section of Plant Ecology in Leiden. I helped to introduce a new technique, RAF (randomly amplified DNA fingerprints), in studies on plant and animal species. I performed a RAF analysis on the parasitoid wasp *Mesochorus fascialis* in order to study the relation between its genetic diversity and habitat fragmentation. This project forms part of the PhD project of Sonja Esch.

From 15th September 2004, I work as a postdoctoral researcher in the Institute of Botany at the Polish Academy of Sciences in Kraków. My work in Poland is part of the European project 'IntraBioDiv', which aims at comparing the genetic variation at three different levels (intraspecific, interspecific and habitat) in order to find efficient conservation strategies. This project also has a phylogeographic aspect as the Carpathian and Alpine populations will be compared.

Publications

- Korbecka G., Klinkhamer P. G. L., Vrieling K.(2002) Selective embryo abortion hypothesis revisited - a molecular approach. *Plant Biology* 4 (3): 298-310.
- Korbecka G., Vrieling K., Squirrell J., Hale M.L., Wolff K. (2003) Characterization of six microsatellites loci in *Echium vulgare* (Boraginaceae). *Molecular Ecology Notes* 3 (2): 274-276.
- Korbecka G., Wolff K. (2004) Characterization of eight microsatellite loci in *Cynoglossum officinale* (Boraginaceae). *Molecular Ecology Notes* 4: 229-300.
- Korbecka G., Klinkhamer P.G.L. Cryptic self-incompatibility in *Echium vulgare* (Boraginaceae) – in prep.
- Korbecka G., Klinkhamer P.G.L, Vrieling K. and K. Wolff. Fine-scale genetic structure in *Echium vulgare* and *Cynoglossum officinale* – in prep.