



Uniwersytet w Białymstoku
Wydział Biologii

Zofia Korbut Mikołajczyk

**Filogeografia i struktura genetyczna populacji
chomika europejskiego (*Cricetus cricetus*)
na obszarze potencjalnych refugiów**

Rozprawa doktorska

Promotor: dr hab. Agata N. Banaszek
Promotor pomocniczy: dr Ewa Oleńska

Białystok, 2021

STRESZCZENIE

W planowaniu ochrony gatunków zagrożonych coraz powszechniej wykorzystywane są dane z analiz genetycznych. Pozwala to na uzyskanie informacji o genetycznym podobieństwie między populacjami gatunków zagrożonych oraz identyfikacji procesów w nich zachodzących, zarówno obecnie jak i w przeszłości. Przy odtwarzaniu procesów historycznych niezwykle przydatne mogą być analizy filogeograficzne dostarczające informacji o genealogii i geograficznym rozmieszczeniu różnych linii genetycznych w obrębie gatunków. Podstawowymi i najczęściej stosowanymi markerami genetycznymi w filogeografii są sekwencje mitochondrialnego DNA (mtDNA). Jednakże dziedziczony jednorodzicielsko mtDNA odzwierciedla jedynie historię linii żeńskich. U ssaków samice są często płcią filopatryczną, przez co wzorce zmienności linii samic mogą być bardziej konserwatywne od linii męskich i wzorca zmienności dla genów autosomalnych. Stąd też, w celu pełnego opisu historii gatunku, warto wykorzystywać również analizę markerów dziedziczonych po obydwu rodzicach bądź markerów dziedziczonych w liniach męskich.

Chomik europejski (*Cricetus cricetus*) jest gatunkiem gryzonia z rodziny chomikowatych i jedynym obecnie żyjącym przedstawicielem rodzaju *Cricetus*. Niestety, pomimo dostępności odpowiednich do życia siedlisk, od lat siedemdziesiątych XX wieku zauważalne jest znaczne zmniejszenie oraz fragmentacja zasięgu występowania chomika. Obecnie jest on gatunkiem krytycznie zagrożonym. Dotychczasowe analizy mtDNA w populacjach chomika europejskiego przeprowadzone na podstawie trzech fragmentów sekwencji mtDNA: regionu kontrolnego (*ctr*), 16S rRNA (*16S*) i cytochromu b (*cytb*), wykazały istnienie trzech linii filogeograficznych: Północnej, Pannonii i E1. Dodatkowo, na podstawie analizy wyłącznie fragmentu *cytb*, wyróżniono dwie kolejne linie: E0 oraz Kaukaską. Jednakże obszary refugialne oraz drogi migracji wyznaczonych linii wciąż nie są całkowicie poznane. Zważywszy, że populacje zamieszkujące obszary refugialne charakteryzują się często wyższym zróżnicowaniem genetycznym niż populacje z terenów wtórnie zasiedlonych po ustąpieniu niekorzystnych warunków klimatycznych, analiza takich obszarów może dostarczyć cennych informacji do opracowania skutecznych programów ochrony gatunku.

Celem moich badań była analiza filogeograficzna i struktury populacji chomika europejskiego na obszarze potencjalnych refugium z wykorzystaniem trzech sekwencji

mtDNA: *ctr*, *16S* oraz *cytb*. W badaniach skupiłam się na obszarze Ukrainy oraz wschodniej i południowej Rumunii, które do tej pory nie były poznane pod względem filogeografii gatunku. Ponadto podjęłam się analizy osobników z wyróżnionych linii mtDNA pod względem autosomalnych intronów jądrowych i markerów zlokalizowanych na chromosomie Y. Dodatkowo, w związku ze znaczną fragmentacją północnej części zasięgu gatunku, w przeprowadzonych badaniach uwzględniłam również analizę struktury populacji chomika europejskiego na podstawie mikrosatelitarnego DNA w jednym z niewielu ciągłych fragmentów zasięgu, znajdującym się na pograniczu Polski i Ukrainy. Materiał do badań stanowiło 430 prób chomika europejskiego pochodzących z Ukrainy, Polski i Rumunii oraz w przypadku analiz intronów jądrowych i markerów zlokalizowanych na chromosomie Y, dziewięć prób z pozostałej części zasięgu gatunku z terenów Francji, Belgii, Niemiec, Czech i Słowacji.

Otrzymane przeze mnie wyniki analiz filogeograficznych wykazały, że z opisanych dotychczas w literaturze pięciu linii mtDNA, jedynie Pannonia, Północna i Kaukaska tworzą odrębne linie filogeograficzne. Natomiast grupy haplotypów opisane jako E1 i E0, po uwzględnieniu haplotypów chomików z Ukrainy i Rumunii, nie tworzą odrębnych, monofiletycznych linii. W związku z powyższym, haplotypy E1 i E0 oraz haplotypy zlokalizowane na drzewie filogenetycznym w ich sąsiedztwie określiłam mianem Grupy Wschodniej. Należy jednak zaznaczyć, że sformułowanie Grupa Wschodnia nie odnosi się do odrębnej linii filogeograficznej, a jest nazwą ułatwiającą opis materiału w niniejszym opracowaniu. Ponadto populacje obecnie zamieszkujące Nizinę Naddnieprzańską (Ukraina) wykazują cechy charakterystyczne dla populacji refugialnych. Możliwe jest, że to właśnie Nizina Naddnieprzańska była obszarem refugialnym dla pozostałych populacji z Grupy Wschodniej. Ekspansja przestrzenna i demograficzna tej grupy przypada na końcowy okres zlodowacenia Wisły, który mógł stwarzać dogodne warunki klimatyczne i siedliskowe dla chomika europejskiego. Analizy filogeograficzne wykazały również, że populacja linii Pannonia zamieszkująca obszar zachodniej Ukrainy jest efektem fali migracji osobników tej linii z terenów południowo-wschodniej Polski. Nie wykazałam natomiast migracji linii Pannonia z Kotliny Panońskiej w kierunku południowym, na tereny południowej Rumunii. Czas ekspansji przestrzennej linii Pannonia na terenie południowej Rumunii poprzedza podawany w literaturze czas ekspansji demograficznej linii Pannonia w Kotlinie Panońskiej, co może świadczyć o utrzymywaniu się populacji chomika europejskiego w południowej Rumunii w czasie ostatniego zlodowacenia.

Analiza markerów zlokalizowanych na chromosomie Y (sekwencje YCATS) i autosomalnych markerów jądrowych wykazała bardzo niski poziom, bądź brak zmienności genetycznej w obrębie gatunku. Ponadto podział na wyróżnione haplotypy chromosomu Y, nie był zgodny z podziałem na opisane linie filogeograficzne mtDNA. Otrzymane różnice w geograficznym rozmieszczeniu linii mtDNA oraz haplotypów chromosomu Y mogą wynikać z procesu sortowania linii chromosomu Y lub tzw. wtórnego wymiatania linii. Ze względu na niski poziom zmienności nukleotydowej badanych sekwencji YCATS, wskazujący że wyróżnione haplotypy YCATS są młodsze niż linie mtDNA, bardziej prawdopodobnym wyjaśnieniem opisanych różnic wydaje się być efekt wtórnego wymiatania linii. Największe zróżnicowanie haplotypów YCATS zidentyfikowałam we wschodniej części zasięgu gatunku, co jest zgodne z potencjalną lokalizacją obszarów refugialnych. W przypadku analiz ośmiu intronów jądrowych, udało mi się powielić cztery sekwencje, które nie wykazały dywergencji wśród linii mtDNA w całym analizowanym zasięgu występowania gatunku. Zważywszy na czas rozdzielenia linii mtDNA, sięgający w przybliżeniu okresowi interglacjału eemskiego i przy założeniu neutralnej ewolucji sekwencji intronowych, należałoby się spodziewać nagromadzenia zmienności w badanym zasięgu. Otrzymany wynik może wskazywać na potencjalny wysoki stopień konserwatywności badanych autosomalnych sekwencji intronowych lub być efektem powielenia krótkich fragmentów sekwencji, które mogły nie ująć zmienności występującej w badanym zasięgu gatunku. Ponadto brak zgodności pomiędzy genealogią wyznaczoną na podstawie analiz sekwencji mtDNA, a otrzymanymi wynikami analiz sekwencji YCATS oraz autosomalnych sekwencji jądrowych mogą także świadczyć o występowaniu przepływu genów między liniami filogeograficznymi.

Wyniki analiz ciągłego, polsko-ukraińskiego fragmentu zasięgu gatunku, przeprowadzonych z wykorzystaniem trzynastu loci mikrosatelitarnego DNA przy pomocy programu Structure, wykazały podział na dwa skupienia genetyczne i zarazem brak struktury genetycznej między osobnikami w obrębie linii mtDNA Pannonia, jak również w Grupie Wschodniej. Jednakże analizy prowadzone z wykorzystaniem loci mikrosatelitarnego DNA oraz sekwencji mtDNA w programie Geneland wykazały podział na siedem skupień genetycznych (dwa skupienia grupujące osobniki należące do linii mtDNA Pannonia i pięć skupień grupujących osobniki należące do Grupy Wschodniej). Poziom zmienności genetycznej w analizowanym fragmencie zasięgu jest wysoki, co sugeruje, że badane populacje chomika wciąż znajdują się w dobrej kondycji

demograficznej. Ponadto umiarkowane wartości zróżnicowania genetycznego między populacjami w badanych loci mikrosatelitarnych wskazują na wciąż istniejący przepływ genów między nimi. Nie stwierdziłam obecności bezpośrednich migrantów (pierwszego pokolenia) między populacjami z linii Pannonia oraz Grupy Wschodniej. Niemniej jednak otrzymane wyniki analizy dywergencji genetycznej uzyskane dla badanych loci mikrosatelitarnych, a także wyniki analizy admiksji w przypadku obu grup filogeograficznych nie wskazują na istnienie izolacji między nimi, a raczej na możliwość przepływu genów w przypadku kontaktu. W związku z tym, nie znalazłam podstaw do wyróżnienia na badanym obszarze jednostek ważnych ewolucyjnie (ESU), które wymagałyby odrębnej ochrony. Przeciwnie zaś, wykazana możliwość przepływu genów sugeruje, że ochronie powinien zostać poddany cały badany obszar, tak aby został na nim utrzymany naturalny przepływ genów.

Przeprowadzona w niniejszej rozprawie analiza trzech klas markerów molekularnych dostarczyła cennych informacji dotyczących filogeografii chomika europejskiego, a także pozwoliła na opisanie zmienności w badanych populacjach oraz wyróżnienie populacji ważnych pod względem ochrony gatunku. Analizy filogeograficzne przeprowadzone w ramach tej pracy wskazują na brak podstaw do wydzielania opisanych w literaturze linii filogeograficznych E1 i E0 jako odrębnych linii. Podkreśla to potrzebę wykorzystywania w analizach filogeograficznych chomika europejskiego trzech analizowanych dotychczas fragmentów mtDNA (*ctr*, *16S*, *cytb*), jak również wzbogacenia analiz o inne klasy markerów w przyszłości. Ponadto przedstawione wyniki wskazują, że ze względu na wysoki poziom polimorfizmu, cenne dla ochrony gatunku są populacje zamieszkujące Nizinę Naddnieprzańską. Obszarem wyjątkowym pod względem ochrony gatunku jest również analizowany polsko-ukraiński fragment zasięgu. Obszar ten stanowi jeden z nielicznych ciągłych obszarów naturalnego funkcjonowania populacji chomika europejskiego i powinien podlegać ochronie wspartej działaniami konserwatorskimi.

ABSTRACT

Nowadays, data from genetic analyses are increasingly used in the planning of conservation actions of endangered species. This allows researchers to obtain information about the genetic similarity between populations of endangered species and to identify processes taking place in populations, both now and in the past. Phylogeographic analyses can be very useful to reproduce historical processes by providing information on the geographical distribution of different genetic lineages within the species. The most commonly used genetic marker in phylogeography is mitochondrial DNA (mtDNA). However, the uniparental inheritance of mtDNA results in only the history of female lines being reflected. In mammals, females are often the philopatric sex, so the patterns of variation in female lines may be more conservative in comparison to those of male lines and to those for autosomal genes. Therefore, in order to fully describe the history of the species, it is also worthwhile to use markers inherited from both parents or markers inherited from male lines.

The common hamster (*Cricetus cricetus*) is a rodent species of the Cricetidae family and the only one currently living representative of the genus *Cricetus*. Unfortunately, despite the availability of suitable habitats, a significant reduction and fragmentation of the hamster's range has been observed since the 1970s. Currently, the common hamster is a critically endangered species. MtDNA analyses in common hamster populations have been carried out on the basis of three fragments of the mtDNA: control region (*ctr*), 16S rRNA (*16S*) and cytochrome b (*cytb*), and have revealed three phylogeographic lineages: North, Pannonia and E1. Additionally, based on the analysis of only the *cytb* fragment, two more lineages were described: E0 and Caucasian. However, the refugial areas and migration routes of the designated lineages are still not fully known. Populations inhabiting refugial areas are often characterized by higher genetic diversity than those in areas re-inhabited after the species' maximum range contraction during unfavourable climate conditions. Therefore, analysis of such areas can provide valuable information for the development of effective conservation programs.

The aim of my research was to analyse the phylogeography and population structure of common hamster populations in a potential refugial area based on three mtDNA sequences: *ctr*, *16S* and *cytb*. In my research I focused on the area of Ukraine and eastern and southern Romania, which have not been studied so far in terms of

phylogeography of the species. In addition, I analysed individuals from distinct mtDNA lineages using nuclear introns and markers located on the Y chromosome. Due to the significant fragmentation of the northern part of the species range I also conducted an analysis of the population structure based on microsatellite DNA, in one of the few continuous fragments of the species' range located on the border of Poland and Ukraine. The material for the study consisted of 430 samples of the common hamster coming from Ukraine, Poland and Romania. In the case of analyses of autosomal introns and markers located on the Y chromosome, I used nine additional samples from the remaining part of the species' range from areas of France, Belgium, Germany, Czech Republic and Slovakia.

The results obtained from my phylogeographic analyses showed that out of the five mtDNA lineages of the common hamster described so far in the literature, only the Pannonia, North and Caucasus form separate phylogeographic lineages. Whereas the groups of haplotypes described as E1 and E0 lineages, after including Ukrainian and Romanian hamster haplotypes in the analysis, do not form separate, monophyletic lineages. Therefore, I described E0 and E1 haplotypes and haplotypes located next to them on the phylogenetic tree as the Eastern Group. It should be noted that the term Eastern Group does not refer to a separate phylogeographic lineage, but is a name facilitating the description of the material in this dissertation. Moreover, the populations currently inhabiting the area of the Dnieper Lowland (Ukraine) show characteristics of refugial populations. It is possible that the area of the Dnieper Lowland was a refugial area for the remaining populations of the Eastern Group. The spatial and demographic expansion of this group falls into the final period of the Würm glaciation, which may have created favourable climatic and habitat conditions for the common hamster. Phylogeographic analyses also showed that the population of the Pannonia lineage in western Ukraine is the result of a wave of migration of this lineage from south-eastern Poland. However, in my research I did not show the migration of the Pannonia lineage from the Pannonian Basin to the south of Romania. The time of the spatial expansion of the Pannonia lineage in southern Romania is preceded by the demographic expansion of the Pannonia lineage in the Pannonian Basin as reported in the literature, which may indicate the persistence of the common hamster populations in southern Romania during the last glaciation.

Analysis of markers located on the Y chromosome (YCATS sequences) and autosomal markers showed a very low level or lack of variability within the species.

Moreover, the division into distinguished Y chromosome haplotypes did not reflect the division into described phylogeographic lineages of mtDNA. The obtained differences in the geographic distribution of mtDNA lineages and Y chromosome haplotypes can be explained by the ancestral sorting hypothesis or secondary sweep hypothesis. Due to the low level of nucleotide variability of the analysed YCATS sequences, suggesting that the distinguished YCATS haplotypes are younger than the mtDNA lineages, the secondary sweep hypothesis is the more likely explanation for the described differences. The greatest identified diversity of YCATS haplotypes in my research was in the eastern part of the species' range, which is in agreement with the potential location of refugial areas. In the case of analyses of eight nuclear introns, I was able to amplify four sequences that did not show any divergence among mtDNA lineages in the entire analysed range of the species. Considering the separation time of mtDNA lineages reaching approximately the Eemian interglacial, and assuming neutral evolution of intron sequences, we would expect an accumulation of variability in the analysed species' range. The obtained results may indicate a potential high degree of conservativeness of the examined intron sequences or may be a result of amplification of short fragments of the sequences, which may not have captured the variability occurring in the examined range. Moreover, the lack of agreement between the genealogy determined on the basis of mtDNA and the obtained results of the YCATS sequences and autosomal nuclear introns analyses may also indicate the existence of a gene flow between phylogeographic lineages.

The results of the analysis of the continuous Polish-Ukrainian fragment of the common hamster's range, carried out with the use of thirteen loci of microsatellite DNA in the Structure program, showed a division into two genetic clusters and, at the same time, a lack of genetic structure between individuals within the Pannonia lineage, as well as in the Eastern Group. However, analyses based on microsatellite DNA loci and mtDNA sequences carried out in Geneland showed a division into seven genetic clusters (two clusters of the Pannonia lineage and five clusters of the Eastern Group). The level of genetic variability in the analysed fragment of the range is high, which suggests that the examined hamster populations are still in good demographic condition. The obtained moderate values of genetic differentiation between the populations in the examined microsatellite loci indicate a still existing gene flow between them. My research did not reveal the presence of first generation migrants between the Pannonia and Eastern Group populations. However, the results of the genetic divergence analysis obtained for the examined microsatellite loci, as well as the results of the admission analysis in both

phylogeographical groups, do not indicate the existence of isolation between them, but rather the possibility of a gene flow in the case of contact between them. Therefore, I have found no grounds to distinguish evolutionary significant units (ESU) in the study area, which would require separate protection. On the contrary, the possibility of gene flow suggests that the entire study area should be protected, in order to maintain the natural flow of genes there.

The analysis of the three classes of molecular markers carried out in this thesis provides valuable information on the phylogeography of the common hamster. Furthermore, the results allowed to describe the variability in the studied populations, and to distinguish populations that are important in terms of species conservation. Phylogeographic analyses performed in this work indicate that there is no basis for the separation the E1 and E0 lineages. This finding highlights the need for the usage of the three fragments of mtDNA (*ctr*, *16S*, *cytb*) in phylogeographic analyses of the common hamster, as well as of extending analyses to other classes of markers in the future. Moreover, the results presented here indicate that due to the high level of polymorphism, the populations living in the Dnieper Lowland are valuable for the protection of the species. Additionally, the Polish-Ukrainian fragment of the species' range is an exceptional area for the protection of the species. This area is one of the few continuous areas of natural functioning of common hamster populations, and should be under protection supported by conservation activities.