

**Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta
Katedra zoologie**

**Charles University in Prague, Faculty of Science
Department of Zoology**

Doktorský studijní program: Zoologie
Ph.D. study program: Zoology

Autoreferát dizertační práce
Summary of the Ph.D. Thesis



**Využití genetické variability pro účely konzervační biologie: příkladové studie
populací v lidské péči a přírodě**

**The use of genetic variability for the purposes of conservation biology: case
studies of populations in captivity and nature**

Mgr. Barbora Opelka Somerová

Školitel / Supervisor: Prof. RNDr. Daniel Frynta, Ph.D.

Konzultant / Co-supervisor: RNDr. Ivan Reháč, CSc.

Praha 2022

Publikace zařazené do dizertační práce/ Papers included to the Ph.D. thesis

- Frynta, D., Gunalen, D., & **Somerová, B.** (2021). Genetic variation of blue-tongue skinks of the genus *Tiliqua* (Squamata: Scincidae) from New Guinea and Wallacea. *Biologia*, 76(5), 1445-1455.
- **Somerová, B.**, Reháček, I., Velenský, P., Palupčíková, K., Protiva, T., & Frynta, D. (2015). Haplotype variation in founders of the *Mauremys annamensis* population kept in European Zoos. *Acta Herpetologica*, 10(1), 7-15.
- Palupčíková, K., **Somerová, B.**, Protiva, T., Reháček, I., Velenský, P., Hulva, P., Gunalen D. & Frynta, D. (2012). Genetic and shell-shape analyses of *Orlitia borneensis* (Testudines: Geoemydidae) reveal limited divergence among founders of the European zoo population. *Zootaxa*, 3280(1), 56-66.
- Reháček, I., Štáhlavská, I., **Opelka Somerová B.**, Šimková O. & Frynta D. (2021). A deep divergence and high diversity of mitochondrial haplotypes in an island snake: the case of Cuban boa, *Chilabothrus angulifer* (Serpentes: Boidae). *Acta Societatis Zoologicae Bohemicae*, in print.
- Balasanyan, V., Yavruyan, E., **Somerová, B.**, Abramjan, A., Landova, E., Munclinger, P., & Frynta, D. (2018). High diversity of mtDNA haplotypes confirms syntopic occurrence of two field mouse species *Apodemus uralensis* and *A. witherbyi* (Muridae: *Apodemus*) in Armenia. *Russian Journal of Genetics*, 54(6), 687-697.

Abstrakt

V této dizertační práci jsem se věnovala převážně tématu ochrany vzácných druhů a to ve třech projektech realizovaných ve spolupráci se ZOO Praha. Další dva dílčí projekty, které jsou součástí této dizertační práce, se věnují tématu analýzy genetické diverzity v přírodě a vznikly ve spolupráci s institucemi v Indonésii a Arménii. Všechny tyto projekty jsem řešila pomocí obdobné laboratorní a výpočetní metodiky, ačkoliv každý projekt řešil odlišné problémy. Ve stěžejním, a asi i nejdůležitějším projektu jsem zabývala scinky rodu *Tiliqua* žijícími na Molukách, Nové Guinei (Irian Jaya) a přilehlých ostrovech. Analýzou mitochondriálních a jaderných znaků jsem řešila jejich vzájemné fylogenetické a populační vztahy. Druhá práce byla zaměřená na studium *ex situ* populace *Mauremys annamensis* v Evropských chovech, určovala jsem haplotypovou diverzitu a detekovala F1 hybridy v populaci. Ve třetí práci jsem zkoumala genetickou variabilitu pro potřeby organizace *ex situ* chovů *Orlitia borneensis* u jedinců chovaných v Evropských zoologických zahradách. Čtvrtá práce se zabývala výzkumem genetické variability populace *Chilabothrus angulifer* v Evropských chovech, zabývala se otázkou dlouhodobého přežití této populace. V poslední páté práci jsem za použití genetických metod identifikovala druhy, sekvenční a haplotypovou diverzitu sympatrických druhů z rodu *Apodemus* (*Sylvaemus*) v Arménii.

Ve všech pracích používám hlavně mtDNA, která byla ještě v minulém tisíciletí používána jako univerzální marker. Na použitých příkladech ukazuji, že mtDNA je stále využitelná zpravidla v kombinaci s dalšími znaky (v mém případě sekvencemi vybraných jaderných genů). Ačkoliv jsem použila podobné molekulární a analytické postupy, každá z dílčích studií si vzhledem k odlišné povaze problému a zjištěné genetické variability, vyžádala výrazně odlišnou interpretaci výsledků. Proto je tato práce i příkladem využití rozdílných interpretačních schémat.

Abstract

In this dissertation thesis, I focused mainly on the topic of endangered species conservation in three projects, which were realized in cooperation with Prague ZOO. The other two subprojects, which are part of this dissertation, deal with the topic of genetic diversity analysis in nature and were realized in cooperation with institutions in Indonesia and Armenia. In all these projects I used a similar laboratory and computational methodology, although each project addressed different problems. In the main and probably the most important project, I studied the skinks of genus *Tiliqua* living in the Moluccas, New Guinea (Irian Jaya) and adjacent islands. I analyzed mitochondrial and nuclear markers to reveal the phylogenetic and population relationships. In the second project, I focused on the study of *ex situ* population of *Mauremys annamensis* in European captive breeding. The goal was to determine the haplotype diversity and detect the F1 hybrids in population. In the third project, I examined the genetic variability of *Orlitia borneensis* in European zoological gardens for the purposes of *ex situ* breeding program organization. The fourth project is focused on examination of genetic variability of *Chilabothrus angulifer* population, which is kept in European breeding. I studied possible long-term survival of this population. In the last fifth project, I used the genetic methods to identify the species, examine the sequence and haplotype diversity of sympatric species from genus *Apodemus* (*Sylvaemus*) in Armenia.

In all projects, I mainly use the mtDNA, which was considered as a universal marker in the last millennium. In the projects was confirmed, that using of mtDNA is still useful, especially in the combination with other markers (in my works with nuclear genes sequences). Although I used similar molecular and analytical approaches, each of the sub-studies interprets the results in a significantly different way, considering the diversity of studied problems and genetic variability. Therefore, this thesis is an example of the use of different interpretation schemes.

Úvod

V předložené dizertační práci se věnuji převážně genetickým aspektům tématu ochrany vzácných druhů. Je to výzkumný program, který se poprvé prosadil v roce 1982 (Schonewald-Cox et al. 1982, pro přehled viz Avise 2014). Od té doby jeho význam progresivně rostl a řada jeho výsledků je rutinně uplatňována v druhové ochraně (Frankham et al. 2002, 2010). Dle Frankhama (2010) je ochranářská genetika užitou vědou, která naráží na postatný rozpor mezi tím, co je technologicky možné a tím, co je v reálné situaci z finančních a praktických důvodů skutečně proveditelné. Pro *ex situ* projekty se alespoň omezené zapojení genetických přístupů stalo nezbytností (Witzenberger a Hochkirch 2011).

Tři z pěti dílčích projektů této disertace jsou založeny na projektech, které vznikly ve spolupráci se ZOO Praha. Výzkumné cíle vznikly na základě požadavků a možností této instituce. Pro potřebu *ex situ* projektů mezinárodně koordinovaných pracovníky zoo, které zároveň zajistily potřebný genetické vzorky z evropských zoologických zahrad. Tyto projekty se týkaly dvou kriticky ohrožených druhů, želv annámských (*Mauremys annamensis*), orlicí bornejských (*Orlitia borneensis*), jako i ohroženého druhu hroznýšovce kubánského (*Chilabothrus angulifer*). Zbylé dva projekty, týkající se scinků rodu *Tiliqua* a myšic rodu *Apodemus*, vyplynuly ze spolupráce s institucemi v Indonésii a Arménii. Jsou zaměřeny spíše na analýzu genetické diversity v přírodě. V prvním případě mohou výsledky posloužit zejména vymezení ochranářských jednotek (conservation units) druhů, které byly v minulosti do Evropy často ve velkých počtech importovány, ale *ex situ* programy i z důvodu nejasné taxonomie a populační struktury zatím nevznikly.

Cíle práce

- 1) Vymezení druhů, populací (ochranářských jednotek) a jejich vzájemných fylogenetických a populačních vztahů mezi scinky z rodu *Tiliqua* žijícími na Molukách, Nové Guinei (Irian Jaya) a přilehlých ostrovech.
- 2) Detekování F1 hybridů a určení haplotypové diverzity *ex situ* populace *Mauremys annamensis* v Evropských chovech.

- 3) Je *ex situ* populace *Orlitia borneensis* v Evropských chovech geneticky homogenní?
- 4) Je genetická variabilita *ex situ* populace *Chilabothrus angulifer* v Evropských chovech dostatečná pro dlouhodobé přežití populace? A není až příliš velká?
- 5) Identifikace druhů, sekvenční a haplotypové diverzity sympatrických druhů z rodu *Apodemus (Sylvaemus)* v Arménii.

Materiál a metodiky

Ve všech dílčích pracích jsem řešila studovaný problém pomocí analýzy sekvencí mtDNA, nebo kombinací sekvencí mtDNA a nukleární DNA. Dle zkoumané situace jsem získaná data vyhodnocovala pomocí výpočtu p-distancí, haplotypových sítí, fylogenetických stromů a demografických charakteristik.

Závěry

- 1) Pomocí kombinace mitochondriálního a jaderného znaku jsme dokázali vymezit druhy, populace a jejich vzájemné fylogenetické a populační vztahy mezi scinky z rodu *Tiliqua* žijícími na Molukách, Nové Guinei (Irian Jaya) a přilehlých ostrovech.
- 2) Za použití kombinace mitochondriálního a jaderného znaku jsme detekovali F1 hybridy, určili jsme haplotypovou diverzitu *ex situ* populace *Mauremys annamensis* v Evropských chovech. Potvrdili jsme výskyt dvou vzdálených mitochondriálních linií v rámci druhu *M. annamensis*.
- 3) Použili jsme kombinaci mitochondriálního a jaderného znaku ke zkoumání genetické variability populace *Orlitia borneensis* chované v Evropských chovech. V populaci jsme odhalili poměrně vysokou haplotypovou diverzitu a současně relativně nízkou nukleotidovou diverzitu (méně než 1.5 % u cytochromu b). Z čehož můžeme soudit, že populace je dostatečně geneticky variabilní a dlouhodobý chov je u ní možný. Zároveň jsme doporučili chovat celou populaci jako jednu ochránářskou jednotku.

- 4) Ke zjištění genetické variability *ex situ* populace *Chilabothrus angulifer* v Evropských chovech jsme použili mitochondriální znaky cyt b a ND4. Zjistili jsme, že genetická variabilita je velmi výrazná, dostatečná pro dlouhodobé udržení této populace v lidské péči.
- 5) Identifikovali jsme druhy, sekvenční a haplotypovou diverzitu sympatrických druhů z rodu *Apodemus* (*Sylvaemus*) v Arménii. Prokázali jsme přítomnost dvou druhů – *A. uralensis* a *A. witherbyi*. Sekvenční i haplotypová variabilita byla v rámci obou druhů vysoká, což je v souladu s komplexitou prostředí a biogeografickým významem Zakavkazského prostoru.

Introduction

In this Ph.D. thesis, I deal mainly with genetic aspects of the topic of endangered species conservation. It is a research program that was first introduced in 1982 (Schonewald-Cox et al. 1982, see Avis 2014 for an overview). Since then, its importance has progressively grown and many of its results are routinely applied in species conservation (Frankham et al. 2002, 2010). According to Frankham (2010), the conservation genetics is an applied science that encounters a significant discrepancy between what is technologically possible and what is actually feasible in a real situation with respect to financial and practical reasons. For *ex situ* projects, at least a limited involvement of genetic approaches has become a necessity (Witzenberger and Hochkirch 2011).

The three of the five sub-projects of this Ph.D. thesis are based on projects that were created in cooperation with Prague ZOO. The research goals were created according to the requirements and possibilities of this institution. For the need of *ex situ* projects, which are internationally coordinated by zoo staff and which also provided the necessary genetic samples from European zoos. These projects involved two critically endangered species, the Annam leaf turtle (*Mauremys annamensis*), the Mylaysian Giant Turtle (*Orlitia borneensis*), as well as the endangered Cuban boa (*Chilabothrus angulifer*). The remaining two projects, related to skinks of genus *Tiliqua* and mice of genus *Apodemus*, were results of collaborations with institutions in Indonesia and Armenia. They are rather focused on the analysis of genetic diversity in nature. In the first case, in particular the results may serve to define conservation units of species that were often imported to Europe in large numbers in the past, but due to unclear taxonomy and population structure the *ex situ* programs have not been established yet.

Aims of the study

- 1) The delimitation of species, populations (conservation units) and their phylogenetic and interpopulation relationships between skinks of genus *Tiliqua* inhabiting Moluccas, New Guinea (Irian Jaya) and adjacent islands.

- 2) Identification of F1 hybrids and haplotype diversity examination of *ex situ* population of *Mauremys annamensis* in European breeding.
- 3) Is *ex situ* population of *Orlitia borneensis* in European breeding genetically homogeneous?
- 4) Is genetic variability of *ex situ* population of *Chilabothrus angulifer* in European breeding sufficient for long-term survival? And isn't the variability too high?
- 5) Species delimitation, sequence and haplotype examination of sympatric species in genus *Apodemus (Sylvaemus)* in Armenia.

Material and methods

I used the method of mtDNA sequences analysis or a combination of mtDNA and nuclear DNA sequences. I evaluated all the data using calculation of p-distances, haplotype networks, phylogenetic trees and demographic characteristics per specific situation.

Conclusion

- 1) Using the combination of mitochondrial and nuclear marker we succeed in delimitation of species, population and their phylogenetic and population within skinks of genus *Tiliqua* inhabiting the Moluccas, New Guinea (Irian Jaya) and adjacent islands.
- 2) Using the combination of mitochondrial and nuclear marker we detected the F1 hybrids, determined the haplotype diversity in *ex situ* population of *Mauremys annamensis* in European breeding. We confirmed the presence of two mitochondrial lineages in species *M. annamensis*.
- 3) We used the combination of mitochondrial and nuclear marker to examine the genetic variability in population of *Orlitia borneensis* kept in European breeding. We discover relatively high haplotype diversity and relatively low nucleotide diversity (less than 1.5 % at cytochrom b). From this we can conclude, that the population is enough genetically

variable and the long-term breeding is possible. At the same time, we recommended to capture the whole population as one conservation unit.

- 4) To determine the genetic variability of *ex situ* population of *Chilabothrus angulifer* in European breeding we used the mitochondrial markers *cyt b* and *ND4*. We discovered that the genetic variability is very significant, sufficient for long-term captive breeding of this population.
- 5) We identified species, sequence and haplotype diversity of sympatric species from genus *Apodemus* (*Sylvaemus*) in Armenia. We prove the presence of two species – *A. uralensis* and *A. wiitherbyi*. Both sequence and haplotype variability within these two species was high, which is accordance with complexity of the area and biogeographic importance of Transcaucasus region.

Použitá literatura / References

Avise, J. C. (2014). *Conceptual breakthroughs in evolutionary genetics: a brief history of shifting paradigms*. Academic Press.

Frankham, R., Ballou, S. E. J. D., Briscoe, D. A., & Ballou, J. D. (2002, 2010). *Introduction to conservation genetics*. Cambridge university press.

Frankham, R. (2010). Where are we in conservation genetics and where do we need to go?. *Conservation genetics*, 11(2), 661-663.

Schonewald-Cox, C., Chambers, S., MacBryde, B., & Thomas, L. (1983). *Genetics and conservation: a reference for managing wild animal and plant populations*.

Witzenberger, K. A., & Hochkirch, A. (2011). Ex situ conservation genetics: a review of molecular studies on the genetic consequences of captive breeding programmes for endangered animal species. *Biodiversity and conservation*, 20(9), 1843-1861.

Životopis / Curriculum vitae

Employment History

Covance Inc., Prague, Czech Republic – Dec 2018 – Present

Senior Clinical Research Associate II – Sep 2021 – Present

- Communication with sites and project team (feasibility, capability)
- Contract negotiation
- Type of site visits (Site Initiation visit, Site Monitoring visit, Close-out visit, Training visits, Validation visits)
- Unblinded monitoring activities
- Essential documents collection
- Adherence of sites to ICH-GCP, protocol, guidelines and SOPs
- Training and mentoring of junior CRAs
- RECIST training
- Clinical Supply Subject Matter Expert

Clinical Research Associate II – Dec 2018 – Aug 2021

- Communication with sites and project team (feasibility, capability)
- Contract negotiation
- Type of site visits (Site Initiation visit, Site Monitoring visit, Close-out visit, Training visits, Validation visits)
- Unblinded monitoring activities
- Essential documents collection
- Adherence of sites to ICH-GCP, protocol, guidelines and SOPs

INC Research Czech Republic s.r.o., Prague, Czech Republic – Aug 2016 – Nov 2018

Clinical Research Associate I – Aug 2016 – Nov 2018

- Communication with sites and project team (feasibility, capability)
- All type of site visits (Pre-Study visit, Site Initiation visit, Site Monitoring visit, Close-out visit, Training & Booster visits etc.)

- EC submissions, ICF preparation
- Essential documents collection
- Contract negotiation

Neox s.r.o., Prague, Czech Republic – Apr 2015 – Jul 2016

Clinical Research Associate – Apr 2015 – Jul 2016

- Communication with sites and project team (feasibility, capability)
- All type of site visits (Pre-Study visit, Site Initiation visit, Site Monitoring visit, Close-out visit, Training & Booster visits etc.)
- EC submissions, ICF preparation
- Essential documents collection

Therapeutic Experience

- **CardioMetabolic:** Metabolic and Cardiovascular Risk – Dyslipidemia (Phase 2, 3)
- **Oncology:** Hematologic Malignancies – Multiple Myeloma (Phase 2, 3); Other hematologic malignancies (Phase 4); Solid Tumors - Head & Neck Squamous Cell Ca (Phase 3), Non-Small Cell Lung Cancer (PD-L1 expression) (phase 2/3), Gynecological Tumors – Cervical Cancer (phase 3), Other solid tumor (phase 4)
- **Immune Mediated Inflammatory Disease (IMID):** Inflammatory Respiratory – Pneumonia (phase 1)
- **Other:** Hematology – Other Anemia (phase 3); Respiratory - Pulmonary Fibrosis (phase 3)

Language Capabilities

- Czech – Native proficiency
- English – Professional working proficiency
- German – Limited working proficiency
- Spanish – Elementary proficiency

Education

- Master's Degree (2011), Clinical and Toxicological Analysis, Charles University, Prague, Czech Republic

- Bachelor's Degree (2009), Clinical and Toxicological Analysis, Charles University, Prague, Czech Republic

Other

- ICH-GCP training, Driving license B, MS Windows and Office knowledge

Teaching Experience

- Participation as an internal Ph.D. student on experimental parts of following lectures: Vertebrate Zoology, Ethology and Sociobiology, Animal Morphology practical

Publications

- Reháček, I., Štáhlavská, I., **Opelka Somerová B.**, Šimková O. & Frynta D. (2021). A deep divergence and high diversity of mitochondrial haplotypes in an island snake: the case of Cuban boa, *Chilabothrus angulifer* (Serpentes: Boidae). *Acta Societatis Zoologicae Bohemicae*, in print.
- Frynta, D., Gunalen, D., & **Somerová, B.** (2021). Genetic variation of blue-tongue skinks of the genus *Tiliqua* (Squamata: Scincidae) from New Guinea and Wallacea. *Biologia*, 76(5), 1445-1455.
- **Somerová, B.**, Reháček, I., Velenský, P., Palupčíková, K., Protiva, T., & Frynta, D. (2015). Haplotype variation in founders of the *Mauremys annamensis* population kept in European Zoos. *Acta Herpetologica*, 10(1), 7-15.
- Balasanyan, V., Yavruyan, E., **Somerová, B.**, Abramjan, A., Landova, E., Munclinger, P., & Frynta, D. (2018). High diversity of mtDNA haplotypes confirms syntopic occurrence of two field mouse species *Apodemus uralensis* and *A. witherbyi* (Muridae: *Apodemus*) in Armenia. *Russian Journal of Genetics*, 54(6), 687-697.
- Protiva, T., Gunalen, D., Bauerová, A., Palupčíková, K., **Somerová, B.**, Frýdlová, P., Jančúchová-Lásková, J., Šimková, O., Frynta, D. & Reháček, I. (2016). Shell shape and genetic variability of Southeast Asian Box Turtles (*Cuora amboinensis*) from Borneo and Sumatra. *Vertebrate Zoology*, 66(3), 387-396.
- Abramjan, A., Bauerová, A., **Somerová, B.**, & Frynta, D. (2015). Why is the tongue of blue-tongued skinks blue? Reflectance of lingual surface and its consequences for visual perception by conspecifics and predators. *The Science of Nature*, 102(7), 1-12.
- Palupčíková, K., **Somerová, B.**, Protiva, T., Reháček, I., Velenský, P., Hulva, P., Gunalen D. & Frynta, D. (2012). Genetic and shell-shape analyses of *Orlitia borneensis* (Testudines: Geoemydidae) reveal limited divergence among founders of the European zoo population. *Zootaxa*, 3280(1), 56-66.