

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra ekologie a životního prostředí



Výskyt ophidiomykózy u populace užovky podplamaté
(*Natrix tessellata*) v Havířově a aktuální rozšíření tohoto
onemocnění v ČR

Occurrence of ophidiomycosis in the population of dice snake (*Natrix tessellata*)
in Havířov and current spread of this disease in the Czech Republic

Bc. Richard Kabelka

Diplomová práce

předložená

na katedře Ekologie a životního prostředí

Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci

jako součást požadavků

na získání titulu Mgr. v oboru

Ekologie a ochrana životního prostředí

Vedoucí práce: Mgr. Vojtech Baláž PhD.

Olomouc 2023

Bibliografická identifikace:

Kabelka R. 2023. Výskyt ophidiomykózy u populace užovky podplamaté (*Natrix tessellata*) v Havířově a aktuální rozšíření tohoto onemocnění v ČR. Katedra ekologie a životního prostředí, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci. 80 pp.

Abstrakt:

Užovka podplamatá (*Natrix tessellata*) je náš druhý nejvzácnější druh hada s těžištěm výskytu v říčních údolích nejteplejších oblastí, kde je vázána na vodní prostředí. Představuje epidemiologicky významný druh z pohledu nově se šířící potencionální hrozby pro evropskou herpetofaunu. Touto hrozbou je infekční keratinofilní onemocnění mykotického původu způsobované *Ophidiomyces ophiodiicola*. Tzv. ophidiomykóza vedla k rapidnímu poklesu některých populací hadů v USA, kde byla poprvé popsána. Tato diplomová práce se zabývá stanovením výskytu tohoto onemocnění u izolované populace užovky podplamaté v Havířově a sumarizuje výskyt nákazy v České republice. Současně se zabývá i zdravotním stavem jedinců a vyhodnocuje základní morfologické charakteristiky pro populaci. Výzkum probíhal v letech 2022 a 2023, kdy bylo odchyceno celkem 45 jedinců užovky podplamaté (a jedna užovka obojková), kterým byly odebrány vzorky stěrů kůže pro následnou detekci *O. ophiodiicola* metodou izolace DNA a qPCR analýzou. U odebraných vzorků nedošlo k potvrzení nákazy a z výsledků byla pro populaci vypočítána prevalence, jenž se při 95% konfidenčním intervalu pohybuje v rozmezí 0–8,2 %. Zjištěné morfologické charakteristiky a z nich získané indexy byly vzájemně statisticky porovnávány v závislosti na pohlaví. Mezipohlavní rozdíly byly ve všech případech signifikantní ($p < 0,001$). Nejvyšší hodnota naměřené celkové délky těla představovala pro samce 765 mm a 1110 mm pro samici, která je nově největším změřeným exemplářem tohoto druhu na našem území. Studovány byly také traumatické změny a zbarvení ventrálních šupin, díky němuž bylo možné vytvořit fotografickou databázi jedinců pro možnou navazující demografickou studii.

Klíčová slova: užovka podplamatá, *Natrix tessellata*, ophidiomykóza, *Ophidiomyces ophiodiicola*, SFD, plazi, metoda qPCR, morfologie, zranění hadů

Bibliographical identification:

Kabelka R. 2023. Occurrence of ophidiomycosis in the population of dice snake (*Natrix tessellata*) in Havířov and current spread of this disease in the Czech Republic. Department of Ecology and Environmental Sciences, Faculty of Science, Palacky University in Olomouc. 80 pp.

Abstract:

The dice snake (*Natrix tessellata*) is our second rarest snake species, with its distribution centred in the river valleys of the warmest regions, where it is closely tied to aquatic environments. It represents an epidemiologically significant species in terms of a newly emerging potential threat to the European herpetofauna. This threat is an infectious keratinophilic mycotic disease caused by *Ophidiomyces ophiodiicola*. Known as ophidiomycosis, it led to a rapid decline in some snake populations in the USA, where it was first described. This thesis focuses on determining the occurrence of this disease in an isolated population of dice snakes in Havířov and summarizes the prevalence of infection in the Czech Republic. Additionally, it assesses the health status of individuals and evaluates basic morphological characteristics for the population. The research was conducted between 2022 and 2023, during which a total of 45 individuals of the dice snake (and one grass snake) were captured, and skin swab samples were taken for subsequent detection of *O. ophiodiicola* using DNA isolation and qPCR analysis. However, no infection was confirmed in the collected samples, and the prevalence for the population was calculated from the results, ranging from 0 to 8.2 % with a 95% confidence interval. Morphological characteristics and calculated indices from these characteristics were statistically compared between males and females. Intersexual differences were found to be significant in all cases ($p < 0.001$). The highest recorded total length of an individual was 765 mm for males and 1110 mm for females, making it the largest measured specimen of this species in our country. Traumatic changes and ventral scale coloration were also studied, and a photographic database of individuals was created for possible subsequent demographic studies.

Key words: Dice snake, *Natrix tessellata*, ophidiomycosis, *Ophidiomyces ophiodiicola*, SFD, reptiles, qPCR method, morphology, snake injuries

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením
Mgr. Vojtecha Baláže PhD. s použitím citovaných literárních pramenů.

V Olomouci dne 31. července 2023

.....

Bc. Richard Kabelka

Obsah

Seznam tabulek	vii
Seznam obrázků	viii
Seznam příloh.....	ix
Seznam zkratk	x
Poděkování.....	xi
1. Úvod.....	12
1.1. Užovka podplamatá (<i>Natrix tessellata</i>).....	13
1.2. Ophidiomykóza	21
2. Cíle práce	27
3. Materiál a metody	28
3.1. Charakteristika lokality	28
3.2. Odchyt a měření morfologických charakteristik.....	30
3.3. Odběr vzorků.....	32
3.4. Laboratorní příprava a analýza vzorků.....	32
3.5. Statistické vyhodnocení dat.....	35
4. Výsledky	36
4.1. Výskyt SFD u vybrané populace <i>N. tessellata</i>	36
4.2. Morfologické parametry	39
4.3. Zdravotní komplikace a traumatické změny	43
5. Diskuse.....	47
5.1. Výskyt SFD u vybrané populace <i>N. tessellata</i>	47
5.2. Morfologické parametry	48
5.3. Zdravotní komplikace a traumatické změny	51
6. Závěr	54
7. Literatura.....	55
8. Příloha	64

Seznam tabulek

Tab. 1: Počet zdokumentovaných jedinců v roce 2022 a 2023. Počet subadultů v závorkách. M = samci, F = samice.....	36
Tab. 2: Sumarizace výskytu SFD u volně žijících hadů v ČR a SR, zahrnuty jsou i ekvivalentní výsledky (eq.). V závorkách označení lokality v Obr. 16.	38
Tab. 3: Deskriptivní tabulka mediánu, průměru, směrodatné odchylky (SD), maxima a minima pro rozměry SVL, Lcd, Ltot a hmotnosti dle pohlaví. F = samice, M = samci.....	39
Tab. 4: Deskriptivní tabulka hodnot pro indexy SVL/Lcd a Ltot/Lcd dle pohlaví. F = samice, M = samci, SD = směrodatná odchylka.....	40
Tab. 5: Záznamy významnějších zdravotních komplikací hadů.	43

Seznam obrázků

Obr. 1: Užovka podplamatá (<i>Natrix tessellata</i>), Sušanské rybníky u Havířova.	13
Obr. 2: Areál rozšíření <i>N. tessellata</i> (IUCN, 2023).	16
Obr. 3: Počet nálezů <i>N. tessellata</i> v ČR (ND OP AOPK, 2023).	17
Obr. 4: Globální výskyt SFD k roku 2023 (Di Nicola et al., 2022, upraveno).	22
Obr. 5: Distribuce SFD ve vybraných státech Evropy (Blanvillain et al., 2023). ...	23
Obr. 6: Infikovaní jedinci <i>Nerodia harteri</i> (a, b) a <i>Nerodia rhombifer</i> (c–e) z Texasu (Harding et al., 2022).	24
Obr. 7: Mikroskopický preparát <i>O. ophiodiicola</i> s aleurokonidii (a) na hyfách a arthrokonidii (b) vytvořených fragmentací (Di Nicola et al., 2022, upraveno). ...	25
Obr. 8: Sušanské rybníky (zdroj: ČZKÚ).	28
Obr. 9: Postupně zarůstající částečně osluněné svahy rybníků.	29
Obr. 10: Jeden z instalovaných umělých úkrytů (vlevo) a jejich pozůstatky (vpravo).	31
Obr. 11: Schéma měřených morfologických délek (Matsuda et al., 2006, upraveno).	32
Obr. 12: Využitá laboratorní technika.	33
Obr. 13: Příklad amplifikační křivky (Baláž, vlastní šetření).	34
Obr. 14: Výsledek qPCR s amplifikační křivkou pozitivní kontroly.	36
Obr. 15: Výskyt SFD v ČR a SR a poměrové zastoupení pozitivně testovaných jedinců, zelené body – pozitivně testované populace, modré body – nákazy prosté populace, červený bod – populace posuzovaná v této práci, kruhové body – lokality ČR a SR, hvězdičky – další zahraniční lokality, další popis včetně označení lokalit viz Tab. 2).	37
Obr. 16: Závislosti délky ocasu (Lcd) na délce těla (SVL). F = samice, M = samci.	40
Obr. 17: Závislosti hmotnosti na délce těla (SVL). F = samice, M = samci.	40
Obr. 18: Krabicové grafy demonstrující rozdíl mezi pohlavími v indexu Ltot/Lcd.	41
Obr. 19: Krabicové grafy demonstrující rozdíl mezi pohlavími v indexech SVL/Lcd.	41
Obr. 20: Typy zbarvení jedinců v populaci: kontrastní oranžové skvrnění (vlevo), bílé skvrnění (uprostřed) a netypicky páskové zbarvení (vpravo).	42
Obr. 21: Hlubší poranění (vlevo) a drobné kožní léze (vpravo) u jedince č. 7.	43
Obr. 22: Jedinec č. 8 s abscesy v dutině tlamní a cizorodým tělesem v nosní dutině.	44
Obr. 23: Jedinec č. 9 s hlubokou sečnou ránou v oblasti srdce.	44
Obr. 24: Jedinec č. 26 (<i>N. natrix</i>) s chronickým gangrenózním zánětem.	45
Obr. 25: Poškozený ocas jedince č. 42 (vlevo) a jedinec s poškozeným levým okem (vpravo).	45

Seznam příloh

Příloha 1: Programové zpracování detekce SFD	64
Příloha 2: Ukázka softwarového zpracování se vzorky k vyhodnocení společně s pozitivními a negativními kontrolami.	65
Příloha 3: Ukázka protokolu experimentu.	66
Příloha 4: Výpočet prevalence pro rok 2022 (n = 12).	66
Příloha 5: Výpočet prevalence pro rok 2023 (n = 33).	67
Příloha 6: Výpočet prevalence pro rok 2022–2023 (n = 45).	67
Příloha 7: Anotace posteru ve sborníku z mezinárodní konference Zoologické dny Brno 2023.....	68
Příloha 8: Manuskript článku akceptovaného k publikaci, do něhož jsou zahrnuty výsledky této práce.....	69
Příloha 9: Morfologické hodnoty odchycených jedinců.....	70
Příloha 10: Nejdelší zaznamenaný jedinec s celkovou délkou těla 1110 mm.....	71
Příloha 11: Jedinec č. 4.....	72
Příloha 12: Jedinec č. 20.....	72
Příloha 13: Jedinec č. 21.....	72
Příloha 14: Jedinec č. 22.....	73
Příloha 15: Jedinec č. 23.....	73
Příloha 16: Jedinec č. 24.....	73
Příloha 17: Jedinec č. 25.....	74
Příloha 18: Jedinec č. 27.....	74
Příloha 19: Jedinec č. 28.....	74
Příloha 20: Jedinec č. 29.....	75
Příloha 21: Jedinec č. 30.....	75
Příloha 22: Jedinec č. 31.....	75
Příloha 23: Jedinec č. 32.....	76
Příloha 24: Jedinec č. 33.....	76
Příloha 25: Jedinec č. 34.....	76
Příloha 26: Jedinec č. 35.....	77
Příloha 27: Jedinec č. 37.....	77
Příloha 28: Jedinec č. 38.....	77
Příloha 29: Jedinec č. 39.....	78
Příloha 30: Jedinec č. 40.....	78
Příloha 31: Jedinec č. 41.....	78
Příloha 32: Jedinec č. 42.....	79
Příloha 33: Jedinec č. 43.....	79
Příloha 34: Jedinec č. 44.....	79
Příloha 35: Jedinec č. 45.....	80
Příloha 36: Jedinec č. 46.....	80

Seznam zkratek

AOPK ČR	Agentura ochrany přírody a krajiny České republiky
CITES	Úmluvy o mezinárodním obchodu s ohroženými druhy volně žijících živočichů a planě rostoucích rostlin (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora)
ČR	Česká republika
EN	ohrožený druh (Endangered)
IUCN	Mezinárodní svaz ochrany přírody (International Union for Conservation of Nature)
Lcd	délka od kloaky po špičku ocasu (tail length)
Ltot	celková délka těla (total length)
MT	mírně teplá klimatická oblast
ND OP	nálezová databáze ochrany přírody
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce (quantitative polymerase chain reaction)
SFD	ophidiomykóza (Snake Fungal Disease)
SVL	délka od špičky hlavy po kloaku (snout-vent length)
USA	Spojené státy americké (United States of America)
SR	Slovenská republika
VETUNI	Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Poděkování

Největší poděkování směřuje k vedoucímu této práce Vojtěchu Balážovi, který byl vždy velmi ochotný jakkoli pomoci po profesionální i přátelské stránce. Dále děkuji Michalu Přibilovi za cenné rady a hlavně výpomoc při práci v laboratoři. Závěrem děkuji své rodině za podporu během studia a v neposlední řadě patří velké poděkování také mé přítelkyni, že mě nepřestávala motivovat v práci na tomto díle.

V Olomouci, červenec 2023

1. Úvod

Aktuálně jsme svědky znečišťování životního prostředí a globální destrukce ekosystémů, které postupně ztrácí svoji rezistenci, jsou náchylnější ke klimatickým extrémům a snáze je osidlují nepůvodní druhy. To ještě více napomáhá stoupajícímu trendu ubývání druhové diverzity (Gibbons et al., 2000). Současně jsou nepůvodní a invazní druhy přenašeči nových nákaz, čímž představují zásadní hrozbu pro samotnou existenci původních druhů. Mezi nejzávažnější rizika často patří i infekční choroby mykotického původu (M. C. Fisher et al., 2012). Globální expanze *Batrachochytrium dendrobatidis* již nenávratně vyhladila některé druhy žab a vedla ke snížení populační denzity jejich predátorů, v současné době se Evropou šíří i její příbuzný druh *B. salamandrivorans*, který zcela vyhubil některé populace mloka skvrnitého (*Salamandra salamandra*; Bolte et al., 2023; O'Hanlon et al., 2018; Zipkin et al., 2020). Mykotického původu je také račí mor (*Aphanomyces astaci*), který byl do Evropy zavlečen pravděpodobně již během druhé poloviny minulého století introdukcí severoamerických druhů raků a decimuje původní evropské račí populace (Svoboda et al., 2016). Výjimku v tomto procesu šíření nepůvodních nákaz nepředstavují ani plazi (Schilliger et al., 2023).

Na území České republiky se vyskytuje 14 druhů plazů, z toho dva nepůvodní (D. Fisher et al., 2019; Moravec, 2015). Prozatím je jedinou rizikovou nákazou této skupiny na našem území poměrně nedávno detekovaný původce infekčního mykotického onemocnění hadů – ophidiomykóza (*Ophidiomyces ophidiicola*; Allain & Duffus, 2019; Franklinos et al., 2017). Ta se aktuálně celosvětově šíří a decimuje populace severoamerických druhů hadů (Lorch et al., 2016).

V této diplomové práci se věnuji především druhému nejvzácnějšímu hadu ČR - užovce podplamaté (*Natrix tessellata*; Laurenti 1768), která se v našich podmínkách jeví jako jeden z vnímavějších hostitelů zmíněné nemoci (Franklinos et al., 2017). Stěžejním cílem práce je ověřit výskyt ophidiomykózy v dosud nestudované populaci *N. tessellata* v Havířově a ověřit zdravotní stav tamních jedinců. Díky hlubšímu poznání přenosu a distribuce choroby lze přispět k zefektivnění ochrany vnímavých druhů a zároveň předcházet možné budoucí hrozbě vymizení těchto jedinečných zástupců naší herpetofauny.

1.1. Užovka podplamatá (*Natrix tessellata*)

Jedná se o středně velkého semiakvatického hada, který dorůstá menší celkové délky než běžnější *Natrix natrix* (Moravec, 2015; Obr. 1). V našich podmínkách se celková velikost dospělých samců zpravidla pohybuje kolem 700 mm a délka samic nepřesahuje 1000 mm (Baruš & Oliva, 1992; Moravec, 2019). V teplejších oblastech areálu rozšíření zejména u jihoevropských populací dosahuje maximální celková délka druhu až ke 1300 mm (Gruschwitz et al., 1999; Speybroeck et al., 2016).



Obr. 1: Užovka podplamatá (*Natrix tessellata*), Sušanské rybníky u Havířova.

Stavba těla *N. tessellata* do jisté míry podléhá pohlavnímu dimorfismu (Moravec, 2015). Samci jsou menšího a štíhlejšího vzrůstu a mají vzhledem k délce těla relativně dlouhý na bázi zesílený ocas, samice naopak bývají výrazně robustnější a zavalitější (Baruš & Oliva, 1992; Speybroeck et al., 2016). Hlava *N. tessellata* je před očima znatelně zúžena a zakončena oblým čenichem, čímž vytváří dlouze trojúhelníkovitý tvar. Nozdry a oči mají dorzolaterální pozici, oči s okrouhlou zornicí jsou zároveň výrazně vystouplé a vytočené mírně šikmo dopředu (Baruš & Oliva, 1992; Moravec, 2015). Tento tvar hlavy a postavení nozder a očí souvisí s vyšší adaptací na vodní způsob života a lov potravy pod vodou (Trapp & Mebert, 2011). Dle Meberta (2011) mají samci na rozdíl od samic vzhledem k délce těla hlavu

relativně širší a kratší. Informace o hmotnosti zástupců našich populací jsou kusé (Moravec, 2015).

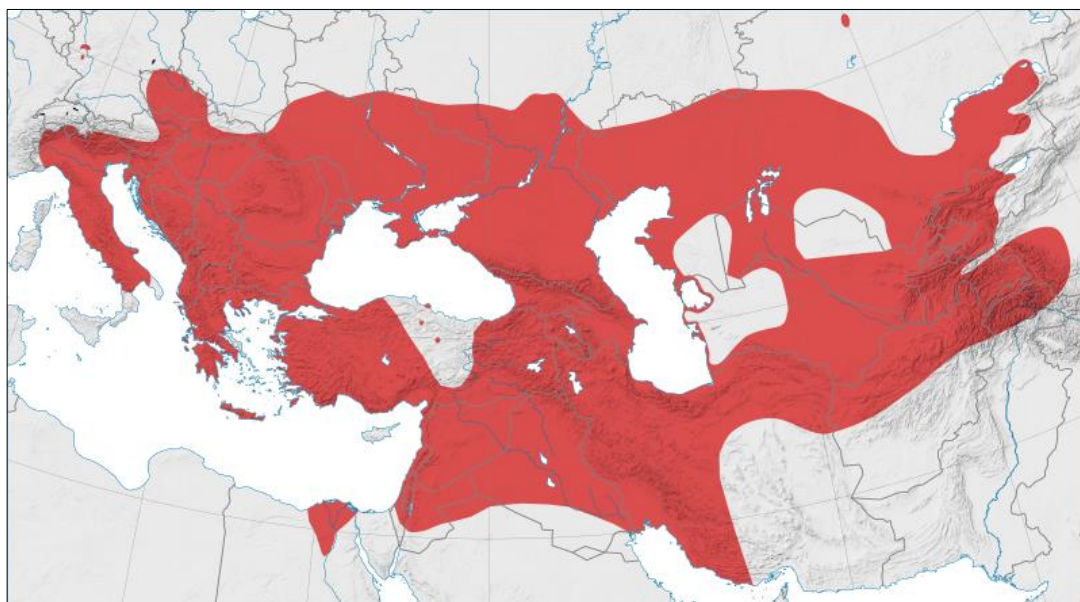
Svrchní část hlavy *N. tessellata* kryje zpravidla devět velkých hladkých štítků (Moravec, 2019). V oblasti oka se nachází povětšinou dva štítky preokulární a 3–4 štítky postokulární, dále se na hlavě nachází 7–8 supralabiálních štítků, jejichž 3. a 4. štítek se dotýká spodní strany oka (Moravec, 2015). U těchto laterálních hlavových štítků je doložena velká mezipopulační variabilita a lze se tak setkat s různorodými oboustrannými i jednostrannými abnormalitami v jejich početnosti (Moravec, 2015). U některých populací je přítomen vzácně pouze jeden preokulární štítek, ale jsou známé případy výskytu až tří těchto štítků. Totéž platí u postokulárních štítků, kterých lze napočítat 5–7 nebo vzácně pouze dva, supralabiálních štítků může být vzácně 4–6 nebo devět (Rehák, 1989; Šváb, 2003). Dle Gautschi et al. (2002) je pravděpodobným důvodem navýšení frekvence těchto anomálií vystavení menších populací dlouhodobému poklesu genetické variability. Ventrální a subkaudální ošupení je tvořeno plochými štítky, u nichž je patrný sexuální dimorfismus - samci mají zpravidla tendenci k jejich vyššímu počtu (Moravec, 2015; Rehák, 1989). Posledním typem ošupení jsou výrazně kýlnaté dorzální šupiny směřující v 19 řadách po konec ocasu, ten od kloaky odděluje zpravidla rozdělená anální šupina (Moravec, 2015).

Zbarvení *N. tessellata* je velice variabilní (Baruš & Oliva, 1992; Moravec, 2015). Obě pohlaví mají totožné šedo zelené, olivové až okrově hnědé základní zbarvení svrchní strany těla (Speybroeck et al., 2016). Na tomto barevném podkladu se nachází vzor šachovnicovitě uspořádaných skvrn ve čtyřech řadách, které mohou být rozděleny nezřetelnými světlejšími pásy (Moravec, 2015; Zwach, 2013). Skvrnění často splývá, je málo výrazné nebo zcela chybí, ale může být také výrazně tmavé a kontrastní (Moravec, 2019; Velenský et al., 2011; Vlček et al., 2011). Na základě těchto odchylek byly v minulosti popsány dvě barevné variace – *Tropidonotus tessellatus* var. *concolor* a *Natrix tessellata* var. *flavescens* (Jablonski & Kautman, 2017). Za hlavou se nachází charakteristická skvrna ve tvaru V orientovaná špičkou k okraji podkladově zbarvené hlavy (Moravec, 2019). Ventrální strana je zpravidla černá s bělavými, žlutavými až oranžovými skvrnami, které jsou nepravidelně uspořádány nejčastěji při laterálním okraji břišních šupin

(Speybroeck et al., 2016). U některých exemplářů může být skvrnitost ve druhé polovině těla zcela potlačena nebo může být uspořádání skvrn pravidelně liniové, což vytváří neobvykle kontrastní pruhy (Moravec, 2015, 2019). Ventrální zbarvení je pro každého jedince individuální a rozsahem skvrnitosti během jeho života neměnné, což napomáhá k jednodušší identifikaci jednotlivců (Baker & Allain, 2020). Spodní strana ocasu bývá vždy tmavá a beze skvrn, naopak ventrální strana hlavy bývá zcela bílá s občasnými tmavými elementy (Moravec, 2015). Juvenilní jedinci jsou zbarvení podobně jako dospělci, jejich barevný vzor je pouze výrazně kontrastnější a tmavé skvrny jsou zřetelněji ohraničené páskováním (Moravec, 2015). Přestože jsou napříč areálem výskytu včetně sousedního Slovenska hlášeny nálezy melanistických i albinistických jednotlivců, u nás zatím údaje o obdobných nálezech chybí (Gvozdenovic & Schweiger, 2014; Jablonski & Kautman, 2017; Moravec, 2015; Papežíková et al., 2020).

Navzdory vysoké individuální a mezipopulační variabilitě morfologických znaků, nebyla dosud žádné popsané formě připsána významnější taxonomická hodnota (Moravec, 2015; Speybroeck et al., 2016). Platnost jediného popsaného monotypického poddruhu *N. t. heinrothi* (Hecht 1930) žijícího na černomořském ostrově Serpilor byla vyvrácena, jelikož jeho původně popsané znaky neposkytovaly průkazné rozdíly k odlišení od ostatních populací (Gruschwitz et al., 1999). Na základě analýzy mitochondriální DNA vymezují Guicking et al. (2009) u tohoto druhu až devět evolučních linií s poměrně vysokými genetickými vzdálenostmi. To naznačuje, že k vnitrodruhovému štěpení došlo pravděpodobně již před 6–5 mil. let. Guicking & Joger (2011) předpokládají, že ke štěpení došlo díky dynamice střídajících se glaciálů a interglaciálů, kdy se populace *N. tessellata* stahovaly do refugií v Malé Asii či na Apeninském a Balkánském poloostrově, odkud zpětně osidlovaly Evropu. Sedm rozdílných linií bylo rovněž popsáno v asijském areálu rozšíření, kde významné refugium představovala také kaspická oblast (Jablonski et al., 2023). U *N. tessellata* jsou rovněž vzácně doloženy případy hybridizace s *N. natrix* (Mebert, 2011a). Na základě zkoumání fragmentů mitochondriální DNA těchto dvou druhů ve východním areálu jejich rozšíření Asztalos et al. (2021) dokazují, že u nich k hybridizaci dochází častěji než se očekávalo. Známé jsou rovněž případy hybridů s *Natrix maura* (Mebert, Trapp, Dall'Asta, et al., 2011).

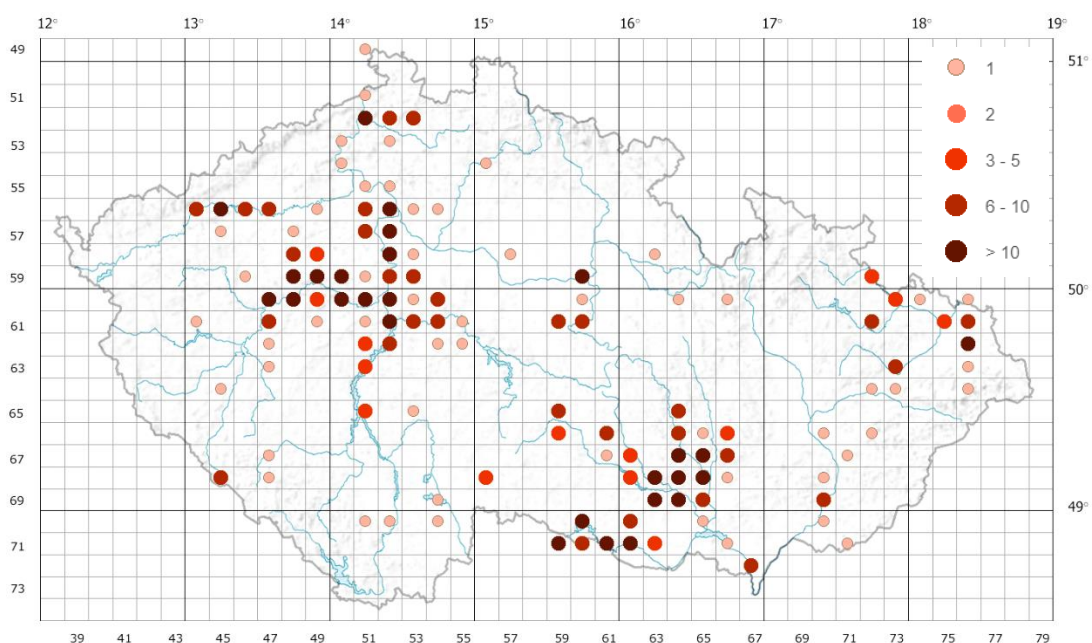
N. tessellata je jedním z nejrozšířenějších hadů. Recentní areál rozšíření tohoto výrazně polymorfního druhu se rozpíná v mírném až subtropickém klimatickém pásu od střední a jihovýchodní Evropy přes území Malé Asie a středoasijských republik po západní Mongolsko a Čínu (Guicking et al., 2009; Moravec, 2015; Sterijovski et al., 2014; Obr. 2). Tento areál zasahuje nejjižněji po deltu Nilu, Izrael, Jordánsko, Saudskou Arábii a Perský záliv, severní hranici tvoří sever Ukrajiny, území Ruska podél Volhy a sever Kazachstánu po úroveň jezera Balchaš (Moravec, 2015, 2019). V Evropě se druh vyskytuje na Apeninském poloostrově až po hranici s Francií a jižním Švýcarskem, kde jej v západní Evropě nahrazuje *N. maura* (Moravec, 2015; Speybroeck et al., 2016). Těžištěm výskytu je poté celý Balkánský poloostrov severně až po dunajské nížiny a jižní Moravu. Za severní hranicí souvislého areálu rozšíření se vyskytuje několik izolovaných populací v německém středním Porýní, v severních Čechách a ve Slezsku (Gruschwitz et al., 1999; Guicking et al., 2009). Tyto populace lze pravděpodobně považovat za pozůstatky širšího výskytu *N. tessellata* z období holocenního klimatického optima (Guicking & Joger, 2011). V jižnějších a teplejších oblastech výskytu může druh vystupovat poměrně vysoko do horských oblastí, v Bulharsku do 1420 m n. m. a ve střední Asii až do 3 000 m n. m. (Tuniyev et al., 2011).



Obr. 2: Areál rozšíření *N. tessellata* (IUCN, 2023).

Česká republika představuje severozápadní hranici areálu rozšíření druhu a *N. tessellata* zde obývají nížiny ve výškovém rozpětí 200–230 m n. m. s maximem

400 m n. m. (Baruš & Oliva, 1992; Moravec, 2015). Lokality výskytu českých populací jsou soustředěny v teplých a mírně teplých klimatických oblastech středních Čech, západního Slezska a jihozápadní Moravy (Mikátová et al., 2001). V Čechách je *N. tessellata* vázaná především na chráněná říční údolí dolních a středních toků Vltavy, Berounky, Sázavy, Ohře, ojediněle pak i Labe, Ploučnice a Chrudimky (Mikátová et al., 2001; Moravec, 2019; Pešanová, 2022). Na Moravě je výskyt soustředěn hlavně v říčních systémech Dyje, Jihlavy, Oslavy, Rokytné, Svratky a Svitavy (Mikátová et al., 2001; Moravec, 2019; ND OP AOPK, 2023). Na rozdíl od Čech se moravské populace mimo říční údolí častěji vyskytují i u stojatých vod (Moravec, 2019). Výhradně stojaté vody obývá i jediná životaschopná populace na území Slezska u Havířova (Vlček et al., 2010). Vzácně se vyskytují i nálezy mimo známé rozšíření, ty jsou ovšem v mnoha případech neprůkazné a sporné (Mikátová et al., 2001; Obr. 3).



Obr. 3: Počet nálezů *N. tessellata* v ČR (ND OP AOPK, 2023).

Tento druh hada je úzce vázaný na vodní prostředí, obývá především dobře prohřáté, pomalu tekoucí i stojaté vody, nejčastěji s kamenitým dnem či břehy (Mikátová et al., 2001; Moravec, 2015). Dle Gruschwitze et al. (1999) předurčují ve středoevropské oblasti přítomnost druhu toky s vyšší mírou oslunění, mělčinami a bohatou nabídkou potravy, šterkovité, částečně obnažené břehy a na ně navazující kamenité svahy vystavené delší sluneční expozici se zachovalým přirozeným

vegetačním pokryvem. Oproti populacím z okrajů areálu rozšíření, které jsou striktně stenotopní ve vazbě na tzv. říční fenomén, lze *N. tessellata* považovat za druh pozoruhodně eurytopní (Baruš & Oliva, 1992; Carlsson et al., 2011; Pešanová, 2022; Tuniyev et al., 2011). Ve střední Asii obývá horské bystřiny a v jižní části areálu i mediteránní a polopouštní oblasti včetně pobřeží (Tuniyev et al., 2011). Vyskytuje se v brakických vodách delt Nilu a Dunaje i slanovodním prostředí Kaspického jezera, Středozemního a Černého moře (Asztalos et al., 2021). V bezprostřední blízkosti vody se jedinci zdržují po většinu vegetačního období do vzdálenosti jen několika metrů (Mikátová et al., 2001; Moravec, 2015). Z pozorování Meberta (2011b) ale vyplývá, že se někteří jedinci mohou přesouvat na vzdálenost až 200 m od vodního zdroje. Druhu vyhovuje členitý pobřežní terén, vyhledává pobřežní porosty rákosí, křoviny, sutě a skalnaté či balvanité břehy, kde se může ukrývat, slunit a zároveň inkubovat snůšku (Baruš & Oliva, 1992; Mikátová et al., 2001; Moravec, 2015; Pešanová, 2022). *N. tessellata* taktéž hojně využívají antropogenních prvků, některé populace jsou dokonce zcela vázány na antropogenní prostředí (Conelli et al., 2011). Osidlují sypané hráze údolních nádrží, betonové překlady, kanály či výpustě, dále násypy, kamenivem zpevněné a nespárované svahy a valy související s výstavbou infrastruktury a protipovodňových opatření (Moravec, 2019; Velenský et al., 2011; Vlček et al., 2011). Přítomností těchto prvků v lokalitě se může životaschopnost populací zvyšovat (Moravec, 2015).

Aktivní období u střeoevropských populací *N. tessellata* trvá dle klimatických podmínek od přelomu března a dubna až do počátku října (Baruš & Oliva, 1992; Mikátová et al., 2001). Zimoviště se často nachází i několik set metrů od vody a je výše položené v kamenitém a suťovém podloží, ale často i ve starých nefunkčních zařízeních a objektech odčerpávání vod, kanalizací apod. (Baruš & Oliva, 1992; Pešanová, 2022). Každá populace využívá několik hromadných tradičních zimovišť, které často sdílí s dalšími syntopními druhy hadů (Mikátová et al., 2001; Moravec, 2015). Po opuštění zimoviště dochází v následujících dnech u většiny jedinců k migraci k vodě, ale ještě přibližně měsíc se vyskytují v okolí úkrytu, kde se sluní (Moravec, 2015; Neumann & Mebert, 2011). Aktivitu tohoto heliotermního hada lze označit za diurnální, v nejteplejších oblastech areálu rozšíření však může vykazovat i nokturnální způsob života (Mebert, Trapp, Kreiner, et al., 2011; Moravec, 2015).

N. tessellata umí obratně plavat a potápět se, na jedno nadechnutí vydrží pod vodou až 16 minut (Laňka, 1978; Moravec, 2015). Lovit začíná *N. tessellata* během květnových měsíců, kdy teplota vody dosahuje alespoň 12 °C (Šváb, 2003). Lovu v relativně studené vodě napomáhá schopnost behaviorální termoregulací udržovat vyšší teplotu těla v rozmezí cca 18–33 °C (Moravec, 2015; Šváb, 2003; Velenský et al., 2011). Na rozdíl od *N. natrix*, která plave především při hladině, loví tento druh zcela ponořený u dna zakleslý mezi kameny či větvemi (Hutinec et al., 2011; Moravec, 2019). Významnou složku potravy tohoto piscivora tvoří v našich podmínkách především úměrně velké kaprovité a okounovité ryby, pouze okrajově se v potravě objevují i obojživelníci (Baruš & Oliva, 1992; Mikátová et al., 2001; Weiperth et al., 2014). V rámci celého areálu rozšíření mají populace vysokou potravní přizpůsobivost, loví bezobratlé i silně jedovaté obojživelníky a drobné obratlovce včetně savců a ptáků, vzácně též jiné druhy plazů včetně zástupců vlastního druhu (Gruschwitz et al., 1999; Ponec, 1978). V přímořských oblastech převážnou část potravy tvoří také bentické druhy ryb, naopak v oblastech pouštních mohou ryby v potravním spektru zcela chybět (Hutinec et al., 2011; Weiperth et al., 2014). Během lovu ve slané vodě se druh vypořádává se salinitou pozoruhodně zvýšenou tolerancí k hypernatrémii bez dopadů na zdravotní kondici (Brischoux & Kornilev, 2014). Využívá lovecké strategie číhání i aktivního vyhledávání a kořisti se následně zmocňuje prudkým výpadem s otevřenými čelistmi (Van Wassenbergh et al., 2010). Úlovek ochromí hemoragicky a neurotoxicky působícími výměšky Duvernoyovy žlázy a pozře jej zpravidla na břehu (Hutinec et al., 2011; Kardong, 2002; Moravec, 2019).

K nejčastějším predátorům *N. tessellata* patří racci, draví a brodiví ptáci, větší zástupci hmyzožravců a lasicovité šelmy (Jelić & Lauš, 2011; Moravec, 2015). Mladí jedinci mohou sloužit jako kořist i větším dravým rybám. Pro méně stabilní populace pak může představovat zásadní hrozbu i predace nepůvodními a invazními druhy např. mývalem severním (*Procyon lotor*) a norkem americkým (*Neovison vison*; Mikátová et al., 2001; Moravec, 2015). Zejména poslední jmenovaný druh může *N. tessellata* těžce decimovat (Šváb, 2003). K ochraně využívá *N. tessellata* několika antipredačních strategií. Nejprve využívá svého disruptivního zbarvení a až po vycítění přímé hrozby volí neobvykle hbitý úprk na poměrně krátkou vzdálenost do zemního úkrytu nebo vody (Velenský et al., 2011; Vlček et al., 2010). Pokud dojde

k přímému napadení, jedinec nikdy neútočí, začne hlasitě syčet a vyměšovat z kloaky výrazně zapáchající sekret, kterým dokáže zasáhnout predátora i na několik metrů. Následně se začne svíjet a upadá do thanatózy (Moravec, 2015).

K páření na našem území dochází již po ukončení zimování a následné výrazné dubnové oteplení zpravidla spouští synchronizované páření za účasti většiny adultních jedinců (Velenský et al., 2011). Všichni jedinci se vzájemně tolerují a není u nich pozorována rivalita ani teritoriální souboje (Moravec, 2015; Šváb, 2003). U některých populací bylo zachyceno i podzimní páření (Conelli et al., 2011). *N. tessellata* je oviparním druhem (Speybroeck et al., 2016). Březost samic se pohybuje v rozmezí 70–100 dní a ke kladení vajec dochází v našich podmínkách od konce června až do počátku srpna (Baruš & Oliva, 1992; Mikátová et al., 2001; Velenský et al., 2011). Samice snůšku ukládají nejčastěji mimo zaplavované území do tlejících vrstev naplavenin rostlinné nebo trouchnivějící dřevní hmoty, výhřevných suťových svahů, pod umělé úkryty, ale také do kompostů a hnojišť v okolí lidských sídel až do vzdálenosti 1,5 km od vodního zdroje (Mikátová et al., 2001; Velenský et al., 2011; Vlček et al., 2011; Zwach, 2013). Inkubace 5–25, maximálně ovšem až 37 oválných vajec krytých bělavou pružnou skořápkou trvá při teplotě 24–26 °C přibližně 43–47 dní (Speybroeck et al., 2016; Velenský et al., 2011; Vlček, 1998). Mláďata se líhnou během srpna a září, měří přibližně 180–220 mm, většinou již daný rok nepřijímají potravu a míří společně s dospělci k zimovištím (Moravec, 2019). Do reprodukce se zapojují jedinci již při velikosti 400 mm a zpravidla po třetím zimování (Gruschwitz et al., 1999).

Mebert & Ott (2011) dokazují, že je *N. tessellata* za vhodných podmínek prostředí schopna dosáhnout vysokých populačních hustot. Těch dosahuje napříč celým areálem rozšíření, větší populace mohou čítat až tisíce jedinců, u menších izolovaných populací se zpravidla jedná o nižší stovky dospělých jedinců (Carlsson et al., 2011; Pešanová, 2022). Přesto jsou především izolované populace na okraji areálu rozšíření výrazně zranitelné a citlivé k nevhodným úpravám tělesa řek i břehů a technologii jejich zpevnění (Mikátová et al., 1995; Moravec, 2015; Velenský et al., 2011). Existenci celé populace může ohrozit i narušení a zneprístupnění společných zimovišť nebo fragmentace okolní krajiny silniční infrastrukturou na migračních trasách (Ioannidis & Mebert, 2011). Vliv na populace *N. tessellata* dle Peciny (1991)

má výstavba velkých přehradních nádrží, které výrazně snížily teplotu vody v dolním toku a ovlivnily tak druhové složení ryb a pohybovou aktivitu *N. tessellata*. Významný dopad na přímořské a jezerní populace má i rybolov, při němž hynou stovky jedinců zachyceny v ilegálních rybářských sítích (Sterijovski et al., 2014). Druhotným rizikem je dále úbytek ryb související se znečišťováním a kontaminací vod těžkými kovy a polutanty (Amr et al., 2011).

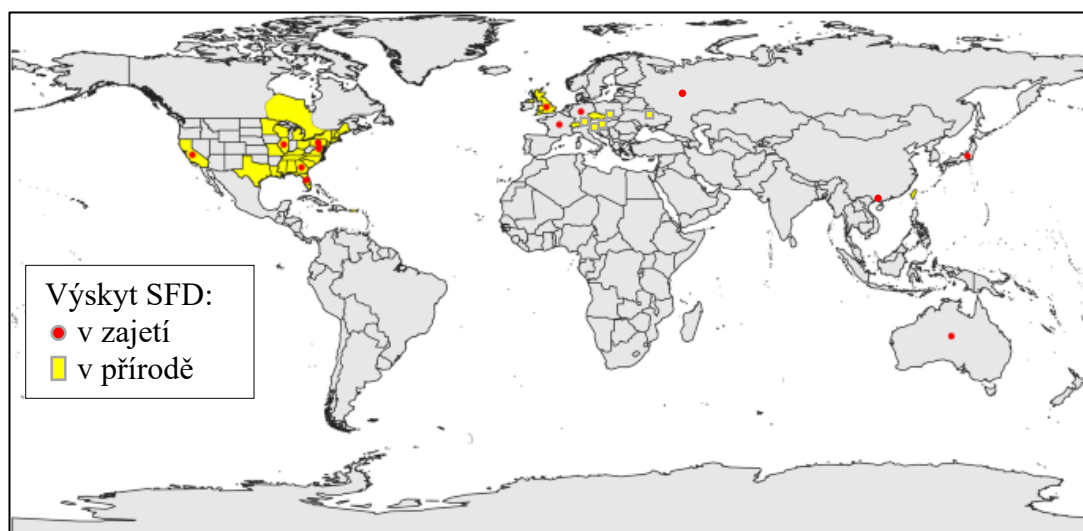
N. tessellata je považována hned po užovce stromové (*Zamenis longissimus*) za druhý nejvzácnější druh hada v ČR. Podle vyhlášky č. 395/1992 Sb. ve znění vyhlášky č. 175/2006 Sb. patří do kategorie kriticky ohrožených druhů a dle Chobota & Němce (2017) je klasifikován jako druh ohrožený (EN). Druh je chráněn také v rámci práva Evropského společenství, kde je uveden v příloze II Bernské úmluvy o ochraně evropských planě rostoucích rostlin, volně žijících živočichů a přírodních stanovišť a v příloze IV Evropské směrnice o stanovištích (92/43/EEC). Tento druh je zároveň dle IUCN (2023) klasifikován jako málo dotčený taxon s klesajícím populačním trendem.

1.2. Ophidiomykóza

Ophidiomykóza, neboli snake fungal disease (dále jen SFD) představuje keratinofilní infekční mykotické onemocnění hadů, jejímž původcem je *Ophidiomyces ophiodiicola* ze skupiny *Onygenaceae* (Allain & Duffus, 2019; Franklinos et al., 2017). Druh byl poprvé izolován a vědecky popsán v roce 2009 jako *Chrysosporium ophiodiicola* a do vlastního monotypického genomu byl zařazen až na základě rozsáhlé molekulárních revize (Rajeev et al., 2009; Sigler et al., 2013).

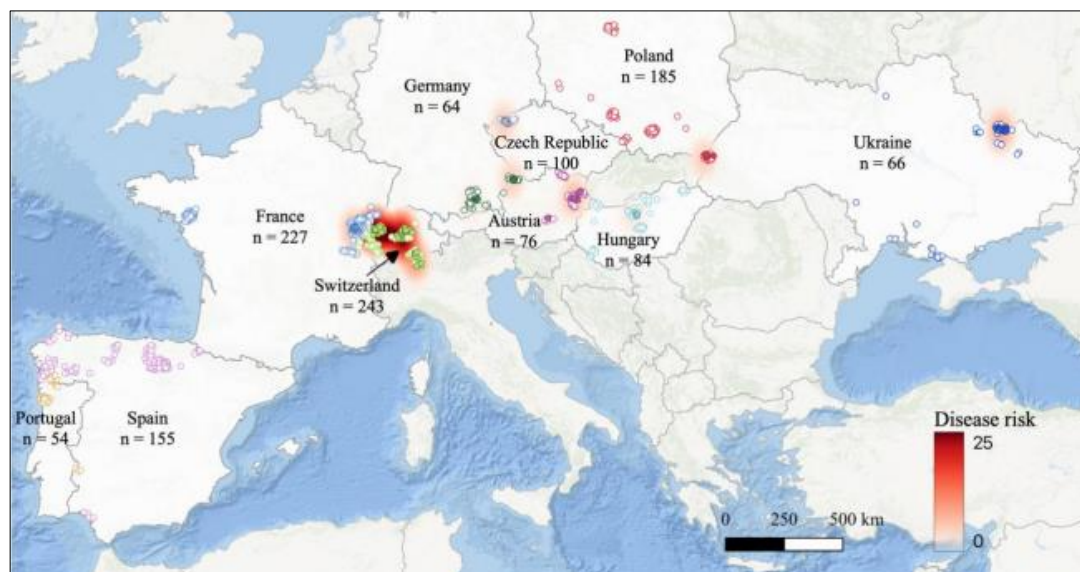
První výskyt SFD byl retrospektivně zaznamenán v roce 2000 u užovky černé (*Pantherophis obsoletus*) v severoamerické Georgii (Lorch et al., 2016; Rajeev et al., 2009). Od té doby byla nemoc detekována u volně žijících hadů téměř ve všech východních státech USA až po Texas, dále i v Kalifornii a při severní hranici Velkých Jezer zasahuje nákaza i na území Kanady (Allender, Raudabaugh, et al., 2015; Di Nicola et al., 2022). Mimo Severní Ameriku se podařilo nákazu izolovat u volně žijících hadů v Evropě, Taiwanu a nově také Číně (Franklinos et al., 2017; Grioni et al., 2021; Sun et al., 2021). Neustále také přibývá zachycení nákaz u jedinců držených v zajetí v Austrálii, Japonsku, Rusku a dalších evropských zemích, tito

importování jedinci z přírody mnohdy pochází ze zemí, ve kterých nákaza dosud nebyla zjištěna a způsob nakažení zvířat je tak spekulativní (Ovchinnikov et al., 2021; Sigler et al., 2013; Takami et al., 2021; Obr. 4). Původ nákazy zatím nebyl plnohodnotně vysvětlen. Lorch et al. (2016) předpokládá, že byl patogen zavlečen s importovanými druhy hadů. U nálezů SFD z Evropy, Taiwanu a USA však byly nalezeny tři odlišné klády, což podporuje teorii, že tyto jednotlivé klády mohou být endemité (Franklinos et al., 2017; Sun et al., 2021). Přítomnost nákazy na starém i novém kontinentu už v dřívější době dokazuje Origgi et al. (2022) na muzejních exponátech zpětně testovaných na SFD. Z nich byl pozitivně testován například exemplář užovky šarlatové (*Cemophora coccinea*) z Floridy pocházející z roku 1945 a taktéž exemplář užovky podplamaté (*Natrix tessellata*) nalezený v Itálii v roce 1959, tedy v obou případech cca 50 let před popsáním této nákazy.



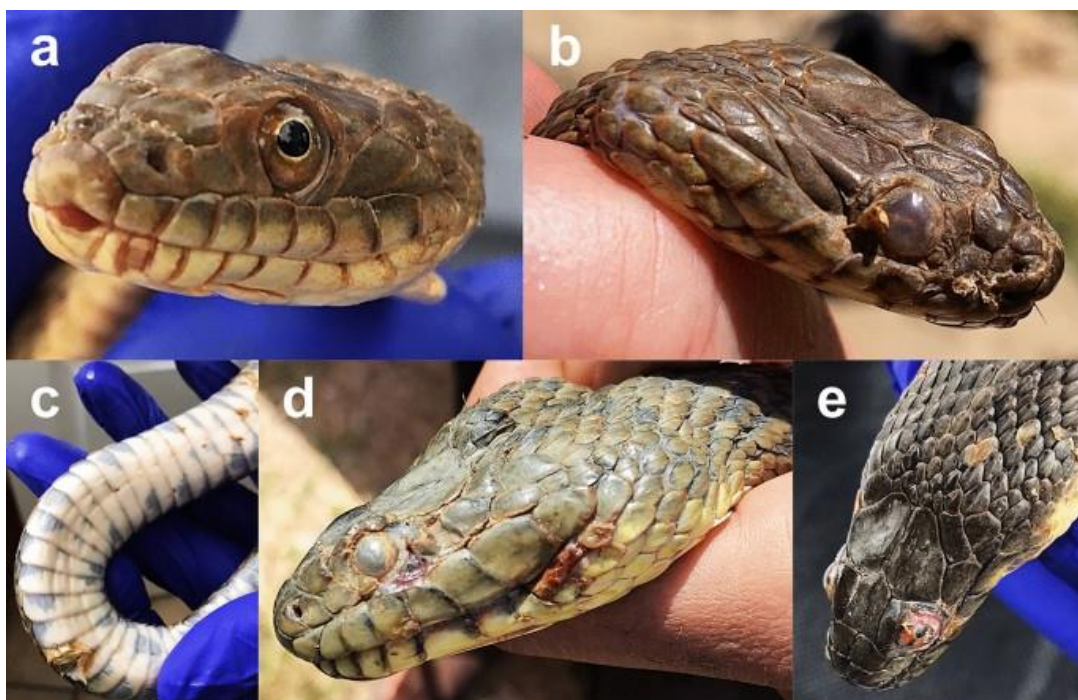
Obr. 4: Globální výskyt SFD k roku 2023 (Di Nicola et al., 2022, upraveno).

V Evropě byla nákaza u volně žijících hadů poprvé zaznamenána ve Velké Británii a České republice, následně byla izolována také u populací ve Švýcarsku a Itálii (Franklinos et al., 2017; Marini et al., 2023; Meier et al., 2018). Blanvillain et al. (2023) nově zaznamenala nákazu volně žijících hadů také na území Polska, Ukrajiny, Německa, Rakouska a Maďarska (Obr. 5). Včetně dosud nepublikovaných výsledků Příbyla et al. (2023), který pozitivně testoval populace u Bratislavy na Slovensku, se tak SFD vyskytuje ve všech našich sousedních státech. V ČR byla nákaza potvrzena u populací hadů v Poohří a u Brněnské přehrady (Blanvillain et al., 2023; Franklinos et al., 2017).



Obr. 5: Distribuce SFD ve vybraných státech Evropy (Blanvillain et al., 2023).

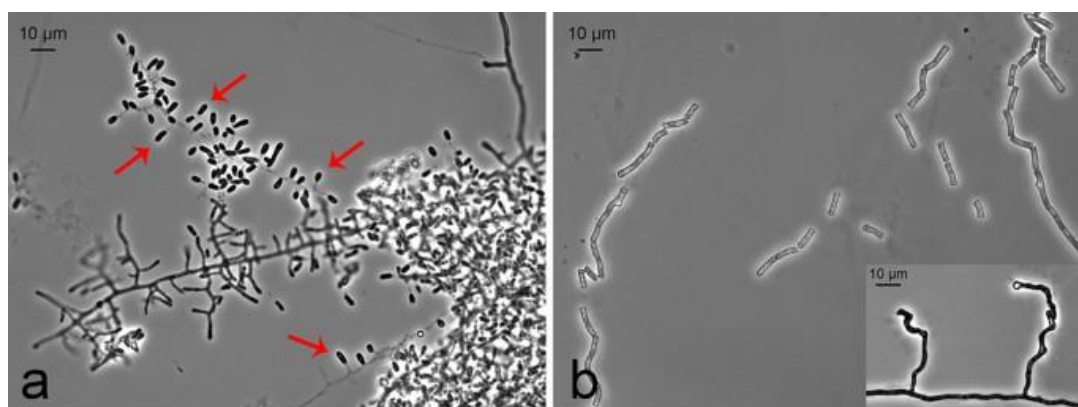
Klinickými příznaky infekce SFD jsou zpravidla rozsáhlejší dermatomykózy, které se projevují tvorbou ulcerózních dermatitid, krust a lézí s typickým žlutým až hnědým zabarvením v oblasti hlavy a rohovky, ale i celého těla a ocasu (Allender, Baker, et al., 2015; Franklinos et al., 2017; Lorch et al., 2016). Ve vážnějších případech může infekce progredovat do multifokálních kožních lézí, granulomatózního zánětu až nekrotických ložisek (Obr. 6). Příznaky doprovází časté a defektní svlékání, křivice a behaviorální horečka (Lind et al., 2022; Lorch et al., 2015). Déle trvající infekce přechází do chronicity, postihují kosterní svalovinu a hlubší struktury tkáně, kde dochází k vytváření granulomů (Lorch et al., 2016). V posledním stádiu vznikající orgánové léze dochází k systémovému kolapsu a úhynu postiženého hostitele (Allender, Raudabaugh, et al., 2015; Dolinski et al., 2015). Rozsáhlé infekce SFD bývají u volně žijících hadů poměrně vzácné a většina napadených jedinců podléhá sekundárním bakteriálním infekcím mnohem dříve než se dokáže SFD dostat do více rozvinutého stádia (Di Nicola et al., 2022; Lorch et al., 2016). Určení správného původce dermatomykóz hadů je bez izolace DNA prakticky neproveditelné, jelikož obdobné klinické příznaky a charakteristiky SFD vykazují také její další příbuzné druhy rodu *Nannizziopsis* a *Paranannizziopsis* (Sigler et al., 2013).



Obr. 6: Infikovaní jedinci *Nerodia harteri* (a, b) a *Nerodia rhombifer* (c–e) z Texasu (Harding et al., 2022).

K přenosu mezi jedinci pravděpodobně dochází přímým kontaktem nebo delším pobytem v kontaminovaném prostředí např. v zimovišti, kde může původce nákazy značnou dobu přežívat (Campbell et al., 2021; McKenzie et al., 2019). Popsán je i přenos z matky na mláďata u vejcoživorodých nebo živorodých druhů a také kontaminovanou skořápkou v případě druhů vejcorodých (Stengle et al., 2019). K infekci dochází po překonání první ochranné linie organismu skrze vnější vrstvu kůže tzv. stratum corneum (Allender, Raudabaugh, et al., 2015; Lorch et al., 2016). Vstupní branou patogenu mohou představovat i přirozená poškození a poranění kůže, které narušují ochrannou integritu pokožky (Lorch et al., 2015). Po proniknutí hyf houby do epidermis je spuštěna obranná reakce organismu, která většinou nedokáže zabránit dalšímu šíření infekce a již několik dní po nakažení se mohou projevovat první klinické příznaky (Lorch et al., 2015). Infikovaný jedinec má možnost bojovat proti onemocnění častějším svlékáním, kterým může v počátcích infekci odstranit a zotavit se (Lorch et al., 2016). Přesto může docházet k časté reinfekci a ve zhoršených stavech potřebuje had veterinární ošetření. Bohužel zatím neexistuje žádná účinná léčba, a proto u některých populací dosahuje mortalita nakažených jedinců až 90 % (Allender et al., 2018; Di Nicola et al., 2022; Haynes & Allender, 2021; Lorch et al., 2016). Zároveň však může být onemocnění latentní a bez

povšimnutí se šířit neznámými vektory až do plného propuknutí nákazy (Lorch et al., 2015).



Obr. 7: Mikroskopický preparát *O. ophioidiicola* s aleurokonidii (a) na hyfách a arthrokonidii (b) vytvořených fragmentací (Di Nicola et al., 2022, upraveno).

Vegetativní část *O. ophioidiicola* je tvořena rozvětvenou stélkou a jednotlivé somatické hyfy jsou přepážkovité, tenkostěnné a úzké 1,5–2,5 µm (Rajeev et al., 2009; Sigler et al., 2013). Hyfy se větví laterálně od hlavní stélky, plodné hlavní hyfy s postranními zvlněnými větvemi se výrazně diferencují do řetězců s konidii (Ohkura et al., 2016; Obr. 7). Druh se rozmnožuje nepohlavně pomocí vzduchem se šířících anamorfních konidii, které se dělí na aleuriokonidie a artrokonidie s extrémně pevnou strukturou (Allender, Baker, et al., 2015). Aleurokonidie jsou cylindrické, 2,5–8,3 µm dlouhé, 1,5–2,9 µm široké a vyrůstají na krátkých stopkách po stranách hyf, z nichž se oddělují (Ohkura et al., 2016). Arthrokonidie jsou naopak generovány fragmentací již existujících plodných hyf a mají delší válcovitě oblý tvar s rozměry 3–12,5 µm na délku a 1,5–3,5 µm na šířku (Sigler et al., 2013). V napadených tkáních se povětšinou vyskytují pouze arthrokonidie (Paré & Sigler, 2016). Tuto houbu je možné kultivovat v laboratorních podmínkách na agaru z bramborového škrobu v rozpětí teplot 7–35 °C (Rajeev et al., 2009; Sigler et al., 2013). Nárůsty mají bílé až nažloutlé zbarvení, sametovou až granulovitou texturu a produkují silný odér (Rajeev et al., 2009). Campbell et al. (2021) dokazuje, že v přirozených podmínkách druh prosperuje na sterilních půdách bez přítomnosti mikrobiální flóry a jeho prevalence je vyšší v půdách odebraných ze zimovišť hadů nežli ve vrchních profilech běžné zeminy.

SFD byla doposud celosvětově detekována u 62 druhů hadů, z toho u 42 zástupců pochází z volně žijících populací hadů nejčastěji z podčeledi Colubrinae a Natricinae (Blanvillain et al., 2023; Di Nicola et al., 2022; Haynes & Allender, 2021). Nejzávažnější průběh a vysokou mortalitu a prevalenci choroba vykazuje u populací hadů v Severní Americe, kde především u chřestýše lesního (*Crotalus horridus*), chřestýška malého (*Sistrurus catenatus*), užovky Couperovy (*Drymarchon couperi*) a užovky mokasínové (*Nerodia sipedon*) došlo k průkaznému poklesu nakažených populací (Allender et al., 2011; Chandler et al., 2019; Clark et al., 2011; Lorch et al., 2016). Včetně těchto jsou dalšími výrazně zranitelnými hostitelskými druhy např. užovky rodu *Nerodia*, *Regina*, *Pantheropsis*, *Pituopsis*, *Thamnophis* nebo *Lampropeltis* (Lorch et al., 2016). Pozitivně testování zástupci některých druhů naopak nevykazují žádné negativní dopady SFD na jejich populace (Di Nicola et al., 2022; Lorch et al., 2016).

V Evropě byla nákaza zjištěna u 21 druhů, z nichž 80 % všech pozitivních případů bylo zaznamenáno u rodu *Natrix* (Blanvillain et al., 2023). Nejvíce výskyt SFD mají druhy s nejvyššími prevalencemi SFD jsou užovka podplamatá (*Natrix tessellata*) a užovka obojková (*Natrix natrix* a *N. helvetica*), méně štíhlovka žlutozelená (*Hierophis viridiflavus*) s užovkou stromovou (*Zamenis longissimus*), vzácněji užovka maurská (*Natrix maura*) a užovka hladká (*Coronella austriaca*), ojedinělé a zanedbatelné případy představuje zmije obecná (*Vipera berus*) a zmije ukrajinská (*Vipera nikolskii*; Blanvillain et al., 2023; Franklinos et al., 2017). Vzhledem k nedostatku údajů o zdravotním stavu populací a absenci dlouhodobého monitoringu nebyl na evropském kontinentu, kromě výskytu mírných klinických příznaků a několika úhynů, popsán žádný negativní dopad SFD na populace autochtonních druhů (Allain & Duffus, 2019; Franklinos et al., 2017; Meier et al., 2018).

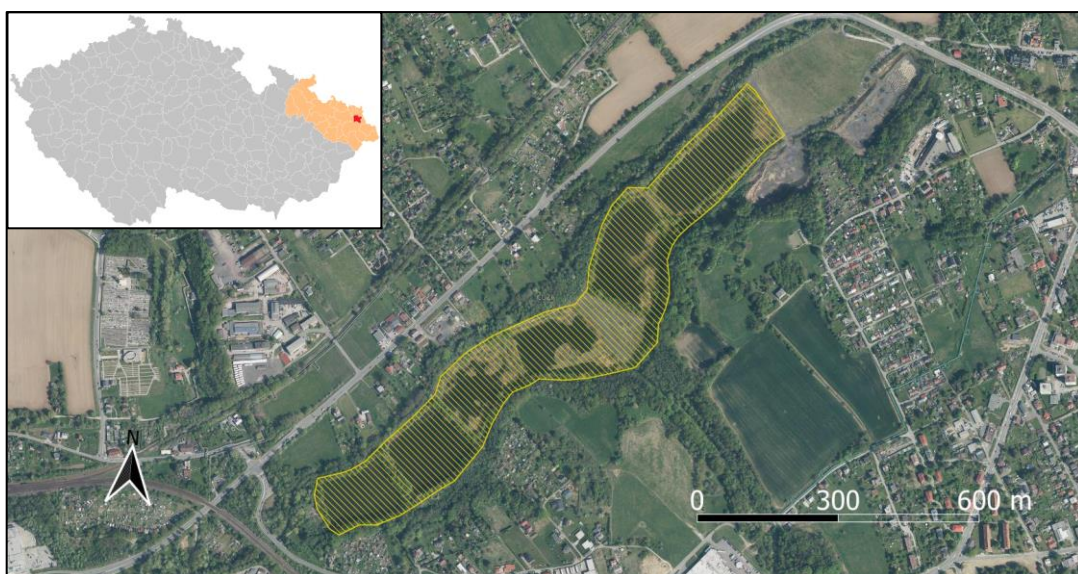
2. Cíle práce

1. Posouzení výskytu SFD u vybrané populace *N. tessellata*:
 - a. detekce onemocnění SFD a výpočet prevalence onemocnění
 - b. sumarizace výskytu SFD v ČR.
2. Zjištění morfologických parametrů studované populace *N. tessellata*:
 - a. srovnání hmotnosti, délky a váhy jednotlivých jedinců,
 - b. vytvoření fotografické databáze odchycených jedinců.
3. Zjištění zdravotních komplikací nalezených jedinců:
 - a. dokumentace traumatických změn jednotlivých případů.

3. Materiál a metody

3.1. Charakteristika lokality

Výzkum probíhal na Sušanských rybnících u Havířova v Moravskoslezském kraji ve vegetační sezóně 2022–23 (Obr. 8). Jedná se o člověkem uměle vytvořené vodní plochy na bývalé výsypce vytěžené hlušiny. Populace *N. tessellata* je zde známa teprve od roku 1998 (Vlček, 1998; Vlček et al., 2010, 2011). Dle výsledků analýzy mitochondriální DNA se pravděpodobně nejedná o autochtonní populaci (Jablonski et al., 2014). Mozaika obnažených, kamenitých a vegetací zarostlých ploch poskytuje *N. tessellata* vhodná místa k vyhřívání, úkrytu i kladení vajec. V několik metrech mocných vrstvách hlušiny zároveň mohou úspěšně přezimovat (Moravec, 2015; Vlček et al., 2011).



Obr. 8: Sušanské rybníky (zdroj: ČZKÚ).

Sušanská rybníční soustava je tvořena šesti rybníky o celkové rozloze cca 20 ha. Leží v průměrné nadmořské výšce 250 m n. m. a spadá pod mírně teplou klimatickou oblast MT10 vyznačující se dlouhým, teplým, suchým létem a mírně teplou, velmi suchou a krátkou zimou (Quitt, 1975). Ze severozápadní strany obtéká lokalitu říčka Sušanka a z jihovýchodu na soustavu navazuje výraznější svah s převýšením přibližně 20 m. Současnou vegetací obklopující rybníční soustavu tvoří dle aktuální vrstvy mapování biotopů údolní jasanovo-olšové luhy (biotop L2.2) a polonské dubohabřiny (biotop L3.2.; Chytrý et al., 2010). Jádro lokality lze

charakterizovat jako mozaiku nepřírodních biotopů v již pokročilém stádiu sukcese (Obr. 9). Je tak postupně osidlována pionýrskými dřevinami či velkým množstvím ruderalních a nepůvodních druhů cévnatých rostlin. Z těchto jsou běžné naturalizované druhy např. pupalka dvouletá (*Oenothera biennis*), druhy zplanělé např. růže mnohokvětá (*Rosa multiflora*) a zároveň invazní druhy jako locika kompasová (*Lactuca serriola*), javor jasanolistý (*Acer negundo*), křídlatka japonská (*Reynoutria japonica*) nebo netýkavka žláznatá (*Impatiens glandulifera*). Všechny rybníky soustavy doprovází místy i bohaté litorální porosty eutrofních stojatých vod zastoupené rákosem obecným (*Phragmites australis*), zblochanem vodním (*Glyceria maxima*) či orobincem široolistým (*Typha angustifolia*). U této vegetace docházelo k častému vypalování od neuhášených nedopalků. Vegetaci mělkých stojatých vod dále tvoří i hojné porosty rdestu kadeřavého (*Potamogeton crispus*) a v minulosti zde byl dle ND OP AOPK (2023) zaznamenán i výskyt kriticky ohrožené řečanky menší (*Najas minor*).



Obr. 9: Postupně zarůstající částečně osluněné svahy rybníků.

Volně dostupné Sušanské rybníky ve vlastnictví soukromé realitní společnosti nejsou využívány k produkčnímu chovu ryb ani nespádají do rybářského revíru. Přesto se zde vyskytuje mnoho převážně plevelných ryb, které představují pro *N. tessellata* ideální potravní zdroj (Baruš & Oliva, 1992; Moravec, 2015). Díky místním rybářům

se ve všech rybnících vyskytuje nejběžněji plotice obecná (*Rutilus rutilus*), okoun říční (*Perca fluviatilis*), kapr obecný (*Caprinus carpio*), štika obecná (*Esox lucius*), zavlečen sem byl karas stříbrný (*Carassius gibelio*) a střevlička východní (*Pseudorasbora parva*; Vlček et al., 2010). Ze syntopních druhů plazů můžeme jmenovat slepýše křehkého (*Anguis fragilis*), užovku obojkovou (*Natrix natrix*) a zejména silnou populaci ještěrky obecné (*Lacerta agilis*). Z obojživelníků se v lokalitě rozmnožuje ropucha obecná (*Bufo bufo*), skokan zelený (*Pelophylax esculentus kl.*) a skokan štíhlý (*Rana dalmatina*). V lokalitě hnízdí několik párů rákosníka velkého (*Acrocephalus arundinaceus*), strnadů rákosních (*Emberiza schoeniculus*) a pár motáka pochopa (*Circus aeruginosus*). Za zmínku stojí i výskyt bobra evropského (*Castor fiber*), který pro *N. tessellata* vytváří z nahromaděných větví na březích vhodné úkrytové možnosti. Predátory *N. tessellata* zde může představovat liška obecná (*Vulpes vulpes*), psík mývalovitý (*Nyctereutes procyonoides*) nebo volavka popelavá (*Ardea cinerea*; Moravec, 2015). Místní občané, kteří se v lokalitě věnují rybolovu pro vlastní potřebu, *N. tessellata* tolerují. K mortalitě ze strany člověka dochází pouze u jedinců, jenž náhodně hynou pod koly cyklistů.

3.2. Odchyt a měření morfologických charakteristik

Odchyty a odběry vzorků probíhaly ve vegetačním období roku 2022 a 2023 díky výjimce AOPK č. j. SR/0150/US/2018-22, 23. Vhodná stanoviště jsem navštěvoval a systematicky procházel dle metodiky AOPK (Jeřábková, 2011). Předpokladem pro odchyt co možná nejvíce jedinců bylo nedůležitější volit vhodnou dobu návštěv dle počasí. Úspěšnost odchytů byla nejvyšší za chladnějšího počasí, kdy se jedinci častěji slunili. Naopak nejnižší úspěšnost byla za vysokých teplot, kdy se jedinci vyskytovali především ve vodě, v hůře dostupných litorálech, nebo se ukrývali v jiných přirozených skrýších (Moravec, 2015). Pro nalezení jedinců jsem využíval přirozených úkrytů (kameny, klády či materiály antropogenního původu), zároveň jsem v lokalitě vhodně rozmístil umělé úkryty v podobě černé PVC folie o rozměrech 40 x 80 cm, kterou jsem označil informativním štítkem s uvedením kontaktu (Vlašín & Mikátová, 2007). Tyto umělé úkryty bohužel nebyly efektivní a drtivá většina jich byla záhy nevratně zničena vandaly nebo odcizena (Obr. 10).

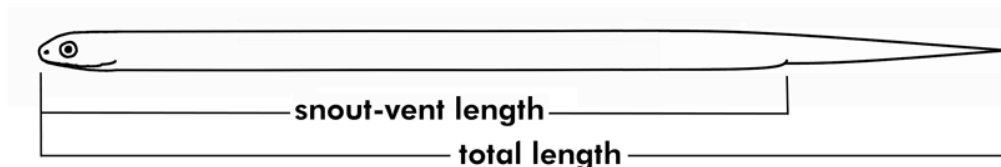


Obr. 10: Jeden z instalovaných umělých úkrytů (vlevo) a jejich pozůstatky (vpravo).

Odchyt jedinců spočíval v bleskovém výpadu, který byl veden s velkým předstihem ve směru předpokládaného úniku do vody či husté vegetace. Pro potřeby výzkumu jsem neodchytoval mladé jedince, u nichž je možnost přítomnosti SFD zanedbatelná (Lorch et al., 2016). Zaměřil jsem se na starší jedince včetně těch s viditelně zhoršenou fyzickou kondicí (Franklinos et al., 2017).

S drženými jedinci jsem manipuloval v jednorázových chirurgických rukavicích, abych zabránil případnému přenosu infekce a zamezil potřísnění rukou silně zapáchajícím obranným sekretem (Lorch, 2018; Moravec, 2015). Mimo dobu manipulace jsem hady umístil do jednorázově využívaných látkových pytlíků (Mikátová et al., 1995). V první řadě jsem u každého jedince zaznamenal lokaci nálezu, datum odchyty a odhad pohlaví. Následně jsem provedl vážení pomocí pružinové závěsné nebo tenzometrické váhy s přesností 1g. Od celkové váhy jsem odečetl váhu pytlíku. Po zvážení jsem hada fixoval jednou rukou za hlavou a druhou před kloakou. Ke zjištění rozměrů Ltot (total length) a SVL (snout-vent length), z nich jsem následně vypočítal Lcd (tail length; Moravec, 2015; Obr. 11) jsem využil klasického svinovacího metru, ke kterému jsem jedince přiložil a postupně vyrovnal. Poté jsem pořídil fotodokumentaci dorzálního zbarvení šupin pro vytvoření fotografické databáze pro následnou identifikaci případného zpětného odchyty

(Baker & Allain, 2020; Dodd, 2016). V závěru jsem jedince ohledal na přítomnost různých poškození či kožních lézí a odebral vzorky. S odchycenými jedinci jsem manipuloval pouze po dobu nejdéle nutnou a následně je vrátil poblíž místa nálezu (Lorch, 2018; Mikátová et al., 1995).



Obr. 11: Schéma měřených morfologických délek (Matsuda et al., 2006, upraveno).

3.3. Odběr vzorků

Před návratem jedince do přírody jsem provedl bukální a kožní stěr. Získaný vzorek bukální sliznice jsem uchoval v 80% roztoku ethanolu. Během odebrání kožních vzorků jsem postupoval dle Lorcha (2018) a protokolu o sběru vzorků. Vzorky jsem získal důkladným setřením přilehlé strany a meziprostor 10 ventrálních šupin a následně celého povrchu těla. Pokud měl jedinec viditelně poškozené šupiny či náznaky kožních lézí, provedl jsem stěr v těchto místech. K odběru vzorků jsem použil sterilních vatových tampónů a pracoval v čistých chirurgických rukavicích, abych zamezil kontaminaci. Odebrané vzorky jsem umístil do odběrových mikrozkušavek s oranžovým silikagelem a označil je jedinečným číselným kódem jedince, datem, piktogramem pohlaví a zkratkou lokality. Takto získané vzorky jsem uchovával zmrazené v doporučeném rozmezí -20–80 °C až do doby jejich laboratorní analýzy. Včetně stěrů jsem v lokalitě sbíral i exuvie, které jsem umísťoval jednotlivě do vzduchotěsných sáčků s jedinečným označením a zamrazil.

3.4. Laboratorní příprava a analýza vzorků

Pro potřeby této práce byly kožní stěry a exuvie vyhodnocovány na přítomnost SFD. Stěry bukální sliznice budou použity pro možnou analýzu DNA jedinců za účelem zjištění původu populace a zajištění vazeb s populacemi v tradičním areálu rozšíření.

Veškeré laboratorní úkony jsem provedl v laboratoři Ústavu ekologie a chorob zoozvířat, zvěře, ryb a včel Veterinární a farmaceutické univerzity v Brně (Obr. 12). K detekci přítomnosti SFD z odebraných vzorků bylo nejdříve zapotřebí izolovat DNA. Během celého procesu izolace DNA a detekce nákazy jsem postupoval dle

předepsaných laboratorních protokolů ze studií Blooi et al. (2013) a Hyatt et al. (2007). Dle protokolu jsem za sterilních podmínek započal navážením 100 mg zirkonia do uzavíratelných zkumavek. Pomocí jednorázového skalpelu jsem připravil preparáty odříznutím špičky jednotlivých tampónů s kožními stěry. Ty jsem za pomoci pinzety vložil do připravených zkumavek se zirkoniem. Zbylé části tamponů jsem uschoval pro další možné analýzy. Během přípravy preparátů jsem mezi jednotlivými vzorky pinzetu pečlivě dezinfikoval v roztoku Virkon®S degradující DNA, následně opláchl ve sterilní vodě a osušil v buničině. Po zhotovení všech preparátů jsem do zkumavek doplnil 125 μ l PrepMan®Ultra činidla, tak aby byl preparát zcela ponořený. V dalším kroku jsem použil homogenizátor TissueLyser II, v němž jsem zkumavky ponechal po dobu 45 sekund při frekvenci 25 kmitů za sekundu. Po uplynutí této doby jsem zkumavky nechal centrifugovat v zařízení MiniSpin® 30 sekund při 13 000 otáčkách za minutu. Následně jsem proces homogenizace a centrifugace ještě jednou obdobně zopakoval. Vzorky jsem zahříval v AccuBlock™ Digital Dry Bath na teplotu 100 °C po dobu 10 minut. Před závěrečnou centrifugací jsem nechal preparáty 2 minuty vychladnout.

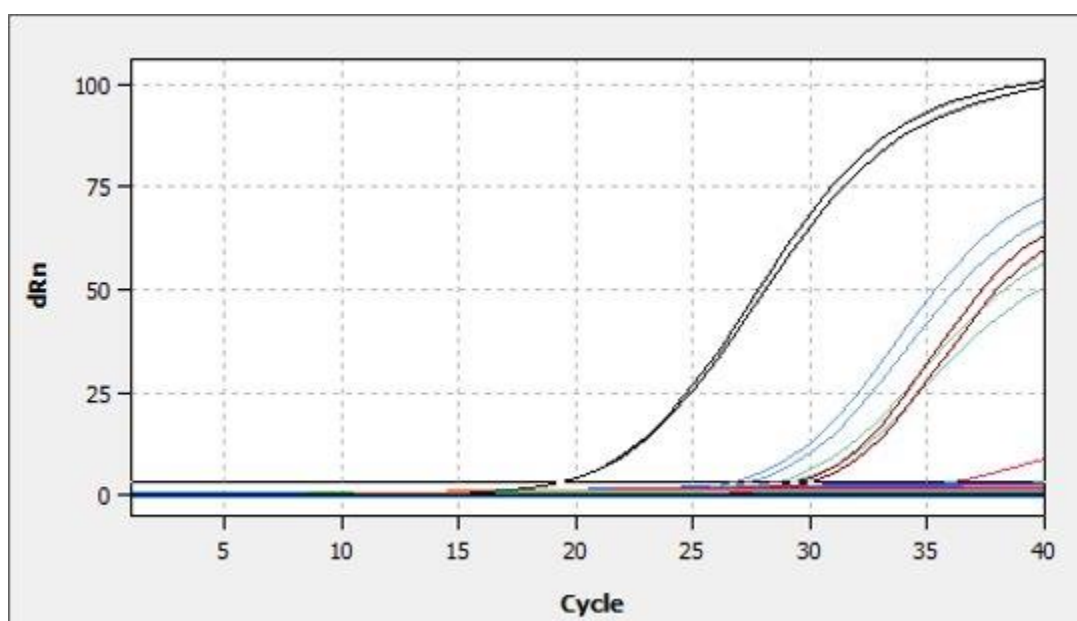


Obr. 12: Využitá laboratorní technika.

Následný postup probíhal ve flowboxu dle protokolu experimentu (Příloha 3). Vzorek izolované DNA jsem v množství 5 μ l napipetoval do směsi 20 μ l PCR master

mixu a 5 μ l standartního roztoku, které jsem již před tím zanesl do vzorkových plat ABI reaction tray. Během tohoto postupu jsem vzorky duplikoval. Případné kontaminaci jsem zabránil přelepením plat speciální folií MicroAmp® Optical Adhesive Film, která zároveň umožňuje optické vyhodnocení vzorků. Připravené vzorky jsem centrifugoval 30 sekund při 1000 otáčkách za minutu a následně jsem je umístil do přístroje qTOWER³ případně LightCycler® který provedl qPCR.

Metoda qPCR, též zvaná jako kvantitativní PCR či real-time PCR, je schopna na rozdíl od klasické PCR na základě principu fluorescence změřit s vysokou přesností koncentraci cílových segmentů DNA v reálném čase (Bohuski et al., 2015). Výsledkem tak není pouze konečný pozitivní nebo negativní výsledek, ale díky cyklickému snímání fluorescenčního záření optickým zařízením vzniká prostřednictvím specializovaného softwaru amplifikační křivka (Růžicková, 2012). Na základě toho jsem mohl získané informace vyhodnocovat i kvantitativně. Dle množství segmentů DNA obsažených ve vzorcích jsem měl možnost výsledky definovat jako pozitivní, ekvivalentní, negativní nebo neprůkazné (Bloo et al., 2013). Při každém vyhodnocování touto metodou jsem ke vzorkům umístil vždy jeden kontrolní pozitivní a negativní vzorek. Ve výsledné amplifikační křivce je nejprve patrná pozitivní kontrola a poté se přibližně ve 25–30 cyklech projeví případné pozitivní vzorky a závěrem také pozdní amplifikace, které jsou ekvivalentní a neprůkazné (Obr. 13).



Obr. 13: Příklad amplifikační křivky (Baláž, vlastní šetření).

3.5. Statistické vyhodnocení dat

Analýzu vzorků metodou qPCR jsem vyhodnotil v softwarovém programu qPCRsoftV 4.1.3. a LightCycler480 Software 1.5.1.62 (Příloha 1–2), ke stanovení prevalence onemocnění SFD u populace *N. tessellata* v Havířově jsem využil program Quantitative Parasitology 3.0 (Rozsa et al., 2000). Ke statistickému zpracování morfologických charakteristik a tvorbě grafů jsem použil Rstudio 4.2.1., kde jsem ověřil i normální rozdělení dat. Pro srovnání morfologických délek mezi pohlavími jsem použil neparametrický dvouvýběrový Mann-Whitney a Wilcoxonův test. Rozdíl mezi pohlavím v relativní hmotnosti a délce těla a ocasu jsem stanovil na základě analýzy kovariance (ANCOVA). Data pro analýzu kovariance jsem nejprve zlogarituloval, aby došlo ke zlepšení homogenity regresních křivek a linearity vztahu proměnných. Závěrem jsem logaritmovaná data testoval obecným lineárním modelem. Využil jsem také biometrických indexů SVL/Lcd a Ltot/Ldc (Baruš & Oliva, 1992). Mapové podklady jsem provedl v Qgis 16.2 na podkladových mapách CZKÚ.

4. Výsledky

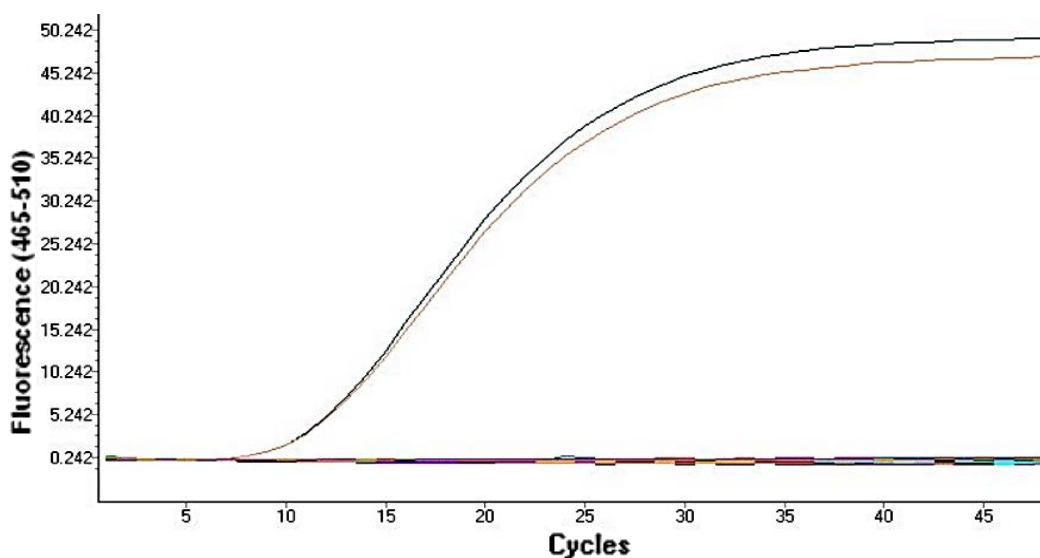
V období od 3. 6. 2022 do 2. 6. 2023 jsem zdokumentoval a odebral vzorky celkem 46 jedincům *N. tessellata* a jedné *N. natrix*. Jednalo se o 20 samců a 26 samic, z nichž bylo 38 jedinců adultních a 8 subadultních (Tab. 1).

Tab. 1: Počet zdokumentovaných jedinců v roce 2022 a 2023. Počet subadultů v závorkách. M = samci, F = samice.

Rok a druh	M	F	Celkem (n)
2022			
<i>N. tessellata</i>	5 (4)	7 (1)	12 (5)
2023			
<i>N. tessellata</i>	14	19 (3)	33 (3)
<i>N. natrix</i>	1	0	1
n	20 (4)	26 (4)	46 (8)

4.1. Výskyt SFD u vybrané populace *N. tessellata*

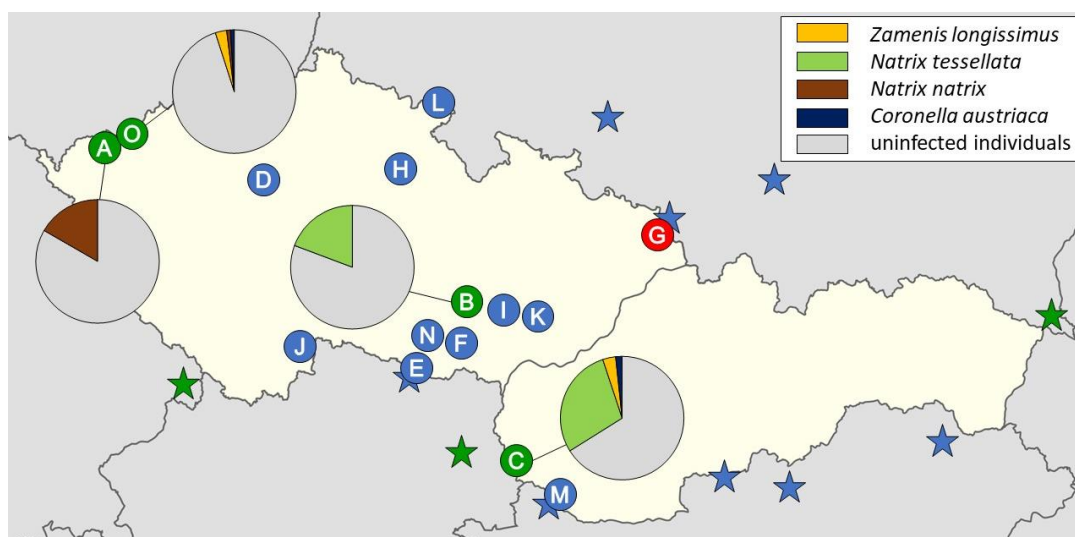
Na základě izolace DNA a analýzy vzorků metodou qPCR nebyla SFD detekována u žádného z odebraných vzorků (N = 46), včetně jedinců s výskytem podezřelých traumatických změn na kůži (viz. Kapitola 4.1.). Jak je patrné z amplifikační křivky, všechny vzorky včetně negativní kontroly byly průkazně negativní, naopak pozitivně se projevíly pouze vzorky pozitivní kontroly. Nebyla zaznamenána ani žádná ekvivalentní hodnota (Obr. 14).



Obr. 14: Výsledek qPCR s amplifikační křivkou pozitivní kontroly.

Ze získaného souboru odebraných vzorků z populace *N. tessellata* jsem vypočítal prevalenci onemocnění v 95% konfidenčním intervalu. Pro rok 2022 jsem stanovil prevalenci 0–24,2 % (n = 12), pro rok 2023 0–10,1 % (n = 33) a za celé dvouleté období se prevalence pohybuje v rozmezí 0–8,3 % (n = 45, Příloha 4–6). Statisticky tedy stále existuje malá pravděpodobnost výskytu nákazy, přesto se však populace jeví i díky absenci typických klinických příznaků jako prostá nákazy SFD.

SFD bylo v ČR prokázáno na Brněnské přehradě, Ohři a Perninku v Krušných horách. Ze SR je nákaza známá pouze z Devína u Bratislavy. Největší nasbíraný vzorek pochází z Brněnské přehrady, kde bylo odchyceno 275 jedinců, z nichž byla nákaza zjištěna u 53 individuí. Druhý největší vzorek čítající 100 jedinců byl zkompletován z Ohře od pěti druhů hadů, z nichž bylo pět testováno pozitivně. Jediný pozitivní výsledek z celkových šesti vzorků byl zaznamenán také u Perninku. Vzorek z Devína v SR obsahoval stěry 41 individuí, z nichž bylo pozitivních dokonce 15 jedinců. Z negativně testovaných lokalit pochází největší množství testovaných vzorků z Havířova (n = 46). Na SFD byly testovány všechny naše druhy hadů, nejčastěji nakaženými se jeví *N. tessellata*, méně pak *N. natrix* a ojediněle i *C. austriaca* a *Z. longissimus*. U *V. berus* zatím z našich podmínek záznam o infekci známý není (Tab. 2, Obr. 15).



Obr. 15: Výskyt SFD v ČR a SR a poměrové zastoupení pozitivně testovaných jedinců, zelené body – pozitivně testované populace, modré body – nákazy prosté populace, červený bod – populace posuzovaná v této práci, kruhové body – lokality ČR a SR, hvězdičky – další zahraniční lokality, další popis včetně označení lokalit viz Tab. 2).

Tab. 2: Sumarizace výskytu SFD u volně žijících hadů v ČR a SR, zahrnuty jsou i ekvivalentní výsledky (eq.). V závorkách označení lokality v Obr. 15.

Lokalita, stát (označení Obr. 15)	Studie	Studované druhy	Velikost vzorku (n)	Pozitivní případy (n)
Pernink, ČR (A)*	Příbyl et al. 2023	<i>N. natrix</i>	1	1
		<i>V. berus</i>	4	0
Přehrada Brno, ČR (B)	Příbyl et al. 2023	<i>C. austriaca</i>	6	1 eq.
		<i>N. natrix</i>	12	1 eq.
		<i>N. tessellata</i>	257	53; 23 eq.
Devín, SK (C)	Příbyl et al. 2023	<i>C. austriaca</i>	1	1
		<i>N. tessellata</i>	40	14
Úholičky, ČR (D)	Příbyl et al. 2023	<i>N. natrix</i>	1	0
		<i>N. tessellata</i>	12	1 eq.
NP Podyjí, ČR (E)	Příbyl et al. 2023	<i>N. tessellata</i>	16	0
		<i>Z. longissimus</i>	3	0
Pasohlávky, ČR (F)	Příbyl et al. 2023	<i>N. natrix</i>	32	0
Havířov, ČR (G)	Tato práce	<i>N. natrix</i>	1	0
		<i>N. tessellata</i>	45	0
PR Na Plachtě, ČR (H)	Příbyl et al. 2023	<i>V. berus</i>	2	0
Člupy, ČR (I)	Příbyl et al. 2023	<i>C. austriaca</i>	1	0
Majdalena, ČR (J)	Příbyl et al. 2023	<i>N. natrix</i>	1	0
Salaš, ČR (K)	Příbyl et al. 2023	<i>C. austriaca</i>	1	0
Vizňov, ČR (L)	Příbyl et al. 2023	<i>V. berus</i>	1	0
Bodíky, SR (M)	Příbyl et al. 2023	<i>N. tessellata</i>	1	0
		<i>Z. longissimus</i>	1	0
		<i>C. austriaca</i>	3	0
Údolí Jihlavy, ČR (N)	Kabelka 2023 (nepubl.)	<i>N. natrix</i>	1	0
		<i>N. tessellata</i>	3	0
		<i>C. austriaca</i>	19	1
Ohře, ČR (O)	Blanvillain et al. 2023	<i>N. natrix</i>	15	1
		<i>N. tessellata</i>	17	0
		<i>V. berus</i>	9	0
		<i>Z. longissimus</i>	40	3
		Celkem (N)	546	74; 26 eq.

Výsledky analýzy výskytu SFD u havířovské populace *N. tessellata* jsem již prezentoval na mezinárodní konferenci Zoologické dny Brno 2023 (Příloha 7) a budou také zahrnuty do vědeckého článku, jehož manuskript již byl akceptován pro tisk v impaktovaném časopise Journal of Vertebrate Biology (Příloha 8).

4.2. Morfologické parametry

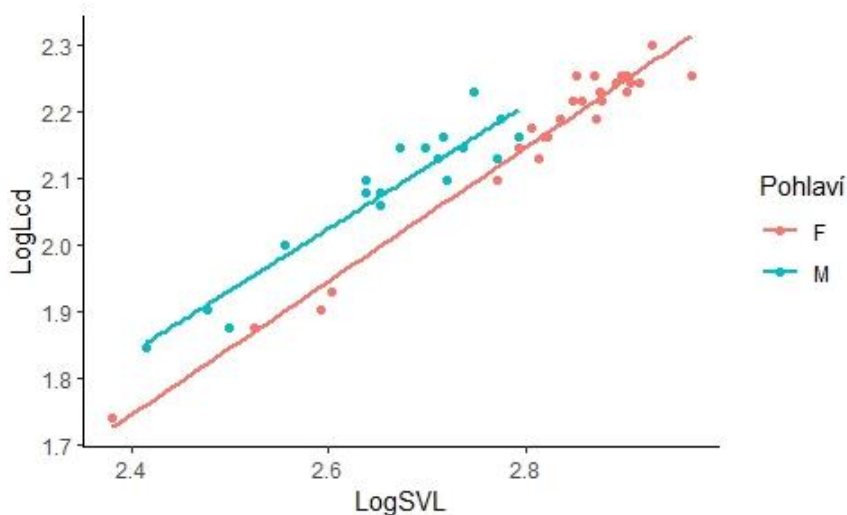
Hmotnost samic bez pozřené kořisti se pohybovala v rozmezí 112–290 g ($n = 17$), gravidní samice dosahovaly váhy až 410 g. Nejtěžší samice vážila 460 g, v důsledku pozření velké kořisti a do statistického vyhodnocení nebyla zahrnuta. Hmotnosti samců se pohybovaly v rozmezí 35–135 g ($n = 15$). Mezi pohlavími je statisticky významný rozdíl ($p < 0,001$; $n = 32$; Tab. 3).

Tab. 3: Deskriptivní tabulka mediánu, průměru, směrodatné odchylky (SD), maxima a minima pro rozměry SVL, Lcd, Ltot a hmotnosti dle pohlaví. F = samice, M = samci.

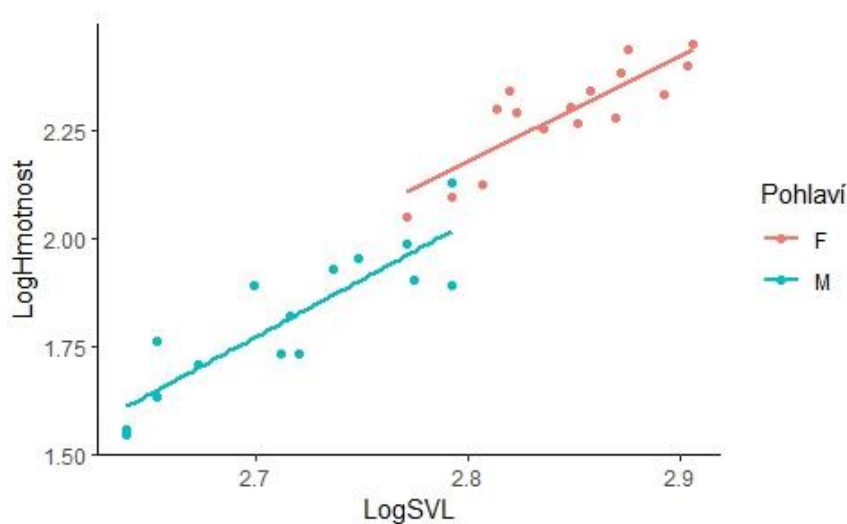
	SVL [mm]		Lcd [mm]		Ltot [mm]		Hmotnost [g]	
	F	M	F	M	F	M	F	M
Medián	742.50	520	167.50	140	910	650	202	66
Průměr	737.05	522	164.09	137	901.14	659	206.59	69.33
SD	80.81	63.19	17.88	14.12	96.41	73.56	50.45	25.75
Max.	930	620	200	170	1110	765	290	135
Min.	590	435	125	115	715	555	112	35
n	22	15	22	15	22	15	17	15

Naměřené hodnoty Ltot odchycených samic se pohybovaly v rozmezí 710–930 mm, SVL v 590–930 mm a Lcd v 125–200 mm ($n = 22$). Největší samice dosahovala rekordních 1110 mm (Příloha 10), druhá největší 1050 mm a třetí 1000 mm. Ostatní samice hranici 1000 mm již nepřesáhly. Ltot samců se pohybovaly v rozmezí 555–765 mm, rozmezí hodnot SVL činilo 435–620 mm a Lcd 115–170 mm ($n = 15$). Ve všech měřených charakteristikách je mezi pohlavími signifikantní rozdíl ($p_{SVL} < 0,001$; $n_{SVL} = 37$, $p_{Lcd} < 0,001$; $N_{Lcd} = 37$, $p_{Ltot} < 0,001$; $n_{Ltot} = 37$, Tab. 3). Souhrn všech zjištěných dat je v Příloze 9.

Na základě výše zmíněných hodnot, jsem vyhodnotil závislost hmotnosti na délce těla a délky ocasu na délce těla. V případě závislosti Lcd na SVL se rozdíl mezi pohlavími projevil signifikantně. Samci mají oproti samicím tendenci k relativně většímu ocasu k délce těla ($F_{Pohlaví} = 44,15$; $p_{Pohlaví} < 0,005$; $F_{SVL} = 729,36$; $p_{SVL} < 0,005$; $df = 1$; $n = 41$; Obr. 16). Závislost hmotnosti na SVL popisuje signifikantně vyšší hmotnost samic relativně k délce jejich těla ($F_{Pohlaví} = 9,424$; $p_{Pohlaví} < 0,005$; $F_{SVL} = 411,076$; $p_{SVL} < 0,001$; $df = 1$; $n = 41$; Obr. 17). Regresní přímka je v obou případech homogenní.



Obr. 16: Závislosti délky ocasu (Lcd) na délce těla (SVL). F = samice, M = samci.



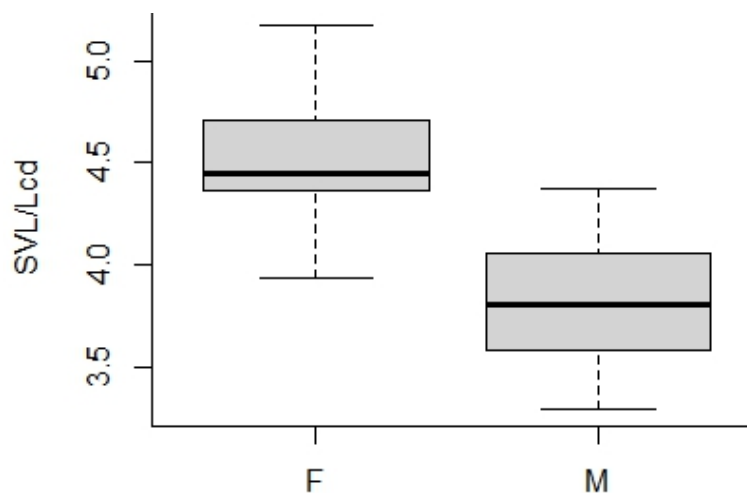
Obr. 17: Závislosti hmotnosti na délce těla (SVL). F = samice, M = samci.

Tab. 4: Deskriptivní tabulka hodnot pro indexy SVL/Lcd a Ltot/Lcd dle pohlaví. F = samice, M = samci, SD = směrodatná odchylka.

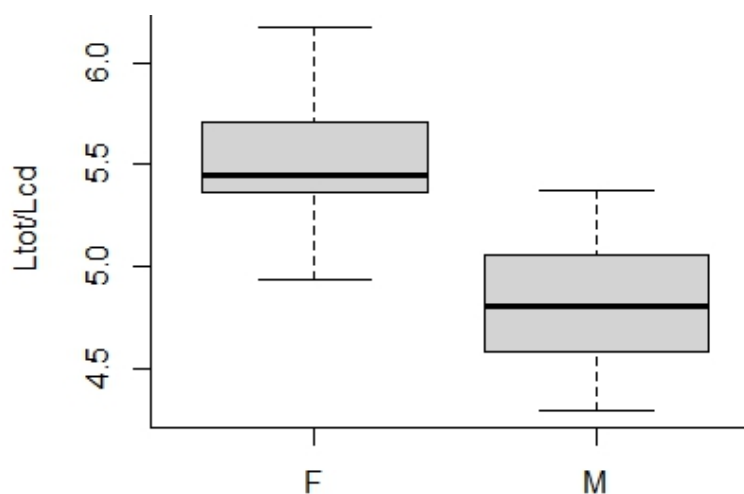
	SVL/Lcd		Ltot/Lcd	
	F	M	F	M
Medián	4.45	3.81	5.45	4.81
Průměr	4.50	3.82	5.50	4.82
SD	0.26	0.33	0.26	0.33
Maximum	5.17	4.37	6.17	5.37
Minimum	3.94	3.29	4.94	4.29
n	22	15	22	15

Z hodnot SVL, Lcd a Ltot byly vypočteny indexy SVL/Lcd a Ltot/Lcd, které značí relativní délku těla vůči ocasu a relativní celkovou délku vůči ocasu ($p < 0.001$,

$n = 37$). Rozdíl hodnot obou indexů se u samců i samic signifikantně liší. Samice mají tělo i celkovou délku těla vůči délce ocasu relativně výrazně delší než samci (Tab. 4, Obr. 18 a 19).



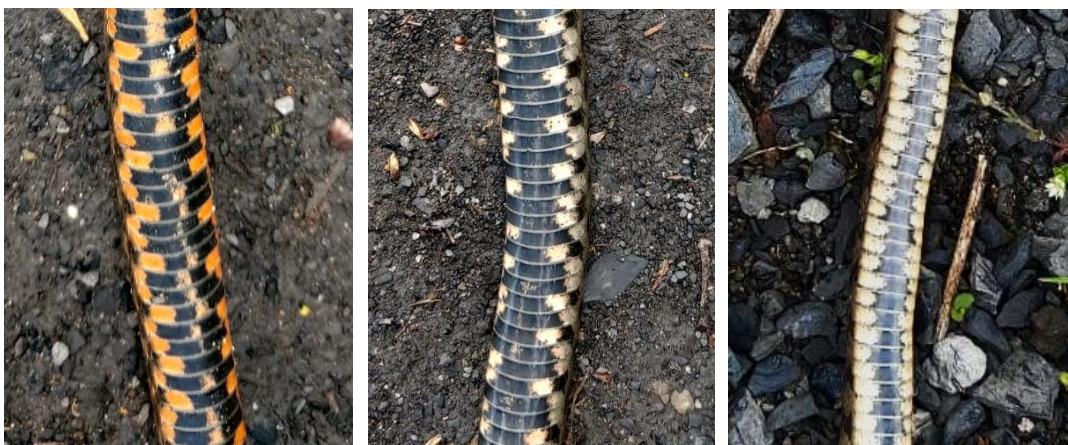
Obr. 18: Krabicové grafy demonstrující rozdíl mezi pohlavími v indexu L_{tot}/L_{cd} .



Obr. 19: Krabicové grafy demonstrující rozdíl mezi pohlavími v indexech SVL/L_{cd} .

Dorzální zbarvení jedinců v lokalitě nevykazovalo žádné anomálie, u některých jedinců bylo pouze výrazně kontrastní. Varianta *concolor*, melanističtí ani albinističtí jedinci nebyli pozorováni. Ventrální zbarvení vykazovalo velkou variabilitu. Skvrnění bylo nejvíce přítomné v oblasti hlavy a krku, u některých jedinců zasahovalo až za kloaku. Barva skvrn byla převážně bílá, ale u některých jedinců přecházela přes krémové odstíny až do sytě oranžové (Obr. 20). Vzory skvrn se vyskytovaly v různých variantách a byly pro každého jedince jedinečné, u dvou

jedinců se vyskytovaly v méně typickém pravidelném pásování. Ukázka fotodokumentace jedinců viz Příloha 11-36.



Obr. 20: Typy zbarvení jedinců v populaci: kontrastní oranžové skvrnění (vlevo), bílé skvrnění (uprostřed) a netypicky páskové zbarvení (vpravo).

4.3. Zdravotní komplikace a traumatické změny

Během terénního výzkumu jsem našel několik jedinců s individuálními zdravotními komplikacemi různého rozsahu (Tab. 5). Zaznamenal jsem i případy závažných zranění. Dohromady bylo odchyceno pět hadů s viditelnými zdravotními komplikacemi, z nichž se jednalo o čtyři dospělé samice *N. tessellata* a jednoho mladého samce *N. natrix*. Nejzávažněji postižení jedinci byli podrobeni léčebné proceduře na Veterinární a farmaceutické univerzitě v Brně.

Tab. 5: Záznamy významnějších zdravotních komplikací hadů.

Datum	Druh	Číslo jedince	Pohlaví [F/M]	Typ poškození
11.08.2022	<i>N. tessellata</i>	7	F	bodné rány, léze
11.08.2022	<i>N. tessellata</i>	8	F	absces, cizorodý předmět v dutině tlamní
11.08.2022	<i>N. tessellata</i>	9	F	laterální řezná rána v hrudníku
20.05.2022	<i>N. natrix</i>	26	M	chronický zánět v dutině tlamní
01.06.2023	<i>N. tessellata</i>	42	F	poškození ocasu

Jedinec *N. tessellata* č. 7 měl po těle rozestý vyšší počet kožních lézí a oděrek v oblasti ventrálních šupin. V první polovině těla měl v levém boku na rozhraní ventrálního a dorzálního ošupení dvě hlubší bodné rány (Obr. 21). Jevilo se zde vážné podezření na možnou nákazu SFD, které bylo vyvráceno.



Obr. 21: Hlubší poranění (vlevo) a drobné kožní léze (vpravo) u jedince č. 7.

N. tessellata č. 8 vykazovala změny na bukální sliznici. V dutině nosní měl tento jedinec zaklesnutý cizorodý předmět – obilku trávy. Ta způsobila kontaktem se sliznicí několik drobných abscesů v oblasti prodlouženého hrtanu. Cizorodý předmět byl opatrně vyjmut (Obr. 22).



Obr. 22: Jedinec č. 8 s abscesy v dutině tlamní a cizorodým tělesem v nosní dutině.

Nejzávažnější poranění vykazoval jedinec č. 9. Jednalo se o *N. tessellata* s poměrně čerstvou sečnou ranou dlouhou cca 4 cm ve ventrální oblasti srdce. Poměrně hluboká rána procházela přes šupiny, pokožku, škáru i podkožní vazivo a protínala také svalovou tkáň až do hrudní dutiny. Během poranění došlo přetnutím krevních cév ve škáře k zakrvácení rány a při náhledu do ní bylo zřetelně vidět pulzující srdce (Obr. 23). Jedinec vyžadoval odborné ošetření na VETUNI.



Obr. 23: Jedinec č. 9 s hlubokou sečnou ránou v oblasti srdce.

Ve velice závažném stavu byla nalezena jediná *N. natrix* (jedinec č. 26), která trpěla masivním bakteriálním zánětem bukální sliznice a byla výrazně podvyživená. Tento chronický gangrenózní zánět lokalizovaný na vrchní čelisti vedl k významným změnám tkání a úplné deformaci a blokaci nosní dutiny. Rozsáhlý zánět progredoval až do epidermis, což vedlo k znetvoření hlavových štítků a výraznému otoku celé hlavy (Obr. 24). Takto masivní zánět byl neléčitelný.



Obr. 24: Jedinec č. 26 (*N. natrix*) s chronickým gangrenózním zánětem.



Obr. 25: Poškozený ocas jedince č. 42 (vlevo) a jedinec s poškozeným levým okem (vpravo).

Mezi dalšími změnami jsem pozoroval již zhojená zranění. U jedince č. 42 jsem se jednalo o poškození ocasu bez zjevného vlivu na zdravotní stav jedince (Obr. 25).

Dalším případem byl i jedinec, který byl slepý na levé oko. Oční šupina a několik okolních štítků bylo deformovaných a srostlých dohromady (Obr. 25). Přestože byl oslepený jedinec méně ostražitý, nepodařilo se jej odchytout.

5. Diskuse

5.1. Výskyt SFD u vybrané populace *N. tessellata*

U havířovské populace *N. tessellata* nebyla nákaza potvrzena, nicméně z výpočtu prevalence SFD v 95% kontingenčním intervalu je zřejmá až 0–8,3% pravděpodobnost výskytu nákazy, což stále není zanedbatelné. Ke snížení prevalence by bylo potřeba odebrat více vzorků, mé vzorky jsou však již nyní z pohledu negativně testované lokality nejvyšší v ČR (n = 46). Druhý největší vzorek o 32 jedincích zkompletoval Hanzlík (2022) z pohořelické populace *N. natrix*, ze získaných vzorků byla vypočítána prevalence v rozmezí 0–10,5 %. Příbyl et al. (2023) zjistili u negativně testovaných *N. tessellata* prevalenci v Úholičkách v rozmezí 0–24,3 % (n = 12), v NP Podyjí v lokalitě Šobes v rozmezí 0–20,8 % (n = 12). Vypočítali také prevalenci pro pozitivně testované populace *N. tessellata* v Brně, kde dosahovala 16,0–26,0 % (n = 257). Prevalenci pro blízkou slovenskou populaci u Devína stanovili v rozmezí 21,2–51,3 % (n = 40). Blanvillain et al. (2022) přítomnost SFD potvrdili také v Poohří u 5 jedinců (n = 100), ani v jednom případě se však nejednalo o *N. tessellata*, přestože ostatní druhy kromě malého vzorku *V. berus* pozitivní jedince vykazovali. V rámci Evropy se Franklinos et al. (2017) a Blanvillain et al. (2022) shodují, že nejvyšších prevalencí dosahují právě akvatické druhy užovek rodu *Natrix*. Blanvillain et al. (2022) také popisuje riziková ohniska nákazy poblíž našich hranic v německém Bavorsku a rakouském Burgenlandu, kde se pozitivní lokality nachází téměř na protějším břehu pozitivně testované lokality v Devíne. Že je populace *N. tessellata* v Havířově pravděpodobně nákazy SFD prostá, podporují také výsledky Blanvillain et al. (2022), kteří u stejného druhu z blízké polské populace nemoc neprokázali.

U jedinců jsem nepozoroval žádné klinické příznaky, pouze pár příkladů mělo podezřelé změny na šupinách, které mohly být potencionálně způsobené SFD. Samotný výskyt lézí však neznamená jistý výskyt nákazy. Blanvillain et al. (2022) pro vzorky z Evropy včetně Poohří popisují i jedince postižené lézemi, kteří byli následovně na SFD testování negativně.

Oproti evropským populacím dosahují až 50% prevalence SFD populace hadů z USA, což mělo za následek až 50% propad izolovaných populací některých druhů

chřestýšů (Chandler et al., 2019; Clark et al., 2011). Nyní se SFD pravděpodobně vyskytuje již globálně (Burbrink et al., 2017). Dle Allain & Duffus (2019) ovšem doposud není znám přesný původ, rozšíření a vliv této nemoci na původní druhy evropské herpetofauny. Ladner et al. (2022) naznačují, že původ evropských kmenů SFD je pravděpodobně starší než u amerických kmenů. To nasvědčuje, že se tento patogen rozšířil díky jedincům držným v zajetí, kteří navíc sdílí globálně stejné kmeny poprvé popsané z volné přírody USA (Ladner et al., 2022). Evropské linii jsou poměrně podobné také izolované kmeny z jihovýchodní Asie, což může dle Blanvillain et al. (2022) naznačovat šíření patogenu i z této oblasti. Ve volné přírodě ČR vykazuje nákaza fragmentovaný výskyt bez kontinuálního rozšíření s výskytem lokálních ohnisek. Z pozitivně testovaných populací je třeba zabránit přemísťování jedinců do jiných lokalit, dále je potřeba omezit manipulaci s těmito jedinci a dbát na řádnou ochranu během manipulace včetně desinfekce terénního náčiní.

5.2. Morfologické parametry

Na lokalitě doposud nebyla zhotovena rozsáhlejší studie, v minulosti se tamější populací *N. tessellata* zabývali především Vlček et al. (2010, 2011). Vzhledem k mým výsledkům je nejrelevantnější srovnávat tuto populaci s předchozími pracemi a studii podobného zaměření z ČR a případně Evropy.

Hmotnosti jedinců českých populací *N. tessellata* nebyla dosud věnována velká pozornost. První ucelenější data o hmotnosti pochází od Švába (2003), který studoval sázavskou populaci. Zjištěné výsledky jsou ovšem zkresleny zahrnutím subadultních jedinců. Pro samice uvádí rozpětí 17–300 g ($n = 180$) a pro samce 16–201 g ($n = 126$). Přesnější údaje pro adultní jedince existují pro populaci z pražské Tróje, kde Velenský (2007) uvádí pro samce rozmezí 31–123 g ($n = 58$) a pro samice včetně gravidních jedinců 46,7–409 g ($n = 100$). Aktuálně popisuje Pešanová (2022) hmotnost jedinců chrudimské populace. Pro samice naměřila rozmezí 50–280 g ($n = 39$) a pro samce 30–120 g ($n = 78$), do dat nezahrnula subadulty ani gravidní samice. Ačkoli jsem provedl menší počet měření, má data se výrazně shodují s výsledky Pešanové (2022). Pokud bych do svých dat zahrnul i jedince s větší potravou a gravidní samice, shodovali by se s Velenským (2007), jelikož jsem podobně jako on zaznamenal nejtěžší samici o hmotnosti 410 g. Naopak se Švábem (2003) se výsledky naměřené hmotnosti neshodují nejen kvůli zařazení subadultů,

nýbrž i kvůli vysoké maximální hmotnosti samců i gravidních samic. To nasvědčuje, že do vzorku zahrnul i jedince s větší požírenou potravou. Mé výsledky shodně s ostatními autory potvrzují mezipohlavní rozdíl v absolutní hmotnosti.

Celková délka (L_{tot}) adultních samců havířovské populace se pohybovala v rozmezí 555–765 mm ($n = 15$), z nichž pět jedinců přesáhlo obvyklou délku 700 mm. L_{tot} adultních samic jsem naměřil v rozmezí 715–1110 mm ($n = 22$), ze kterých tři přesahovaly délku 1000 mm včetně. Druhá nejdelší samice měřila 1050 mm a třetí rovných 1000 mm. Samice se 1110 mm je největším změřeným exemplářem tohoto druhu pro ČR. Jedinci z havířovské populace ve srovnání s ostatními českými populacemi dosahují někdy až řádově větších hodnot L_{tot} . Rehák (1989) u brněnské populace v podobně početném vzorku naměřil rozpětí hodnot L_{tot} pro samce 587–711 mm ($n = 17$) a pro samice 679–915 mm ($n = 33$). Šváb (2003) zaznamenal u sázavské populace L_{tot} samců v rozmezí 280–870 mm ($n = 113$) a L_{tot} samic 413–956 mm ($n = 89$), jeho vzorky však zahrnovaly nedospělé jedince a maximální velikost uvedeného samce může být spekulativní. Pro trojskou populaci v Praze Velenský (2007) udává L_{tot} samců v rozpětí 495–798 mm ($n = 62$) a samic 597–1040 mm ($n = 99$). Moravec (2015) se věnoval populaci v Poohří, zde zjistil u samců rozpětí L_{tot} 437–615 mm ($n = 13$) a pro samice 483–746 mm ($n = 15$). Poslední rozsáhlejší studii morfologie *N. tessellata* se zabývala Pešanová (2022) na Chrudimce, zde zjistila rozmezí L_{tot} pro samce 520–825 mm ($n = 78$) a pro samice 560–1050 mm ($n = 42$). Je zřejmé, že do některých uvedených vzorků byli pravděpodobně zařazeni také mladší nedospělí jedinci. Má měření shodně s ostatními autory potvrzují rozdíl v absolutní délce mezi pohlavími, kdy samice dosahují vyšších hodnot nežřídka přesahujících 1000 mm.

Vysoké hodnoty L_{tot} vykazuje především trojská, chrudimská a havířovská populace (Pešanová, 2022; Velenský, 2007; Vlček et al., 2010). Jasným důkazem je nález rekordního jedince pro území ČR (1110 mm). Doposud nejdelšího jedince o rozměrech L_{tot} 1050 mm zaznamenala Pešanová (2022) v chrudimské populaci. Moravcem (2015, 2019) byla uváděna jako nejdelší zaznamenaný jedinec *N. tessellata* v ČR Vlčkem (1998) odchycená samice s L_{tot} 1020 mm právě z havířovské populace. Tak vysoké hodnoty populace v Havířově lze vysvětlit přítomností vhodného prostředí s dostatkem potravy, nízkou úmrtností jedinců a s tím

spojenou možností dožití vyššího věku. Lokalita je téměř mediteránního charakteru, najdeme zde výrazně výhřevný podklad tvořený metrovými vrstvami tmavé hlusiny, ve které jedinci mohou bezprostředně v blízkosti vody zimovat nebo vyhledávat líhniště a úkryty. Také charakter vodního prostředí se liší od většiny ostatních lokalit českých populací. Jedná se o mělké a dobře prohřáté nádrže s neregulovanou výškou vodního sloupce, což nasvědčuje, že zde *N. tessellata* může být výrazně úspěšnější v lovu. Jeden jedinec během měření vyvrhl i poměrně velkou nástražní rybkou, což je dokladem, že místní populace může profitovat i ze značného pohybu rybářů. Dle Jablonski et al. (2014) je z výsledků analýzy mitochondriální DNA zřejmé, že se pravděpodobně nejedná o autochtonní populaci. Z toho důvodu by mohl představovat vliv na výrazně větší tělesné rozměry také efekt zakladatele, nebo původ zdrojové populace. Jedince přesahující celkovou délku 1100 mm popisují Oliva et al. (1968) např. u poměrně blízkých východoslovenských populací. Carlsson et al. (2011) u rumunského jezera Sinoe zaznamenali největší samici s hodnotou L_{tot} 1220 mm.

V případě srovnání maximálních hodnot hmotnosti, L_{tot} a L_{cd} je zřejmý pohlavní dimorfismus. Relativní vztah hmotnosti a relativní délky ocasu vůči délce těla vyšel signifikantně ve prospěch samic, které dosahují vyšší hmotnosti a zároveň mají relativně kratší ocas. Totéž potvrzuje u *N. tessellata* i (Mebert, 2011a), který poukazuje, že vyšší hmotnost a relativní velikost představuje vyšší investice samic do rozmnožování a velikosti snůšky.

S ostatními studiemi se podobně shodují hodnoty SVL (L) a L_{cd} , ze kterých jsem vypočítal indexy SVL/ L_{cd} a L_{tot}/L_{cd} . Tyto indexy lze využít jako vhodnou statistickou metodu ke srovnání rozdílů v poměru rozměru těla a ocasu. U samic z havířovské populace jsem zjistil hodnoty SVL/ L_{cd} 3,9–5,1 a u samců 3,3–4,4. Baruš & Oliva (1992) udávají pro samce rozmezí indexu 2,9–4,2 ($n = 32$) a pro samice 3,4–5,5 ($n = 62$). Tyto zjištěné rozdíly jsou obdobné a téměř zcela totožné jako u jiných českých populací s podobnými výsledky mezi pohlavími. Vyšších hodnot dosahují samice, které mají oproti samcům kratší ocas v poměru k tělu. Podobné hodnoty 2,1–5,0 ($n = 110$) pro samce a 3,2–5,5 ($n = 85$) pro samice vypočítal Šváb (2003). Velenský (2007) zahrnul do vzorku i jedince s chybějícími částmi ocasu, takže se jeho výsledky výrazněji liší od ostatních. Pešanová (2022) zjistila pro samce hodnoty 3,0–4,6 ($n = 78$) a pro samice 3,6–4,7 ($n = 42$). Hodnoty

indexu Ltot/Lcd jsem stanovil pro samce v rozmezí 4,3–5,4 (n = 15), pro samice 4,9–6,2 (n = 22) a opět se shodují s ostatními studiemi. Např. Šváb (2003) uvádí pro samce hodnoty 3,1–6,0 (n = 110) a pro samice 4,2–6,5 (n = 62), nebo Pešanová (2022) 4,0–5,6 (n = 78) u samců a 4,6 – 5,8 (n = 42) v případě samic.

V této práci jsem se také zaměřil na variabilitu zbarvení ventrálních štítků, popsal jsem bílé, žluté a jasně oranžové zbarvení i skvrnění uspořádané do linií, které odpovídá údajům uvedeným pro populace z ČR (Baruš & Oliva, 1992; Moravec, 2015). Podobně jako Vlček et al. (2011) jsem zde našel převahu kontrastně zbarvených jedinců. Variabilitě zbarvení včetně ventrálních skvrn se u evropských populací *N. tessellata* více věnovala Gežová (2019) a Pešanová (2022). Gežová (2019) uvádí vysokou variabilitu zbarvení ventrálních skvrn mezi populacemi ze Slovenska, u kterých zjistila všechny jeho typy. Popisuje také brněnskou a havířovskou populaci, kde v případě jedinců z Brna zaznamenala výskyt všech třech typů zbarvení a v Havířově pouze žlutou variantu, což mé výsledky rozporují. Pešanová (2022) uvádí u izolované populace na Chrudimce také všechny tři typy variant. Autorky neuvádí uspořádání skvrnění do linií, které jsem v havířovské populaci zaznamenal. Podobní jedinci byli zdokumentováni např. v NP Podyjí (Moravec, 2019). Zbarvení ventrálních štítků je pro každého jedince individuální, a proto může sloužit jako identifikační znak stejně dobře jako značení šupin. K témuž závěru pro rod *Natrix* došli i Baker & Allain (2020).

5.3. Zdravotní komplikace a traumatické změny

Jak naznačují předchozí výsledky, populace *N. tessellata* v Havířově je v dobrém zdravotním stavu. Ve většině nálezů jedinců s traumatickými změnami se jednalo o poměrně čerstvá zranění, která se nestačila promítnout do jejich zdravotní kondice. Lze předpokládat, že sečná rána u jedince č. 9 by se obtížně hojila a pronikly by do ní druhotné infekce, což by pravděpodobně způsobilo jeho úhyn. Největší hrozbou jsou pro hady obecně záněty bukální sliznice. Ty významně narušují funkci Jacobsonova orgánu, omezí tak pohybové schopnosti jedince, loveckou zdatnost i možnosti přijímání potravy (Lorch et al., 2015). Rozsáhlejší záněty bukální sliznice jsou běžně popisovány u jedinců držených v zajetí jako dopad špatné výživy a nevhodných hygienických či uměle navozených podmínek (Bhadesiya et al., 2020). U volně žijících zvířat jsou pozorovány vzácně a nejběžněji jako projev infekčních

onemocnění, jakým je SFD nebo Nodovirus (Cheatwood et al., 2003; Harding et al., 2022; Hoon-Hanks et al., 2019). Další informace o podobných případech v literatuře chybí. Nález gangrenózního zánětu u jedince č. 26 lze považovat za zcela ojedinělý a jedinec č. 8 byl zajištěn ještě na počátku geneze zánětlivých změn.

V případě poškození ocasu u jedince č. 42 se jedná o poměrně známý jev. Populace některých druhů se ztrátou či poškozením ocasu především ve vztahu k predaci popisuje řada studií (Akani et al., 2002; Gregory & Isaac, 2005). Dle Gregory & Isaac (2005), kteří studovali britskou populaci příbuzné *N. natrix* se ztráta různě dlouhé části ocasu objevila až u 24 z celkových 159 jedinců. Díky metodě CMR Gregory & Isaac (2005) též pozorovali, že poškození ocasu je fatální pouze pro juvenilní jedince a adultní jedinci s různým zraněním ocasu běžně přežívají. Popsali také trend zvyšování přítomnosti poranění se stářím, velikostí a pohlavím, kdy k poraněním docházelo především u samců. Trend zvyšující se četnosti poranění zaznamenali také Akani et al. (2002) u *Psammophis philipsii*, kde docházelo k vyšší frekvenci zranění u gravidních samic nežli ostatních negravidních jedinců. Totéž popisuje Fitch (2003) u užovky proužkované (*Thamnophis sirtalis*), naopak Capula et al. (2000) u populace štíhlovky žlutozelené (*Coluber viridiflavus*) žádný trend nezjistila. Časté traumatické změny na ocasu pozorovala také Pešanová (2022) u populace *N. tessellata* na Chrudimce. Jelikož v mém pozorování byla nalezena pouze jedna samice *N. tessellata* (č. 42) s poškozením ocasu, nelze vyvozovat podobné závěry. U volně žijících hadů zejména z čeledi Colubridae včetně *N. tessellata* Crnobrnja-isailovic et al. (2016) v minulosti popsali také záměrnou urotonii tzv. pseudoautotomii bez schopnosti regenerace, v diskusi však naznačuje, že k ní mohlo dojít důsledkem nešetrné manipulace.

Vnější zranění zejména u jedinců č. 7 a 42 pravděpodobně způsobil některý z brodivých ptáků, kteří se v lokalitě běžně vyskytují (Moravec, 2015). Během výzkumu jsem nebyl svědkem žádného napadení predátorem. Vyvrátit lze možnost mezidruhových soubojů, jelikož je *N. tessellata* v zásadě nekonfliktním druhem (Moravec, 2015). Původ traumatických změn je vždy diskutabilní a některé drobné jizvy a oděrky mohou být způsobené i pohybem hadů po tvrdém podkladu a vegetaci (Gregory & Isaac, 2005). V lokalitě se nalézají početné černé skládky a všudypřítomné rozbité sklo, které mohlo lehce způsobit hlubokou ránu jedinci č. 9.

Ačkoliv lidé místní populaci *N. tessellata* tolerují, některá traumatická poranění nepřímo způsobují znečištěním prostředí (Mikátová et al., 2001). Přestože jsem u této populace přítomnost SFD neprokázal, mohla některé náznaky kožní léze způsobit infekce jinými méně patogenními plísněmi rodu *Nannizziopsis* a *Paranannizziopsis* (Sigler et al., 2013). Záněty bukální sliznice jedince *N. natrix* (č. 26) mohla způsobit řada faktorů a bude pravděpodobně souviset s poraněním při přijímání potravy. Traumatické změny až s fatálními důsledky způsobují především okounovité ryby s ostrými paprskovitými ploutvemi a také některé nepůvodní druhy ryb (Moravec, 2015; Šukalo et al., 2012). Mohlo se však také jednat o dopad zanesení cizorodého tělesa. Pokud by u jedince č. 8 nedošlo k jeho odstranění, mohlo by dojít k podobně rozsáhlému zánětu.

6. Závěr

Přestože nebyla přítomnost ophidiomykózy u havířovské populace *N. tessellata* zjištěna, z vypočítané prevalence stále existuje nepatrná pravděpodobnost jejího výskytu. Jedinci nevykazovali žádné klinické příznaky a byli v dobré zdravotní kondici, což by mohlo nasvědčovat, že je tato populace nákazy opravdu prostá. Přesto je třeba tuto izolovanou populaci nadále sledovat, aby se případný výskyt onemocnění mohl včas zachytit. Zároveň je potřeba zamezit její kontaminaci. Tato jedinečná populace se sporným původem obývá diametrálně odlišné prostředí, než je pro ostatní české populace typické. Že je tato populace ojedinělá, dokazuje i nález samice s celkovou délkou těla 1110 mm, která představuje nejdelšího zaznamenaného jedince pro Českou republiku a nahrazuje tak dosavadní rekordní měření z Chrudimky. Lokalita nabízí populaci *N. tessellata* zcela optimální životní podmínky a vzhledem k pozorování vysokého množství jedinců by si zasloužila i rozsáhlejší demografickou studii. K těmto účelům může být využita i fotografická databáze jedinců, kterou jsem v rámci této diplomové práce vytvořil. Z dalších výsledků práce vyplývá, že se jednotlivé morfologické charakteristiky u pohlaví prokazatelně liší a jsou statisticky průkazné, potvrzují tak významný pohlavní dimorfismus v závislosti s hmotností, celkovou délkou těla, ocasu a délkou těla bez ocasu. Dále jsem v této práci popsal variabilitu ve zbarvení ventrálních šupin a věnoval se i traumatickým změnám u sledovaných jedinců. Některé případy těchto změn přitom nejsou pro volně žijící hady typické a dají se považovat za zcela ojedinělé a málo studované. Práce také sumarizuje, popisuje a porovnává aktuální rozšíření ophidiomykózy v kontextu České republiky i sousedních států. Výsledky práce budou poskytnuty AOPK ČR a budou zahrnuty do vědeckého článku v časopisu *Journal of Vertebrate Biology*.

7. Literatura

- Akani, G. C., Luiselli, L., Wariboko, S. M., Ude, L., & Angelici, F. M. (2002). Frequency of tail autotomy in the African olive grass snake, *Psammophis philipsii* from three habitats in southern Nigeria. *African Journal of Herpetology*, 51: 143–146.
- Allain, S., & Duffus, A. L. J. (2019). Emerging infectious disease threats to European herpetofauna. *Herpetological Journal*, 29(4): 189–206.
- Allender, M. C., Baker, S., Britton, M., & Kent, A. D. (2018). Snake fungal disease alters skin bacterial and fungal diversity in an endangered rattlesnake. *Scientific Reports*, 8(1): 1–10.
- Allender, M. C., Baker, S., Wylie, D., Loper, D., Dreslik, M. J., Phillips, C. A., Maddox, C., & Driskell, E. A. (2015). Development of snake fungal disease after experimental challenge with *Ophidiomyces ophiodiicola* in cottonmouths (*Agkistrodon piscivorus*). *PLoS ONE*, 10(10).
- Allender, M. C., Dreslik, M., Wylie, S., Phillips, C., Wylie, D. B., Maddox, C., Delaney, M. A., & Kinsel, M. J. (2011). *Chrysosporium* sp. infection in eastern massasauga rattlesnakes. *Emerging Infectious Diseases*, 17(12): 2383–2384.
- Allender, M. C., Raudabaugh, D. B., Gleason, F. H., & Miller, A. N. (2015). The natural history, ecology, and epidemiology of *Ophidiomyces ophiodiicola* and its potential impact on free-ranging snake populations. *Fungal Ecology*, 17: 187–196.
- Amr, Z. S., Mebert, K., Hamidan, M., Baker, M. A., & Disi, A. (2011). Ecology and conservation of the dice snake (*Natrix tessellata*) in Jordan. *Mertensiella*, 18: 393–400.
- Asztalos, M., Ayaz, D., Bayrakci, Y., Afsar, M., Tok, C. V., Kindler, C., Jablonski, D., & Fritz, U. (2021). It takes two to tango - Phylogeography, taxonomy and hybridization in grass snakes and dice snakes (Serpentes: Natricidae: *Natrix natrix*, *N. tessellata*). *Vertebrate Zoology*, 71(3): 813–834.
- Baker, J., & Allain, S. (2020). Photographic identification of individual Barred Grass Snakes *Natrix helvetica*. *Transactions of the Norfolk & Norwich Naturalists Society*, 53(1): 67–70.
- Baruš, V., & Oliva, O. (1992). Fauna ČSFR. Plazi = Reptilia. *Academia, Praha*, Ed. 1, 224 pp.
- Bhadesiya, C., Chaudhary, G., Patel, T., Sorathiya, L., Patel, V., Anikar, M., & Gajjar, P. (2020). Prevalence of diseases and disorders of reptiles at Veterinary Hospital of Kamdhenu University, Gujarat, India. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 8(3): 1477–1483.
- Blanvillain, G., Lorch, J. M., Joudrier, N., Bury, S., Cuenot, T., Franzen, M., Freiría, F. M., Guiller, G., Halpern, B., Kolanek, A., Kurek, K., Lourdais, O., Michon, A., Musilová, R., Schweiger, S., Szulc, B., Ursenbacher, S., Zinenko, O.,

- & Hoyt, J. R. (2023). Contribution of host species and pathogen clade to snake fungal disease hotspots in Europe. (*Preprint*).
- Blooi, M., Pasmans, F., Longcore, J. E., Spitzen-Van Der Sluijs, A., Vercammen, F., & Martel, A. (2013). Duplex real-Time PCR for rapid simultaneous detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* and *Batrachochytrium salamandrivorans* in amphibian samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(12): 4173–4177.
- Bohuski, E., Lorch, J. M., Griffin, K. M., & Blehert, D. S. (2015). TaqMan real-time polymerase chain reaction for detection of *Ophidiomyces ophidiicola*, the fungus associated with snake fungal disease. *BMC Veterinary Research*, 11(1): 1–10.
- Bolte, L., Goudarzi, F., Klenke, R., Steinfartz, S., Grimm-Seyfarth, A., & Henle, K. (2023). Habitat connectivity supports the local abundance of fire salamanders (*Salamandra salamandra*) but also the spread of *Batrachochytrium salamandrivorans*. *Landscape Ecology*, 38(6): 1537–1554.
- Brischoux, F., & Kornilev, Y. V. (2014). Hypernatremia in dice snakes (*Natrix tessellata*) from a coastal population: Implications for osmoregulation in marine snake prototypes. *PLoS ONE*, 9(3): 1–5.
- Burbrink, F. T., Lorch, J. M., & Lips, K. R. (2017). Host susceptibility to snake fungal disease is highly dispersed across phylogenetic and functional trait space. *Sci. Adv.*, 3.
- Campbell, L. J., Burger, J., Zappalorti, R. T., Bunnell, J. F., Winzeler, M. E., Taylor, D. R., & Lorch, J. M. (2021). Soil reservoir dynamics of *Ophidiomyces ophidiicola*, the causative agent of snake fungal disease. *Journal of Fungi*, 7(6): 461.
- Capula, M., Filippi, E., Luiselli, L., Aguilar, J. R., & Rugiero, L. (2000). Body size and some demographic characteristics in two populations of *Coluber viridiflavus* in the countryside of Rome. Congresso Nazionale della Societas Herpetologica Italica. *Museo Regionale Di Scienze Naturali, Torino.*, 435–438.
- Carlsson, M., Kärvmemo, S., Tudor, M., Sloboda, M., Mihalca, A. D., Ghira, I. V., Bel, L., & Modrý, D. (2011). Monitoring a Large Population of Dice Snakes at Lake Sinoe in Dobrogea, Romania. *Mertensiella*, 18: 237–244.
- Chandler, H. C., Allender, M. C., Stegenga, B. S., Haynes, E., Ospina, E., & Stevenson, D. J. (2019). *Ophidiomycosis prevalence* in Georgia's Eastern Indigo Snake (*Drymarchon couperi*) populations. *PLoS ONE*, 14(6): 1–13.
- Cheatwood, J. L., Jacobson, E. R., May, P. G., Farrell, T. M., Homer, B. L., Samuelson, D. A., & Kimbrough, J. W. (2003). An outbreak of fungal dermatitis and stomatitis in a free-ranging population of pigmy rattlesnakes (*Sistrurus miliarius barbouri*) in Florida. *Journal of Wildlife Diseases*, 39(2): 329–337.
- Chobot, K., & Němec, M. (2017). Červený seznam ohrožených druhů České republiky, Obratlovci. *Příroda, Praha*, 34: 182 pp.
- Chytrý, M., Kučera, T., Kočí, M., Grulich, V., & Lustyk, P. (2010). Katalog biotopů

České republiky. *Agentura Ochrany Přírody a Krajiny ČR*, Ed. 2: 447 pp.

- Clark, R. W., Marchand, M. N., Clifford, B. J., Stechert, R., & Stephens, S. (2011). Decline of an isolated timber rattlesnake (*Crotalus horridus*) population: Interactions between climate change, disease, and loss of genetic diversity. *Biological Conservation*, 144(2): 886–891.
- Conelli, A. E., Nembrini, M., & Mebert, K. (2011). Different Habitat Use of Dice Snakes (*Natrix tessellata*) among Three Populations in Canton Ticino, Switzerland – a Radiotelemetry Study. *Mertensiella*, 18: 100–116.
- Crnobrnja-isailovic, E., Čorović, J., & Bálint, H. (2016). Deliberate tail loss in *Dolichophis caspius* and *Natrix tessellata* (Serpentes: Colubridae) with a brief review of pseudoautotomy in contemporary snake families. *North-Western Journal of Zoology*, 12(2): 367–372.
- Di Nicola, M. R., Coppari, L., Notomista, T., & Marini, D. (2022). *Ophidiomyces ophidiicola* detection and infection: a global review on a potential threat to the world's snake populations. *European Journal of Wildlife Research*, 68(5): 64.
- Dodd, J. C. K. (2016). Reptile Ecology and Conservation: A Handbook of Techniques. *Oxford University Press*, Ed. 1: 512 pp.
- Dolinski, A. C., Allender, M. C., Hsiao, V., & Maddox, C. W. (2015). Systemic *Ophidiomyces ophidiicola* Infection in a Free-Ranging Plains Garter Snake (*Thamnophis radix*). *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*, 24(1):7.
- Fisher, D., Babická, K., Fischerová, J., Lerch, Z., Blanka, M., Reiter, A., & Reháč, I. (2019). Discovery of the *Podarcis tauricus* population in the Czech Republic (Squamata: Lacertidae) 83: 239–254.
- Fisher, M. C., Henk, D. A., Briggs, C. J., Brownstein, J. S., Madoff, L. C., McCraw, S. L., & Gurr, S. J. (2012). Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature*, 484: 186–194.
- Fitch, H. S. (2003). Tail loss in garter snakes. *Herpetological Review*, 34: 212–213.
- Franklinos, L. H. V., Lorch, J. M., Bohuski, E., Fernandez, J. R. R., Wright, O. N., Fitzpatrick, L., Petrovan, S., Durrant, C., Linton, C., Baláž, V., Cunningham, A. A., & Lawson, B. (2017). Emerging fungal pathogen *Ophidiomyces ophidiicola* in wild European snakes. *Scientific Reports*, 7(1): 7 pp.
- Gautschi, B., Widmer, G., Joshi, J., & Koella, J. C. (2002). Increased frequency of scale anomalies and loss of genetic variation in serially bottlenecked populations of the dice snake, *Natrix tessellata*. *Conservation Genetics*, 3: 235–245.
- Gežová, S. (2019). Evolučná história kryptickej línie druhového komplexu *Natrix tessellata* (Ophidia: Natricidae) na Balkánskom polostrove. Diplomová práca. *Katedra Zoológie Prírodovedecké Fakulty UK, Bratislava*, 105 pp.
- Gibbons, J. W., Scott, D. E., Ryan, T. J., Buhlmann, K. A., Tuberville, T. D., Metts, B. S., Greene, J. L., Mills, T., Leiden, Y., Poppy, S., & Winne, C. T. (2000). The

Global Decline of Reptiles, Deja Vu Amphibians. *BioScience*, 50: 653–666.

- Gregory, P. T., & Isaac, L. A. (2005). Close encounters of the worst kind: Patterns of injury in a population of grass snakes (*Natrix natrix*). *Herpetological Journal*, 15(4): 213–219.
- Grioni, A., To, K. W., Crow, P., Rose-Jeffreys, L., Ching, K. K., Chu, L. O., Hill, F. I., Chan, H. K., & Cheung, K. S. (2021). Detection of *Ophidiomyces ophidiicola* in a Wild Burmese Python (*Python bivittatus*) in Hong Kong SAR, China. *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*, 31(4).
- Gruschwitz, M., Lenz, S., Mebert, K., & Laňka, V. (1999). *Natrix tessellata* (Laurenti, 1768) - Würfelnatter. In W. Bohne (Ed.), *Handbuch der Reptilien und Amphibien Europas, Band 3/2a Schlangen II, Colubridae 2 Boiginae, Natricinae* (pp. 581–644). AULA - Verlag.
- Guicking, D., & Joger, U. (2011). Molecular phylogeography of the dice snake. *Mertensiella*, 18: 1–10.
- Guicking, D., Joger, U., & Wink, M. (2009). Cryptic diversity in a Eurasian water snake (*Natrix tessellata*, Serpentes: Colubridae): Evidence from mitochondrial sequence data and nuclear ISSR-PCR fingerprinting. *Organisms Diversity & Evolution*, 9(3): 201–214.
- Gvozdenovic, S., & Schweiger, M. (2014). Melanism in *Natrix natrix* and *Natrix tessellata* (Serpentes: Colubridae) from Montenegro. *Ecologica Montenegrina*, 1(4): 231–233.
- Hanzlík, P. M. (2022). Stav populace užovky obojkové a výskyt *Ophidiomyces ophidiicola* na Pohořelických rybnících, Bakalářská práce. *Veterinární a Farmaceutická Univerzita Brno*, 41 pp.
- Harding, S. F., Becker, C. G., Yates, J. R., Crump, P., Forstner, M. R. J., Mullin, S. J., & Rodriguez, D. (2022). Comparative host–pathogen associations of Snake Fungal Disease in sympatric species of water snakes (*Nerodia*). *Scientific Reports*, 12(1): 1–12.
- Haynes, E., & Allender, M. (2021). History, Epidemiology, and Pathogenesis of Ophidiomycosis: A Review. *Herpetological Review*, 52(3): 521–536.
- Hoon-Hanks, L. L., Ossiboff, R. J., Bartolini, P., Fogelson, S. B., Perry, S. M., Stöhr, A. C., Cross, S. T., Wellehan, J. F. X., Jacobson, E. R., Dubovi, E. J., & Stenglein, M. D. (2019). Longitudinal and Cross-Sectional Sampling of Serpentovirus (Nidovirus) Infection in Captive Snakes Reveals High Prevalence, Persistent Infection, and Increased Mortality in Pythons and Divergent Serpentovirus Infection in Boas and Colubrids. *Frontiers in Veterinary Science*, 6: 338.
- Hutinec, J., Mebert, B., & Mebert, K. (2011). Ecological Partitioning between Dice Snakes (*Natrix tessellata*) and Grass Snakes (*Natrix natrix*) in Southern Croatia. *Mertensiella*, 18: 225–233.
- Hyatt, A. D., Boyle, D. G., Olsen, V., Boyle, D. B., Berger, L., Obendorf, D., Dalton,

- A., Kriger, K., Hero, M., Hines, H., Phillott, R., Campbell, R., Marantelli, G., Gleason, F., & Colling, A. (2007). Diagnostic assays and sampling protocols for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 73(3): 175–192.
- Ioannidis, Y., & Mebert, K. (2011). Habitat preferences of *Natrix tessellata* at Strofylia, northwestern Peloponnese, and comparison to syntopic *N. natrix*. *Mertensiella*, 18: 302–310.
- IUCN. (2023). *The IUCN Red list of threatened species. Version 2023-1*. IUCN. Dostupné z <<http://www.iucnredlist.org>>.
- Jablonski, D., & Kautman, J. (2017). Melanism in *Natrix tessellata* (Serpentes: Colubridae) from Slovakia. *Herpetology Notes*, 10: 173–175.
- Jablonski, D., Mebert, K., Masroor, R., Simonov, E., Kukushkin, O., Abduraupov, T., & Hofmann, S. (2023). The Silk roads: phylogeography of Central Asian dice snakes (Serpentes: Natricidae) shaped by rivers in deserts and mountain valleys. *Current Zoology*, 20, 1–13.
- Jablonski, D., Vlček, P., & Gvoždík, V. (2014). Autochtonní nebo introdukce? Genetická identita izolované populace užovky podplamaté (*Natrix tessellata*) ze Slezska dle mitochondriální DNA. Zoologické dny Ostrava 2014. Sborník abstraktů z konference 2014. *Ústav Biologie Obratlovců AV ČR, Brno*, 82–33 pp.
- Jelić, D., & Lauš, B. (2011). The gull *Larus cachinnans* (Pallas, 1811) as a natural predator of *Natrix tessellata* (Laurenti, 1768). *Mertensiella*, 8: 451–452.
- Jeřábková, L. (2011). Oboživelníci a plazi: Metoda mapování. *AOPK ČR*, 4 pp.
- Kardong, K. V. (2002). Colubrid snakes and Duvernoy's "Venom" Glands. *J Toxicol Toxin Rev*, 21(1–2): 1–19.
- Ladner, J. T., Palmer, J. M., Ettinger, C. L., & Al., E. (2022). The population genetics of the causative agent of snake fungal disease indicate recent introductions to the USA. *PLoS Biol.* 20:e3001676. *PLoS Biol.*, 20.
- Laňka, V. (1978). Variabilität und Biologie der Würfel-natter (*Natrix tessellata*). *Acta Universitatis Carolinae, Biologica*, 1975–1976: 167–207.
- Lind, C. M., Agugliaro, J., Lorch, J. M., & Farrell, T. M. (2022). Ophidiomycosis is related to seasonal patterns of reproduction, ecdysis, and thermoregulatory behavior in a free-living snake species. *Journal of Zoology*, 319(1): 54–62.
- Lorch, J. M. (2018). Protocol for Collecting Samples for Laboratory Testing of *Ophidiomyces ophiodiicola*, the Causative Agent of Snake Fungal Disease. *USGS-National Wildlife Health Center*, 4 pp.
- Lorch, J. M., Knowles, S., Lankton, J. S., Michell, K., Edwards, J. L., Kapfer, J. M., Staffen, R. A., Wild, E. R., Schmidt, K. Z., Ballmann, A. E., Blodgett, D., Farrell, T. M., Glorioso, B. M., Last, L. A., Price, S. J., Schuler, K. L., Smith, C. E., Wellehan, J. F. X., & Blehert, D. S. (2016). Snake fungal disease:

- An emerging threat to wild snakes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 371, 8 pp.
- Lorch, J. M., Lankton, J., Werner, K., Falendysz, E. A., McCurley, K., & Blehert, D. S. (2015). Experimental Infection of Snakes with *Ophidiomyces ophidiicola* Causes Pathological Changes That Typify Snake Fungal Disease. *Mbio*, 6(6).
- Marini, D., Filippi, E., Montinaro, G., & Origgi, F. C. (2023). Screening of *Ophidiomyces ophidiicola* in the free-ranging snake community annually harvested for the popular ritual of San Domenico e dei Serpari (Cocullo, AQ, Italy). *Acta Herpetologica*, 18(1): 45–52.
- Matsuda, B. M., Green, D. M., & Gregory, P. T. (2006). Amphibians and Reptiles of British Columbia. *Victoria (BC): Royal BC Museum*, 266 pp.
- McKenzie, J. M., Price, S. J., Fleckenstein, J. L., Drayer, A. N., Connette, G. M., Bohuski, E., & Lorch, J. M. (2019). Field Diagnostics and Seasonality of *Ophidiomyces ophidiicola* in Wild Snake Populations. *EcoHealth*, 16(1): 141–150.
- Mebert, K. (2011a). Sexual dimorphism in dice snake (*Natrix tessellata*) from the central Alps. *Mertensiella*, 18: 94–99.
- Mebert, K. (2011b). Terrestrial Dice Snakes : How far from Water a Semiaquatic Snake Ventures out ? *Mertensiella*, 18: 12–15.
- Mebert, K., & Ott, T. (2011). Mating aggregations in *Natrix tessellata*. *Mertensiella*, 18: 437–439.
- Mebert, K., Trapp, B., Dall'Asta, A., Velenský, P., & Böhme, W. (2011). Hybrids between *Natrix tessellata* and *N. natrix/maura*. *Mertensiella*, 18: 154–156.
- Mebert, K., Trapp, B., Kreiner, G., Billing, H., Speybroeck, J., & Henggeler, M. (2011). Nocturnal activity in *Natrix tessellata*, a neglected aspect of its behavioral repertoire. *Mertensiella*, 18: 234–236.
- Meier, G., Notomista, T., Marini, D., & Ferri, V. (2018). First case of Snake Fungal Disease affecting a free-ranging *Natrix natrix* (Linnaeus, 1758) in Ticino Canton, Switzerland. *Herpetology Notes*, 11: 885–891.
- Mikátová, B., Roth, P., & Vlašín, M. (1995). Ochrana plazů. *MŽP ČR. Praha*, 48 pp.
- Mikátová, B., Vlašín, M., & Zavadil, V. (2001). Atlas rozšíření plazů v České republice. Atlas of the distribution of reptiles in the Czech Republic. *AOPK ČR*, 257 pp.
- Moravec, J. (2015). Fauna ČR. Plazi = Reptilia. *Academia, Praha*, 531 pp.
- Moravec, J. (2019). Obojživelníci a plazi České republiky. *Academia, Praha*, 464 pp.
- ND OP AOPK. (2023). *Nálezová databáze Ochrany přírody Agentury ochrany přírody a krajiny České republiky. Version 2023-5. Dostupné z <<https://portal.nature.cz/nd/>>.*

- Neumann, C., & Mebert, K. (2011). Migration behavior of endangered dice snakes (*Natrix tessellata*) at the River Nahe, Germany. *Mertensiella*, 39–48.
- O'Hanlon, S. J., Rieux, A., Farrer, R. A., Rosa, G. M., Waldman, B., Bataille, A., Kosch, T. A., Murray, K. A., Brankovics, B., Fumagalli, M., Martin, M. D., Wales, N., Alvarado-Rybak, M., Bates, K. A., Berger, L., Böll, S., Brookes, L., Clare, F., Courtois, E. A., ... Fisher, M. C. (2018). Recent Asian origin of chytrid fungi causing global amphibian declines. *Science*, 360(6389): 621–627.
- Ohkura, M., Worley, J. J., Hughes-Hallett, J. E., Fisher, J. S., Love, B. C., Arnold, A. E., & Orbach, M. J. (2016). *Ophidiomyces ophiodiicola* on a captive black racer (*Coluber constrictor*) and a garter snake (*Thamnophis sirtalis*) in Pennsylvania. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 47(1): 341–346.
- Oliva, O., Hrabě, S., & Lác, J. (1968). Stavovce Slovenska I. Ryby, obojživelníky a plazy. *Slovenská Akadémia Vied, Bratislava*, 389 pp.
- Origgi, F. C., Pisano, S. R. R., Glaizot, O., Hertwig, S. T., Schmitz, A., & Ursenbacher, S. (2022). *Ophidiomyces ophiodiicola*, Etiologic Agent of Snake Fungal Disease, in Europe since Late 1950s. *Emerging Infectious Diseases*, 28(10): 2064–2068.
- Ovchinnikov, R. S., Vasilyev, D. B., Gaynullina, A. G., Yuzhakov, A. G., Kapustin, A. V., Savinov, V. A., & Gulyukin, A. M. (2021). Detection of *ophidiomyces ophiodiicola* in three file snakes (*Acrochordus granulatus*) imported from Indonesia to the Moscow Zoo (Russia). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 52(3): 1074–1078.
- Papežiková, S., Oselský, M., Papežík, P., & Jablonski, D. (2020). Albinism in *Natrix tessellata* (Serpentes: Natricidae). *Phyllomedusa*, 19(2): 165–176.
- Paré, J. A., & Sigler, L. (2016). An Overview of Reptile Fungal Pathogens in the Genera *Nannizziopsis*, *Paranannizziopsis*, and *Ophidiomyces*. *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*, 26(1–2): 46–53.
- Pecina, P. (1991). Živočichové červeného seznamu ČR ve středočeském kraji 1. Kruhoústí, ryby, obojživelníci a plazi. *Bohemia Centralis*, 20, 61–107.
- Pešanová, V. (2022). Ekologie užovky podplamaté (*Natrix tessellata*) na Chrudimce. Diplomová práce. *Přírodovědecká Fakulta, Univerzita Karlova*, 108 pp.
- Ponec, J. (1978). Zo života plazov. *Bratislava, ČSSR, Příroda*, 195 pp.
- Příbyl, M., Kabelka, R., Hanzlík, P. M., Mikulíček, P., Folk, N., Piaček, V., Pikula, J., & Baláž, V. (2023). *Ophidiomyces ophiodiicola* in free-ranging and captive snakes in the Czech Republic and Slovak Republic. *Journal of Vertebrate Biology*, 16 pp. (in Submissions)
- Quitt, E. (1975). Mapa klimatických oblastí ČSR 1: 500 000. *Geografický Ústav ČSAV Brno*.
- Rajeev, S., Sutton, D. A., Wickes, B. L., Miller, D. L., Giri, D., Van Meter, M., Thompson, E. H., Rinaldi, M. G., Romanelli, A. M., Cano, J. F., & Guarro, J.

- (2009). Isolation and characterization of a new fungal species, *Chrysosporium ophioidicola*, from a mycotic granuloma of a black rat snake (*Elaphe obsoleta obsoleta*). *Journal of Clinical Microbiology*, 47: 1264–1268.
- Rehák, I. (1989). Revize fauny hadů Československa. Kandidátská disertační práce. *Přírodovědecká Fakulta Univerzity Karlovy, Praha*, 291 pp.
- Rozsa, L., Reiczigel, J., & Majoros, G. (2000). Quantifying parasites in samples of hosts. *Journal of Parasitology*, 86: 228–232.
- Růžičková, E. (2012). Real-time PCR a jeho využití pro subtypizaci difúzního velkobuněčného lymfomu. *Bakalářská Práce, Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká Fakulta*, 59 pp.
- Schilliger, L., Paillusseau, C., François, C., & Bonwitt, J. (2023). Major Emerging Fungal Diseases of Reptiles and Amphibians. *Pathogens*, 12(3): 429.
- Sigler, L., Hambleton, S., & Paré, J. A. (2013). Molecular characterization of reptile pathogens currently known as members of the chrysosporium anamorph of *Nannizziopsis vriesii* complex and relationship with some human-associated isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(10): 3338–3357.
- Speybroeck, J., Beukema, W., Bok, B., Van Der Voort, J., & Velikov, I. (2016). Field Guide to the Amphibians and Reptiles of Britain and Europe. *Bloomsbury*, 432 pp.
- Stengle, A. G., Farrell, T. M., Freitas, K. S., Lind, C. M., Price, S. J., Butler, B. O., Tadevosyan, T., Isidoro-Ayza, M., Taylor, D. R., Winzeler, M., & Lorch, J. M. (2019). Evidence of vertical transmission of the snake fungal pathogen *Ophidiomyces ophioidicola*. *J. Wildl. Dis.*, 55: 961–964.
- Sterijovski, B., Ajtić, R., Tomović, L., & Bonnet, X. (2014). Conservation threats to dice snakes (*Natrix tessellata*) in Golem Grad Island (FYR of Macedonia). *Herpetological Conservation and Biology*, 9(3): 468–474.
- Šukalo, G., Dordevic, S., Dmitrovic, D., & Tomovic, L. (2012). Introduced fish *Ameiurus melas* (Rafinesque, 1820): hazard to the Grass snake *Natrix natrix* (LAURENTI, 1768). *Hyla*, 2: 41–42.
- Sun, P.-L., Yang, C.-K., Li, W.-T., Lai, W.-Y., Fan, Y.-C., Huang, H.-C., & Yu, P.-H. (2021). Infection with *Nannizziopsis guarroi* and *Ophidiomyces ophioidicola* in reptiles in Taiwan. *Transboundary and Emerging Diseases*, 69(2): 764–775.
- Šváb, M. (2003). Ekologie užovky podplamaté (*Natrix tessellata*) ve středních Čechách. Diplomová práce. *Přírodovědecká Fakulta Univerzity Karlovy, Praha*, 76 pp.
- Svoboda, J., Mrugała, A., Kozubíková-Balcarová, E., & Petrusek, A. (2016). Hosts and transmission of the crayfish plague pathogen *Aphanomyces astaci*: a review. *Journal of Fish Diseases*, 40(1): 127–140.
- Takami, Y., Nam, K. O., Takaki, Y., Kadekaru, S., Hemmi, C., Hosoya, T., & Une, Y. (2021). First report of ophidiomycosis in asia caused by *ophidiomyces*

- ophiodiicola* in captive snakes in japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 83(8): 1234–1239.
- Trapp, B., & Mebert, K. (2011). Upward Position of eyes and nostrils of the Dice snake for Breaking the Water surface? *Mertensiella*, 18: 440.
- Tuniyev, B., Tuniyev, S., Kirschey, T., & Mebert, K. (2011). Notes on the Dice Snake (*Natrix tessellata*) from the Caucasian Isthmus. *Mertensiella*, 18: 343–356.
- Van Wassenbergh, S., Brecko, J., Aerts, P., Stouten, I., Vanheusden, G., Camps, A., Van Damme, R., & Herrel, A. (2010). Hydrodynamic constraints on prey-capture performance in forward-striking snakes. *Journal of the Royal Society Interface*, 7(46): 773–785.
- Velenský, M. (2007). Ekologie a etologie populace užovky podplamaté (*Natrix tessellata*) v Praze-Tróji. *Středoškolská Odborná Činnost , Praha, Obor Biologie, 2006/2007*, 58 pp.
- Velenský, M., Velenský, P., & Mebert, K. (2011). Ecology and morphology of dice snakes (*Natrix tessellata*) in the city district Troja, Prague. *Mertensiella*, 18: 157–176.
- Vlašín, M., & Mikátová, B. (2007). Metodika sledování výskytu plazů v České republice. *Brno, ČSOP*, 122 pp.
- Vlček, P. (1998). Dva nálezy užovky podplamaté ve Slezsku. *Živa*, 46: 85.
- Vlček, P., Najbar, B., & Jablonski, D. (2010). First records of the dice snake (*Natrix tessellata*) from the north-eastern part of the Czech Republic and Poland. *Herpetology Notes*, 3(1): 23–26.
- Vlček, P., Zavadil, V., Jablonski, D., & Mebert, K. (2011). Dice Snake (*Natrix tessellata*) in the Baltic Sea Drainage Basin (Karvinsko). *Mertensiella*, 18: 177–187.
- Weiperth, A., Gaebeler, T., Potyó, I., & Puky, M. (2014). A global overview on the diet of the dice snake (*Natrix tessellata*) from a geographical perspective: foraging in atypical habitats and feeding spectrum widening helps colonisation and survival under suboptimal conditions for a piscivorous snake. *Zoological Studies*, 53(1): 1–9.
- Zipkin, E. F., DiRenzo, G. V., Ray, J. M., Rossman, S., & Lips, K. R. (2020). Tropical snake diversity collapses after widespread amphibian loss. *Science*, 367(6479): 814–816.
- Zwach, I. (2013). Obojživelníci a plazi České republiky. *Grada*, 496 pp.

8. Příloha



SFD.2023.06.29

Experiment

Creation Date	06/29/2023 5:25:09 PM	Last Modified Date	06/29/2023 6:49:46 PM
Operator	System Admin	Owner	System Admin
Start Time	06/29/2023 5:27:14 PM	End Time	06/29/2023 6:27:04 PM
Run State	Completed	Software Version	LCS480 1.5.1.62
Macro		Macro Owner	
Macro Status			
Templates	SFD.Run Protocol	Plate ID	B6590751
Test ID		Lot ID	
Color Comp ID			
Run Notes			

Programs

Program Name	hotstart						
Cycles	1	Analysis Mode	None				
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:03:00	4.40		0	0	0
Program Name	cycling						
Cycles	50	Analysis Mode	Quantification				
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:00:03	4.40		0	0	0
60	Single	00:00:30	2.20		0	0	0

Abs Quant/2nd Derivative Max for All Samples (Abs Quant/2nd Derivative Max)

Settings

Channel	465-510		
Color Compensation	Off		
Program	cycling	Units	
Mode	High Confidence		
Subset Name	All Samples		

Příloha 1: Programové zpracování detekce SFD

Results

Inc	Pos	Name	Type	CP	Concentration	Standard	Status
<input checked="" type="checkbox"/>	D4	Sample 40	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	D5	Sample 41	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	D6	Sample 42	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	D7	Sample 43	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	D8	Sample 44	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	D9	Sample 45	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	D10	Sample 46	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	D11	Sample 47	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	D12	Sample 48	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	E1	Sample 49	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	E2	Sample 50	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	E3	Sample 51	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	E4	Sample 52	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	E5	Sample 53	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	E6	Sample 54	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	E7	Sample 55	Positive Control/Calibrator				
<input checked="" type="checkbox"/>	E8	Sample 56	Positive Control/Calibrator				
<input checked="" type="checkbox"/>	E9	Sample 57	Negative Control	11.07			
<input checked="" type="checkbox"/>	E10	Sample 58	Negative Control	11.07			
<input checked="" type="checkbox"/>	E11	Sample 59	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	E12	Sample 60	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	F1	Sample 61	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	F2	Sample 62	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	F3	Sample 63	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	F4	Sample 64	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	F5	Sample 65	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	F6	Sample 66	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	F7	Sample 67	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	F8	Sample 68	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	F9	Sample 69	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	F10	Sample 70	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	F11	Sample 71	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	F12	Sample 72	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	G1	Sample 73	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	G2	Sample 74	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	G3	Sample 75	Unknown				
<input checked="" type="checkbox"/>	G4	Sample 76	Unknown				

Příloha 2: Ukázka softwarového zpracování se vzorky k vyhodnocení společně s pozitivními a negativními kontrolami.

	volume per well	volume
H2O	5.75	556.6
Roche Probes Master	12.5	1210
ITS f (20uM)	0.5	48.4
ITS r (20uM)	0.5	48.4
SFD probe (20uM)	0.25	24.2
BSA (20ug/ul)	0.5	48.4
celá směs		1936
DNA (10x diluted)	5	
celková reakce	25	

95C for 3 min

50 cycles:

95C for 3 sec

60C for 30 sec

Příloha 3: Ukázka protokolu experimentu.

```

Quantitative Parasitology - version 3.0
Data selected for analysis
Sample 1: Ntess.Havirov.2022

```

```

Descriptive statistics

```

Sample	--No.of hosts--		Prevalence	---Intensity---		Var/mean ratio*
	Total	Infected		Mean	Median	
1:	12	0	0.0%	-1.#J	0.0	-1.#J

* Var/mean ratio is calculated including uninfected hosts as well

```

Better exact confidence limits for the population prevalence
- Sterne's exact method up to N=1000, adjusted Wald method for N>1000.
- In most cases shorter than the Clopper-Pearson interval.
- More details: Reiczigel, Statistics in Medicine, 22, 611-621 (2003).
Sample prevalence: 0.000 ( 0 infected individuals out of 12)
90% confidence limits: 0.0000 to 0.2083
95% confidence limits: 0.0000 to 0.2426
99% confidence limits: 0.0000 to 0.3545

```

Příloha 4: Výpočet prevalence pro rok 2022 (n = 12).

```

Quantitative Parasitology - version 3.0
Data selected for analysis
Sample 1: Ntess.Havirov2023

```

```

Descriptive statistics

```

	--No.of hosts--		Prevalence	---Intensity---		Var/mean ratio*
	Total	Infected		Mean	Median	
Sample 1:	33	0	0.0%	-1.#J	0.0	-1.#J

* Var/mean ratio is calculated including uninfected hosts as well

```

Better exact confidence limits for the population prevalence
- Sterne's exact method up to N=1000, adjusted Wald method for N>1000.
- In most cases shorter than the Clopper-Pearson interval.
- More details: Reiczigel, Statistics in Medicine, 22, 611-621 (2003).
Sample prevalence: 0.000 ( 0 infected individuals out of 33)
90% confidence limits: 0.0000 to 0.0895
95% confidence limits: 0.0000 to 0.1014
99% confidence limits: 0.0000 to 0.1499

```

Příloha 5: Výpočet prevalence pro rok 2023 (n = 33).

```

Quantitative Parasitology - version 3.0
Data selected for analysis
Sample 1: N.tess.Havirov2022+2023

```

```

Descriptive statistics

```

	--No.of hosts--		Prevalence	---Intensity---		Var/mean ratio*
	Total	Infected		Mean	Median	
Sample 1:	45	0	0.0%	-1.#J	0.0	-1.#J

* Var/mean ratio is calculated including uninfected hosts as well

```

Better exact confidence limits for the population prevalence
- Sterne's exact method up to N=1000, adjusted Wald method for N>1000.
- In most cases shorter than the Clopper-Pearson interval.
- More details: Reiczigel, Statistics in Medicine, 22, 611-621 (2003).
Sample prevalence: 0.000 ( 0 infected individuals out of 45)
90% confidence limits: 0.0000 to 0.0658
95% confidence limits: 0.0000 to 0.0832
99% confidence limits: 0.0000 to 0.1096

```

Příloha 6: Výpočet prevalence pro rok 2022–2023 (n = 45).

Ophidiomykóza v Česku a okolí

KABELKA R. (1), PŘIBYL M. (2), HANZLÍK P.M. (2), BALÁŽ V. (2,3)

(1) Katedra ekologie a ochrany životního prostředí, PFF UP, Olomouc; (2) Ústav ekologie a chorob zoonozivních zvířat, ryb a včel, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární univerzita Brno; (3) Katedra zoologie, PFF UP, Olomouc

Sumarizace zaznamenaného výskytu patogenní houby *Ophidiomyces ophiodiicola*, která u hadů působí kožní a někdy i systémové onemocnění ophidiomykózu, ve volné přírodě Česka a Slovenska. Od prvního záznamu tohoto onemocnění v ČR z Brněnské přehrady v r. 2016 se naše informace značně rozšířily. Jako hlavními hostitelskými druhy byly určeny užovky rodu *Natrix*, proto se naše snaha o zmapování výskytu zaměřila na užovku podplamatou *N. tessellata* a užovku obojkovou *N. natrix*. Užovka obojková je nejběžnějším druhem hada v ČR a vyskytuje se plošně, proto se jeví jako dobrý druh k monitoringu výskytu nákazy. Užovka podplamatá se vyskytuje lokalizovaně, ale často ve velmi vysoké populační denzitě a je proto snadnější na studovaných lokalitách odchytit a ovzorkovat relevantní počty jedinců. Nalezení hadi byli odchyceni, změřeni a zváženi, přičemž jim byly odebrány stěry a zaznamenávány případné kožní léze. Takto ovzorkovaní jedinci byli opět vypuštěni v místě odchytu. Detekce *O. ophiodiicola* byla následně provedena pomocí qPCR. Kromě cílových druhů *N. natrix*, *N. tessellata* jsou k dispozici data také z užovky hladké *Coronella austriaca*, užovky stromové *Zamenis longissimus* a zmije obecné *Vipera berus* z Česka a Slovenska.

Výskyt infikovaných populací se zdá být ostrůvkovitý, přestože přítomnost *O. ophiodiicola* je z literatury již známá z velkého areálu v rámci Evropy, v našem souboru od Krušných hor po Devín (Slovensko). Překvapivější než přítomnost infikovaných jedinců, se pak jeví nepřítomnost patogenu v souborech desítek vzorků z exponovaných populací (např. NP Podyjí). Populační dopady nákazy *O. ophiodiicola* na naše druhy hadů ve volné přírodě jsme dosud nezaznamenali,

98

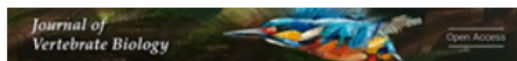
Zoologické dny Brno 2023, Sborník abstraktů z konference 9.–10. února 2023

ale může to být dáno nejen jejich odolností, ale spíše přítomností méně nebezpečné linie patogenu.

Práce byla podpořena z projektu 2022ITA25 Interní tvůrčí agentury VETUNI.

POSTER

Příloha 7: Anotace posteru ve sborníku z mezinárodní konference Zoologické dny Brno 2023.



***Ophidiomyces ophidiicola* in free-ranging and captive snakes in the Czech Republic and Slovak Republic**

Journal:	<i>Journal of Vertebrate Biology</i>
Manuscript ID	JVB-2023-050.R2
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	30-Jun-2023
Complete List of Authors:	<p>Přibyl, Michal ; University of Veterinary Sciences Brno, Department of Ecology and Diseases of Zoo Animals, Game, Fish and Bees Kabelka, Richard; Palacký University Olomouc, Faculty of Science, Department of Zoology Hanzlík, Patrik; University of Veterinary Sciences Brno, Department of Ecology and Diseases of Zoo Animals, Game, Fish and Bees Mikulíček, Peter; Comenius University in Bratislava Faculty of Natural Sciences, Department of Zoology Folk, Nicolas; Comenius University in Bratislava Faculty of Natural Sciences Piaček, Vladimír; University of Veterinary Sciences Brno, Department of Ecology and Diseases of Zoo Animals, Game, Fish and Bees Píkula, Jiří; University of Veterinary Sciences Brno Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, Department of Ecology and Diseases of Zoo Animals, Game, Fish and Bees Baláž, Vojtech; University of Veterinary Sciences Brno, Department of Ecology and Diseases of Zoo Animals, Game, Fish and Bees; Palacký University Olomouc, Faculty of Science, Department of Zoology</p>
Keywords:	Reptiles
Topics:	Ecology

SCHOLARONE™
Manuscripts

Příloha 8: Manuskript článku akceptovaného k publikaci, do něhož jsou zahrnuty výsledky této práce.

Příloha 9: Morfologické hodnoty odchycených jedinců.

Datum	Označení	Pohlaví [M/F]	Hmotnost [g]	SVL [mm]	Ltot [mm]	Lcd [mm]	SVL/Lcd [mm]	Ltot/Lcd [mm]
<i>Natrix tessellata</i>								
03.06.22	1	M	90	560	730	170	3,29	4,29
03.06.22	2	F	200	650	785	135	4,81	5,81
03.06.22	3	F	410	930	1110	180	5,17	6,17
11.08.22	4	F	215	780	955	175	4,46	5,46
11.08.22	5	(M)	15	300	380	80	3,75	4,75
11.08.22	6	(M)	23	315	390	75	4,20	5,20
11.08.22	7	F	185	710	890	180	3,94	4,94
11.08.22	8	F	250	800	970	170	4,71	5,71
11.08.22	9	F	190	740	920	180	4,11	5,11
11.08.22	10	(M)	12	260	330	70	3,71	4,71
11.08.22	11	(F)	8	240	295	55	4,36	5,36
11.08.22	12	(M)	35	360	460	100	3,60	4,60
11.05.23	13	F	282	805	980	175	4,60	5,60
11.05.23	14	M	51	470	610	140	3,36	4,36
11.05.23	15	F	133	640	790	150	4,27	5,27
11.05.23	16	M	43	450	570	120	3,75	4,75
11.05.23	17	F	202	705	870	165	4,27	5,27
11.05.23	18	M	54	525	650	125	4,20	5,20
11.05.23	19	F	196	665	810	145	4,59	5,59
20.05.23	20	(F)	18	335	410	75	4,47	5,47
20.05.23	21	M	80	595	750	155	3,84	4,84
20.05.23	22	F	112	590	715	125	4,72	5,72
20.05.23	23	(F)	27	400	485	85	4,71	5,71
20.05.23	24	M	36	435	555	120	3,63	4,63
20.05.23	25	M	54	515	650	135	3,81	4,81
20.05.23	27	M	78	500	640	140	3,57	4,57
20.05.23	28	F	290	755	920	165	4,58	5,58
20.05.23	29	M	85	545	685	140	3,89	4,89
20.05.23	30	F	219	720	885	165	4,36	5,36
20.05.23	31	M	58	450	565	115	3,91	4,91
20.05.23	32	F	124	620	760	140	4,43	5,43
21.05.23	33	M	35	435	560	125	3,48	4,48
21.05.23	34	(F)	28	390	470	80	4,88	5,88
21.05.23	35	M	97	590	725	135	4,37	5,37
21.05.23	36	M	78	620	765	145	4,28	5,28
21.05.23	37	F	272	750	920	170	4,41	5,41
21.05.23	38	M	66	520	665	145	3,59	4,59
01.06.23	39	F	350	850	1050	200	4,25	5,25
01.06.23	40	F	320	790	970	180	4,39	5,39
01.06.23	41	M	135	620	765	145	4,28	5,28
01.06.23	42	F	410	800	980	180	4,44	5,44

01.06.23	43	F	180	685	840	155	4,42	5,42
02.06.23	44	F	330	825	1000	175	4,71	5,71
02.06.23	45	F	242	745	900	155	4,81	5,81
02.06.23	46	F	220	660	805	145	4,55	5,55

<i>Natrix natrix</i>								
20.05.23	26	M	42	510	640	130	-	-



Příloha 10: Nejdelší zaznamenaný jedinec s celkovou délkou těla 1110 mm.



Příloha 11: Jedinec č. 4.



Příloha 12: Jedinec č. 20.



Příloha 13: Jedinec č. 21.



Příloha 14: Jedinec č. 22.



Příloha 15: Jedinec č. 23.



Příloha 16: Jedinec č. 24.



Příloha 17: Jedinec č. 25.



Příloha 18: Jedinec č. 27.



Příloha 19: Jedinec č. 28.



Příloha 20: Jedinec č. 29.



Příloha 21: Jedinec č. 30.



Příloha 22: Jedinec č. 31.



Příloha 23: Jedinec č. 32.



Příloha 24: Jedinec č. 33.



Příloha 25: Jedinec č. 34.



Příloha 26: Jedinec č. 35.



Příloha 27: Jedinec č. 37.



Příloha 28: Jedinec č. 38.



Příloha 29: Jedinec č. 39.



Příloha 30: Jedinec č. 40.



Příloha 31: Jedinec č. 41.



Příloha 32: Jedinec č. 42.



Příloha 33: Jedinec č. 43.



Příloha 34: Jedinec č. 44.



Příloha 35: Jedinec č. 45.



Příloha 36: Jedinec č. 46.