

Univerzita Palackého v Olomouci  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra ekologie a životního prostředí



## Zimní agregace u netopýrů ve vztahu k WNS

Pavλίna Havlová

Diplomová práce  
předložená na Katedře ekologie a životního prostředí  
Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci

jako součást požadavků  
na získání titulu Mgr. v oboru  
Ochrana a tvorba životního prostředí

Vedoucí práce: doc. Mgr. Tomáš Bartonička, Ph. D.

Olomouc 2017



### **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením doc. Mgr. Tomáše Bartoničky, Ph. D. a pouze za použití citovaných literárních zdrojů.

V Olomouci 17.7.2017

.....  
Podpis

Havlová P.: Zimní agregace u netopýrů ve vztahu k WNS. Diplomová práce, Katedra Ekologie a životního prostředí, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, 39 s., v češtině.

## **Abstrakt**

White-nose syndrome (WNS) je nedávno objevené onemocnění hibernujících netopýrů. Jeho původcem je psychrofilní plíseň *Pseudogymnoascus destructans* (*Pd*). WNS byl objeven roku 2006 v Severní Americe, kam byla *Pd* pravděpodobně zavlečena z Evropy, a decimuje zde populace místních netopýrů. Předpokládá se, že v přenosu patogenu hraje roli vzájemný kontakt mezi netopýry, ke kterému přispívá tvorba agregací netopýrů při hibernaci. V této práci jsem zkoumala na vzorku 154 netopýrů vliv přítomnosti netopýra v agregaci na intenzitu WNS a množství *Pd*. Mé výsledky naznačují, že v evropských podmínkách agregace nevedou k větší intenzitě WNS, ovšem pravděpodobně se podílí na rozšiřování *Pd* mezi jedinci.

Klíčová slova: netopýři, syndrom bílého nosu, *Pseudogymnoascus destructans*, zimní agregace netopýrů

Havlová P.: Winter aggregations of bats in relation to WNS. Diploma Thesis, Department of Ecology and Environmental Sciences, Faculty of Science, Palacky University of Olomouc, 39 pp., in Czech.

## **Abstract**

White-nose syndrome (WNS) is a recently discovered fungal disease of hibernating bats caused by the psychrophilic fungus *Pseudogymnoascus destructans* (*Pd*). WNS was discovered in 2006 in North America, where *Pd* was probably introduced from Europe, and WNS has been devastating naive populations of bats here. It is assumed that in the transmission of pathogens contact between the bats plays a role and clustering of bats during hibernation contributes to this. In this work 154 bats were sampled and I examined the effect of the presence of bats in aggregation on the intensity of WNS and *Pd* load. My results suggest that the clustering of bats is not to lead to greater WNS intensity in European conditions, but it is probably involved in spreading *Pd* among individuals.

Key words: bats, white-nose syndrome, WNS, *Pseudogymnoascus destructans*, clustering during hibernation

## Obsah

Seznam tabulek .....	VIII
Seznam obrázků .....	IX
Poděkování.....	XI
1 Úvod.....	1
1.1 Onemocnění WNS.....	2
1.1.1 Objevení WNS a jeho rozšíření.....	2
1.1.2 Příznaky WNS.....	3
1.1.3 Smrtelné následky onemocnění.....	4
1.1.4 Způsoby diagnostikování WNS a zjišťování intenzity.....	6
1.2 Tvorba agregací netopýrů při hibernaci .....	8
1.2.1 Hibernační strategie a výhody zimních agregací .....	8
1.2.2 Tvorba agregací v souvislosti s WNS .....	10
2 Cíle práce .....	12
3 Materiál a metody .....	13
3.1 Kvantifikace intenzity WNS a zjišťování množství <i>Pd</i> u netopýrů na vybraných zimovištích .....	13
3.2 Agregace netopýrů na zimovištích .....	14
3.3 Statistické zpracování dat.....	16
3.3.1 WNS léze a množství <i>Pd</i> .....	16
3.3.2 Tvorba agregací netopýrů na zimovištích .....	17
4 Výsledky .....	19
4.1 Intenzita WNS a množství <i>Pd</i> .....	19
4.1.1 Vztah mezi počtem lézí a množstvím <i>Pd</i> .....	19
4.1.2 Vizualní diagnostika WNS.....	19
4.1.3 Vliv vybraných faktorů na intenzitu WNS a množství <i>Pd</i> .....	21

4.2	Tvorba agregací na zimovištích.....	24
4.2.1	Počty jedinců v agregacích.....	24
4.2.2	Vliv typu zimoviště na agregování netopýrů.....	24
5	Diskuze .....	26
5.1	Vztah mezi počtem WNS lézí a množstvím <i>Pd</i> .....	26
5.2	Vizuální diagnostika WNS .....	26
5.3	Vliv pohlaví a věku na intenzitu WNS.....	27
5.4	Vliv tvorby agregací na intenzitu WNS a přenos <i>Pd</i> .....	29
5.5	Vliv typu zimoviště na množství <i>Pd</i> u netopýrů .....	30
5.6	Vliv typu zimoviště na agregování netopýrů.....	31
6	Závěrem .....	32
7	Souhrn.....	33
	Literatura.....	35

**Seznam tabulek**

<b>Tab. 1:</b> Počty jedinců ve vzorku a mediány s rozpětím kvartilů ( $x_{25}-x_{75}$ ) u intenzity WNS (počet lézí levého křídla) a množství <i>Pd</i> v ng na $\text{cm}^2$ křídla (tzv. „fungal load“) u kategorií sledovaných proměnných (pohlaví, stáří, typ zimoviště a přítomnost jedince v agregaci).....	21
<b>Tab. 2:</b> Mediány s rozpětím kvartilů ( $x_{25}-x_{75}$ ) u proměnných týkajících se agregací na dvou typech zimovišť (jeskyně/štola) a na všech zimovištích celkem .....	24



## Seznam obrázků

<b>Obr. 1:</b> Podsvícení křídel UV lampou pro zjištění diagnostických lézí WNS (foto: vlastní archiv).....	6
<b>Obr. 2:</b> Agregace netopýra velkého ( <i>Myotis myotis</i> ) s viditelnými povlaky plísně <i>P. destructans</i> (foto: vlastní archiv) .....	10
<b>Obr. 3:</b> Focení křídel netopýrů za využití podsvícení UV lampou v Májových jeskyních (foto: Jiří Šafář).....	14
<b>Obr. 4:</b> Ve zvětšení patrné oranžově fluoreskující léze u levého křídla podsvíceného UV světlem (foto: vlastní archiv).....	15
<b>Obr. 5:</b> Vztah celkového počtu WNS lézí netopýra a počtu WNS lézí levého křídla. Celkový počet WNS lézí pozitivně koreluje s počtem na levém křídle.....	16
<b>Obr. 6:</b> Vztah počtu WNS lézí (levé křídlo) a množství <i>Pd</i> na $\text{cm}^2$ levého křídla (tzv. „fungal load“). Počet WNS lézí na množství <i>Pd</i> nezávisí .....	19
<b>Obr. 7:</b> Počty WNS lézí netopýrů u jednotlivých kategorií vizuálního hodnocení WNS. Kategorie 0 se statisticky významně odlišuje od ostatních.....	20
<b>Obr. 8:</b> Množství <i>Pd</i> na $\text{cm}^2$ křídla (tzv. „fungal load“) u jednotlivých kategorií vizuálního hodnocení WNS. Kategorie 3 se statisticky významně odlišuje od ostatních .....	20
<b>Obr. 9:</b> Vztah mezi průměrným počtem WNS lézí a průměrným podílem agregujících jedinců na zimovišti .....	22
<b>Obr. 10:</b> Vliv pohlaví (samice/samec) a věku (adult/subadult) na množství WNS lézí u netopýrů. A) Samci mají průkazně více lézí než samice. B) Subadulti mají více lézí než adultní jedinci .....	22
<b>Obr. 11:</b> Vliv kombinace věku a pohlaví jedinců na počet WNS lézí. Výčet kategorií: ad F (adultní samice, n=44), ad M (adultní samec, n=48), sad F (subadultní samice, n=25), sad M (subadultní samec, n=33). Adultní samice mají lézí nejméně a subadultní samci nejvíce, navzájem se od sebe signifikantně liší .....	23
<b>Obr. 12:</b> Vliv typu zimoviště (jeskyně/štola) a přítomnosti jedince v agregaci (v agregaci/samostatně) na množství <i>Pd</i> na $\text{cm}^2$ křídla. A) V jeskyních mají netopýři průkazně více <i>Pd</i> než ve štolách. B) Netopýři v agregacích mají více <i>Pd</i> než samostatní jedinci.....	23

**Obr. 13:** Vliv typu zimoviště (jeskyně/štola) A) na podíl netopýrů přítomných v agregaci na zimovišti a B) na průměrnou velikost agregace na zimovišti. Mezi jeskyněmi a štolami v obou případech není signifikantní rozdíl .....25

## Poděkování

Na tomto místě chci poděkovat předně vedoucímu této práce doc. Mgr. Tomáši Bartoničkovi, Ph.D., který důsledně připomínkoval průběh mé práce a poskytoval mi nemalou pomoc při sběru dat. Děkuji mu za všechny jeho cenné rady, přívětivost a vstřícný přístup.

Dále děkuji všem členům ČESON, kteří poskytli své záznamy o agregování netopýrů ze zimních kontrol. Jmenovitě pak RNDr. Jiřímu Šafářovi, který ochotně přispěl ke sběru dat o intenzitě WNS přímo na zimovištích a pořídil ilustrační foto z terénu. Za další část dat děkuji také doktorandovi mého vedoucího Mgr. Jánů Blažkovi, od něhož mi byly poskytnuty počty WNS lézí netopýrů ze zimoviště v Malé Morávce. Mé poděkování patří také Mgr. Natálii Martínkové, Ph.D., díky níž jsem mohla vyhodnocovat i laboratorně zjištěné údaje o množství patogenní plísně získané v terénu stěrem z křídél.

Děkuji rovněž RNDr. Martinu Duchoslavovi, Ph.D. za laskavé konzultace ke statistickému zpracování. Za podporu v řešení otázek statistických metod pak děkuji i Mgr. Romanu Kalousovi.

Připojuji také poděkování Bc. Kateřině Vojtěchové za ochotné zprostředkování zevrubného teoretického exkurzu do tajů molekulární biologie a metody PCR. Za jazykovou korekturu anglického překladu abstraktu této práce velice děkuji Bc. Lucii Šimkové.

Konečně děkuji svým rodičům a všem blízkým. Cením si toho, že za mnou stáli, důvěřovali mi a podporovali v mém úsilí.

V Olomouci, 17.7.2017



# 1 Úvod

Svět je v současnosti globalizovanější více než kdy v historii. Člověk svým vlivem propojuje dříve izolované oblasti a už po staletí se podílí na řadě introdukcí různých druhů organismů do jejich nepůvodního prostředí. Problémem je, že nelze dohlédnout důsledky takovýchto zásahů. Mezi možné negativní následky patří mimo jiné i šíření nepůvodních chorob, které může být hrozbou pro řadu taxonů. Příkladem může být chytridiomykóza obojživelníků, varroáza včel, račí mor, parapoxvirus napadající veverka a další (Daszak et al. 2000). K této řadě zavlečených chorob se připojilo i nedávno objevené onemocnění white-nose syndrome u netopýrů.

White-nose syndrome (WNS) neboli „syndrom bílého nosu“ postihuje netopýry v průběhu zimní hibernace. Původcem tohoto onemocnění je vřeckovýtrusá houba *Pseudogymnoascus destructans* Minnis & Lindner (2013), nejprve popsána jako *Geomyces destructans* Blehert & Gargas (2009) (Warnecke et al. 2012), dále v textu pouze jako *Pd*. Vzhledem k psychrofilní povaze této plísně je pozoruhodné, že jejím hostitelem jsou teplokrevní savci (Blehert 2012). Tento patogen využívá k osídlení pokožky netopýrů pro něho příznivé zimní období hibernace, kdy se tělesná teplota zvířat dlouhodobě snižuje na teplotu blízkou okolnímu prostředí zimoviště a imunitní reakce netopýrů jsou potlačeny (Meteyer et al. 2009). Nikdy předtím nebyla studována u přezimujících savců kožní mykóza, která by zasahovala tak intenzivně do fyziologických funkcí a působila úmrtí (Verant et al. 2014). Pokud bychom ve volné přírodě hledali analogii k WNS, částečně ji nalezneme u chytridiomykózy obojživelníků, kde plíseň *Batrachospermum dendrobatidis* také napadá kůži, výrazně tím narušuje homeostázu organismu a infekce končí smrtí (Cryan et al. 2010). Chytridiomykóza negativně zasáhla do populací obojživelníků po celém světě. V konkrétních mechanismech se ale tyto dvě onemocnění výrazně odlišují. *Pd* v invazivnosti kůže překračuje hranici dermatofytů a prorůstá do živé tkáně (Meteyer et al. 2009). Oba patogeny se však způsobovaným poškozením omezují pouze na kůži, nezasahují vnitřní orgány. Přesto působí na své hostitele fatálně (Courtin et al. 2010).

## 1.1 Onemocnění WNS

### 1.1.1 Objevení WNS a jeho rozšíření

V roce 2006 byly v Severní Americe pozorovány nebývalé úhyny netopýrů na jejich zimovištích (Blehert et al. 2009). Kolonie hibernujících netopýrů v dalších letech lokálně masově vymírají (Blehert 2009; Frick et al. 2010). Vědci začali intenzivně pátrat po příčinách těchto masových úhynů. Zanedlouho bylo odhaleno dříve neznámé onemocnění a nově byl zjištěn a popsán jediný původce této nemoci, psychrofilní (chladnomilná) plíseň *Pseudogymnoascus (Geomyces) destructans (Pd)* (Warnecke et al. 2012). Podle nápadných bílých porostů plísně viditelných na netopýřím čenichu, byla nemoc nazvána „syndromem bílého nosu“, white-nose syndrome (WNS).

Původce WNS byl za krátkou dobu zjištěn i v Evropě (Martínková et al. 2010; Wibbelt et al. 2013) a nově i v Asii (Hoyt et al. 2016; Zukal et al. 2016a). V těchto oblastech ovšem nebylo zaznamenáno hromadné vymírání netopýřích populací, které provázelo výskyt *Pd* v Severní Americe (Martínková et al. 2010; Puechmaille et al. 2011). Šíření původce WNS v Severní Americe navíc probíhalo ve vlně od východního pobřeží k západu, jakoby z jednoho ohniska (Wilder et al. 2011). V Evropě a také v Asii byla oproti tomu *Pd* nalézána na různých místech, postupně hlášena nesystematicky z více států. Průzkumy naznačují, že by se výskyt *Pd* mohl vztahovat na celou Eurasii (Hoyt et al. 2016; Zukal et al. 2016a). Genetické studie zaměřené na genom patogenní plísně také zjistily genetickou variabilitu na území Evropy a Asie oproti klonální povaze vzorků *Pd* ze Severní Ameriky (Rajkumar et al. 2011). To vše nahrává hypotéze, že byla *Pd* zavlečena na území Severní Ameriky z palearktické oblasti, kde se setkala s tzv. „naivními“ populacemi (tj. s těmi, které se s patogenem dříve nesetkaly) (např. Wibbelt et al. 2010; Blehert 2012). V palearktu se původce WNS vyskytoval už historicky, zdejší netopýři se s ním vyvíjeli a dnes ho dovedou tolerovat (Martínková et al. 2010, Wibbelt et al. 2010; Warnecke et al. 2012; Zukal et al. 2016a). To znamená, že se u nich onemocnění projevuje také, ale vyrovnávají se s ním a nezemřou na ně (Puechmaille et al. 2011; Pikula et al. 2012), kdežto u amerických druhů netopýrů vede k častějšímu probouzení při hibernaci a předčasnému vyčerpání tukových zásob končící smrtí (Warnecke et al. 2012). WNS byl dosud potvrzen u 14 druhů evropských a asijských netopýrů a u dalších sedmi byla sledována přítomnost *Pd* bez prokázání propuknutí

onemocnění. U severoamerických netopýrů je to 7 druhů s doložením WNS a 5 podezřelých na WNS ([www.whitenosesyndrome.org](http://www.whitenosesyndrome.org)).

### 1.1.2 Příznaky WNS

Plíseň *Pd* u hibernujících netopýrů napadá neosrstěné plochy pokožky na uších, čenichu a nejsilněji postihuje kožní membránu křídel (Blehert et al. 2009; Meteyer et al. 2009). Samotný výskyt porostu plísně na netopýrovi však nemusí znamenat přítomnost WNS. *Pd* se může chovat do určité doby dermatofyticky, to znamená, že osidluje jen svrchní neživé zrohovatělé části pokožky (Wibbelt et al. 2013). Onemocnění propuká až v okamžiku, kdy plíseň pronikne bazální membránou, zasáhne tak až do živé pojivové tkáně spodních vrstev kůže a vytváří pro WNS typické léze (Meteyer et al. 2009). Jsou to pod mikroskopem patrné shluky hyf a spor ve tvaru pohárků či mističek (tzv. „cup-like erosions“). *Pd* dále prorůstá a vyplňuje vlasové váčky, mazové a apokrinní žlázy (*ibid.*). Plíseň může prorůst skrze celou šířku křídelní membrány (Band'ouchová et al. 2015). Dosud není jasné, kde je prahová hodnota zatížení patogenu, tj. kdy už je množství plísně takové, že vyústí v invazivní činnost a tvorbu WNS lézí (Zukal et al. 2016a).

*Pd* při prorůstání živou tkání vylučuje enzymy a další metabolity. Český vědecký tým mezi nimi nedávno odhalil i riboflavin (vitamín B<sub>2</sub>) (Flieger et al. 2016). Pro organismus jinak prospěšná látka může při vysokých koncentracích působit toxicky. Netopýři při hibernaci tlumí svůj metabolismus, průtok krve je snížený a možnosti vylučování sekundárních metabolitů plísně jsou tudíž potlačené. Proto se riboflavin v místech lézí kumuluje a skrze své cytotoxické působení zodpovídá za nekrotizaci okolní tkáně (*ibid.*). Situace se horší při probouzení netopýrů ke konci hibernace, kdy začnou vylétávat ven ze zimovišť. Při probuzení dochází k obnovení krevního oběhu a zvýší se množství kyslíku v tkáních. Kyslík reaguje s riboflavinem a při vystavení světlu způsobuje tzv. oxidační stres, tvorbu volných radikálů, které organismus nestačí odbourávat. Zároveň vysoké koncentrace riboflavinu v lézích mohou vyvolat bouřlivou reakci znovu obnoveného imunitního systému. Buňky ze skupiny T-lymfocytů totiž využívají riboflavin a jeho metabolity k vyhledávání mikrobiální infekce. Do postižených míst kůže s hyperakumulací riboflavinu vysílají tyto lymfocyty protizánětlivé cytokininy a tím ještě zhoršují jejich stav (*ibid.*).

### 1.1.3 Smrtné následky onemocnění

Pokud dochází k úhynu v důsledku WNS, je to podle jedné z hlavních hypotéz připisováno hlavně častějšímu probouzení netopýrů ze strnulosti během období hibernace, které je pro netopýry nesmírně energeticky náročné (Reeder et al. 2012). Četnější probouzení vedou k předčasnému spotřebování tukových zásob a smrti z vyčerpání (Warnecke et al. 2012). Otázkou je, co všechno se na zvýšené frekvenci probouzení může podílet. Plíseň závažně narušuje povrch křídelní membrány, ta hraje klíčovou roli v termoregulaci, výměně plynů s okolním prostředím, hospodaření s vodou tělesných tekutin a v imunitních funkcích (Warnecke et al. 2013). Vědci se domnívali, že by se netopýři ze spánku mohli budit kvůli podráždění napadené kůže a potřebě o pokožku pečovat (Warnecke et al. 2012). V lézích se však neobjevuje zánětlivá reakce (Meteyer et al. 2009), která by pudila k větší pozornosti ohledně péče o invadovanou pokožku a ani při experimentech nebyl pozorován nárůst takového chování (Wilcox et al. 2014; Bohn et al. 2016). Je možné, že k vyvolávání probouzení přispívají nějakým způsobem vysoké hladiny riboflavinu v lézích, které významně poškozují kůži (Flieger et al. 2016). Předpokládá se, že přes narušený povrch křídla dochází ke zvýšenému vypařování vody a netopýr se budí kvůli silné dehydrataci (Cryan et al. 2010, 2013). Některé výzkumy ale tuto hypotézu nepotvrzují. Carey a Boyles (2015) při zkoumání nakažených netopýrů zvýšenou ztrátu vody neprokázali. Také při pozorování chování netopýrů v průběhu bdělého stavu mezi dobami strnulosti nebyl zaznamenán zvýšený zájem o doplňování vody pitím (Wilcox et al. 2014; Bohn et al. 2016).

Zajímavým zjištěním je, že WNS nemocné jedince energeticky vyčerpává už v raných fázích onemocnění, kdy ještě nedochází k četnějšímu probouzení oproti zdravým netopýrům (Verant et al. 2014). Spotřeba energie tu může být až dvojnásobná. Nakažení netopýři se zřejmě musí vyrovnávat s komplexními fyziologickými dopady WNS, které mohou souviset například se zvýšenými nároky na termoregulaci způsobenými inhibicí periferní vazokonstrikce v křídlech či zjištěnou chronickou respirační acidózou vyznačující se nadměrným zvýšením  $\text{CO}_2$  v krvi (Warnecke et al. 2013; Verant et al. 2014). Acidóza by pak mohla být ještě další příčinou k častějšímu probouzení v pokročilých fázích onemocnění, která nutí netopýry dýcháním zredukovat obsah  $\text{CO}_2$  v krvi a pokud možno vrátit pH krve do normálu (*ibid.*).



Pozornost se zaměřovala také na průběh pravidelných probouzení ze strnulého stavu. Bylo zjištěno, že délka doby, po kterou je nakažený netopýr vzhůru, neliší od zdravých jedinců (Warnecke et al. 2012; Brownlee-Bouboulis a Reeder 2013). Rozdílná je hlavně frekvence probouzení (*ibid.*). Sledovány jsou činnosti, kterým se netopýr věnuje v průběhu bdělého stavu a které mohou ovlivňovat spotřebu energie. Poslední experimenty naznačují, že netopýři se snaží kompenzovat energetické výdaje spojené s chorobou tím, že omezují aktivitu při probuzení (Wilcox et al. 2014; Bohn et al. 2016). Byly ovšem prezentovány i opačné výsledky, tedy že netopýři věnovali větší úsilí v péči o pokožku na úkor odpočinku (Brownlee-Bouboulis a Reeder 2013). Postupný rozvoj onemocnění je dále doprovázen přesuny netopýřů s tendencí ke snižování počtu jedinců ve skupinách (Wilcox et al. 2014), čemuž bude ještě věnována samostatná kapitola.

Zatímco v Evropě ani Asii nebyla zaznamenána zvýšená úmrtnost a WNS je tu tolerován (např. Martínková et al. 2010; Pikula et al. 2012; Zukal et al. 2016a), severoamerické populace netopýřů tato choroba decimuje (např. Frick et al. 2010; Warnecke et al. 2013). Úmrtnost se objevuje v druhé polovině období hibernace a vrcholí v březnu (Lorch et al. 2011). Nalézaná těla mrtvých netopýřů jsou typicky vyzáblá (Warnecke et al. 2012). Dosud zcela nevíme, co umožňuje evropským a asijským netopýřům přežití infekce *Pd* (Bandouchová et al. 2015). Pokud budeme zohledňovat hloubku lézí, je onemocnění v intenzitě srovnatelné se severoamerickými netopýři (Bandouchová et al. 2015; Zukal et al. 2016a). Zároveň však u nich nebyly registrovány žádné změny v chování ani častější probouzení, se kterým se setkáváme u severoamerických netopýřů (Zukal et al. 2016b). Je možné, že mezikontinentální rozdíly tkví v celkové ploše poškozeného křídla, která je u severoamerických větší (Flieger et al. 2016). Existuje také hypotéza, která vychází z rozdílnosti zatížení ektoparazity u netopýřů na obou kontinentech. V Evropě jsou netopýři populace mnohem více zamořené ektoparazitickými roztoči (Horáček et al. 2014). Parazité způsobují svým hostitelům stres. Dochází k narušení kůže a po probuzení jsou netopýři více aktivní v péči o pokožku na úkor odpočinku. Evropští netopýři mohou být tedy mnohem více adaptovaní na napadení kůže i jinými činiteli a jsou možná méně náchylní na rušení ze spánku (*ibid.*).

Pozitivním poznatkem je, že ze šesti druhů severoamerických netopýřů, kteří z počátku objevení WNS v Severní Americe čelily drastickým populačním poklesům, se někteří z nich v populačních stavech začínají stabilizovat (Langwig et al. 2012; Frick et

al. 2015). Byly pozorovány nenarušené vzorce spánku, kdy se nakažení netopýři neprobouzeli více často než je obvyklé u zdravých jedinců (Lilley et al. 2016). Některé další výzkumy odhalují vývoj tolerance či dokonce rezistence určitých druhů k WNS (Frick et al. 2016; Langwig et al. 2017). U všech druhů však takovéto pozitivní tendence ve snášenlivosti onemocnění nejsou zaznamenány. Největší dopady má WNS na druh *Myotis septentrionalis*, který zmizel během 4 let z většiny lokalit a blíží se vymření (Langwig et al. 2012, 2015; Frick et al. 2015).

#### 1.1.4 Způsoby diagnostikování WNS a zjišťování intenzity

Existuje více možností jak diagnostikovat WNS či zjišťovat závažnost onemocnění. Tyto metody se liší v různých směrech, například v pravděpodobnosti detekce WNS, rychlosti provedení, využitelnosti v terénu, v dopadech na zkoumané zvíře a podobně. Používanými metodami jsou čistě vizuální diagnostika (Janicki et al. 2015), histopatologické vyšetření (Meteyer et al. 2009), použití fluorescence prostřednictvím UV záření (Turner et al. 2014), metody PCR (Muller et al. 2013; Shuey et al. 2014) či hodnocení z odběru krve (zjišťování množství sodíku či CO<sub>2</sub> v krvi) (Warnecke et al. 2013).

Za standardní a nejvíce směrodatnou metodu na prokázání WNS je považováno histopatologické vyšetření (Meteyer et al. 2009). Kožní membrána křídla se při něm zkoumá mikroskopicky. Hledají se hyfy a konidie *Pd* specifického vzhledu a typické miskovité útvary naplněné hyfami (tzv. „cup-like erosions“) (*ibid.*). Problém této metody však dlouho spočíval ve velkém množství tkáně, které je na vyšetření potřeba (obzvláště je-li onemocnění méně intenzivní). Tímto způsobem se mohlo zkoumat buď už mrtvé tělo zvířete, nebo bylo nutné řízené usmrcení. Dnes už se používá tato metoda



**Obr. 1:** Podsvícení křidel UV lampou pro zjištění diagnostických lézí WNS (foto: vlastní archiv)

v kombinaci s alternativním způsobem diagnostiky a tím je použití prosvěcování UV světlem (obr. 1), které pomůže určit místo, kde se tkáň může odebrat (výřez o velikosti  $3 \times 3$  mm). (Turner et al. 2014). Při prorůstání živou tkání totiž *Pd* uvolňuje do okolí různé enzymy a metabolity mezi nimiž je i riboflavin (vitamín B<sub>2</sub>) a právě ten má fluorescenční vlastnosti. Na poškozené kožní membráně osvětlené UV lampou jsou patrné oranžově svítící body, místa prorůstání plísně, diagnostické léze. Spočtením těchto bodů či měřením velikosti lézí lze kvantifikovat intenzitu WNS. Obdobná fluorescence nebyla prokázána po činnosti jiných mikroorganismů přicházejících s netopýry do styku, neměla by tudíž hrozit záměna (Flieger et al. 2016). Nespornou výhodou této metody je její snadná a rychlá použitelnost rovnou v terénu. K přesnému zjištění počtu lézí je však nevhodnější pořídít v terénu fotografie prosvícené kůže a počítat léze na počítači při větším zvětšení (Turner et al. 2014).

Ze začátku terénních průzkumů WNS na zimovištích se hodně využívala čistě vizuální kontrola, je to ten nejjednodušší způsob. Nevědělo se však, v jaké míře viditelný porost plísně odpovídá reálnému stavu WNS. Dnes už je známo, že onemocnění může probíhat do valné části krypticky, bez zřetelnějších viditelných známek porostů *Pd* (Janicki et al. 2015). Z výzkumů na severoamerických netopýrech vyplynulo, že úspěšnost vizuální detekce WNS se liší mezidruhově. U některých druhů nelze využít vůbec, u jiných oproti tomu celkem spolehlivě (*ibid.*). Rizikem je dále možná záměna s nově objevenou dermatofytickou plísní *Trichophyton redellii*, která tvoří na netopýrech bílý povlak podobný *P. destructans* (Janicki et al. 2015; Lorch et al. 2015).

Pro kvantifikaci přítomného porostu *Pd* na netopýrovi lze použít kvantitativní polymerázovou řetězovou reakci (qPCR). Ta poskytuje údaje o množství DNA plísně, tzv. zátěži, na určité standardizované ploše pokožky netopýra získané stěrem (z předloktí, celého křídla, čenichu) (McGuire et al. 2016). Bylo ověřeno, že zátěž plísně koreluje s intenzitou WNS (Zukal et al. 2016a). Výhodou PCR metody je, že spolehlivě detekuje i malé množství přítomné *Pd*. To ale může být ve fázi, kdy ještě nemusel propuknout WNS, i když se dá uvažovat o jakémsi preiniciačním stádiu nemoci (McGuire et al. 2016). Hranice, kdy se zátěž *Pd* jako dermatofytu překlene k invazi do živé tkáně netopýrů, není ovšem známá (Zukal et al. 2016a). Metoda qPCR a prosvěcování UV světlem byly použity pro získání dat pro tuto práci.

## 1.2 Tvorba agregací netopýrů při hibernaci

Hibernace neboli zimní spánek je reakce živočichů na nepříznivé podmínky prostředí v zimním období. Je podmiňována heterotermií, což je schopnost aktivně regulovat svoji tělesnou teplotu tak, aby byly energetické náklady co nejmenší. Netopýři během hibernace sníží svůj metabolismus na pouhých 5 % bazálního metabolismu při stavu za běžných podmínek. Tělesná teplota se liší o 1–2 °C od okolního prostředí, čímž se sníží energetické náklady jinak spojené se ztrátou tělesného tepla do okolí (Geiser 2004; Altringham 2011). Snižuje se tep, zpomalí se dýchání, klesá příjem kyslíku. Zimní spánek může být dlouhý 6–8 měsíců (Webb et al. 1996). Netopýři nejsou ve strnulém stavu nepřetržitě po celou hibernaci, ale pravidelně se probouzí. Za celé období spánku to může být přibližně 5–15krát (Průcha a Hanzal 1989) na 1–2 hodiny (Brownlee-Bouboulis et al. 2013). Znovuobnovení metabolismu a navýšení tělesné teploty při probouzení je pro netopýry velice energeticky náročné, ale z ne úplně objasněných důvodů potřebné (Boyles et al. 2006). Během doby spánku jsou snížené imunitní funkce (Bouma et al. 2010). Při strnulém stavu je počet cirkulujících leukocytů v krvi snížen přibližně o 90 %. V období mezi strnulostmi se jejich množství v porovnání se stavem mimo hibernaci obnovuje pouze částečně (*ibid.*). Vzhledem k náročným podmínkám hibernace netopýři specificky volí určité strategie svého chování, volí si ke spánku v zimovišti místa vhodných teplotních a vlhkostních podmínek a také mohou tvořit skupiny s ostatními netopýry.

### 1.2.1 Hibernační strategie a výhody zimních agregací

Ohledně strategií při hibernaci rozlišujeme druhově specifické chování netopýrů, kdy mohou jedinci zimovat soliterně, volně visící na stěně zimoviště, schovávat se do puklin, shromažďovat se do těsných skupin nebo tyto možnosti různě kombinovat. Své chování uzpůsobují mikroklimatickým podmínkám na zimovišti (hlavní faktory jsou teplota a vlhkost) a stavu svých tukových zásob. Netopýr si výběrem teploty místa určuje i rychlost svého metabolismu, potažmo spotřebu energie (Boyles et al. 2007). Metabolismus se více zpomaluje v nižších teplotách. Netopýr v dobré kondici si tedy může dovolit vyšší teploty okolního prostředí (*ibid.*). Pokud se stav netopýra či okolní podmínky změní, může se zvíře přesunout během pravidelných probouzení ať už v rámci zimoviště (např. Daan 1973; Hanzal a Průcha 1988) či dokonce mezi zimovišti na vhodnější místo (Twente 1955; Boyles a Brack 2009).

Typickým rysem chování některých druhů netopýrů je tvoření skupin, agregací při hibernaci. Skupiny mohou být složením druhově jednotné i smíšené a může tu hrát roli sociální aspekt nebo potřeba páření (Daan 1973; Thomas et al. 1979). Početnost ve skupině je proměnlivá. S postupem zimy počet jedinců v agregacích stoupá (Průcha a Hanzal 1988; Boratynski et al. 2012). Početnost jedinců v agregacích vrcholí zhruba uprostřed zimy (Boratynski et al. 2012). Koncem zimního období se zvyšují přesuny netopýrů (Daan 1973) a poměr jedinců v agregacích se postupně snižuje (Boratynski et al. 2012).

Seskupování je behaviorální jev, který má významné fyziologické a ekologické důsledky pro přezimující jedince. Netopýři zřejmě v agregaci udržují stabilnější teplotu, což jim umožňuje omezovat spotřebu energie (Brown 1999; Boyles et al. 2008). Ve strnulém stavu je jádro skupiny chráněno před možným prouděním teplejšího vzduchu (Twente 1955), naopak při probouzení se v případě synchronizace mohou vzájemně zahřívát (Boyles et al. 2008; Boratynski et al. 2012; Czenze et al. 2013). Například podle výzkumu Browna (1999) jedinci ve skupině při probuzení spotřebovali méně kyslíku a ztráceli méně tepla do okolí v porovnání s těmi solitérními. Další výhodou těsných seskupení může být snížení ztrát vody vypařováním (Boratynski et al. 2012). Bylo sledováno, že se snižující se vlhkostí prostředí zimoviště narůstal počet jedinců v agregacích (*ibid.*). Tvoření už i malých agregací netopýrů v prostředí zimoviště, které nepodléhá žádným rušivým elementům, může výrazně přispět k vyšší pravděpodobnosti přežití hibernujících netopýrů (Twente 1955; Brown 1999; Boyles a Brack 2009).

Utváření agregací při hibernaci může mít také svá rizika. Netopýři se v těsné skupině mohou navzájem rušit a podněcovat k energeticky náročnému probouzení. Vzájemný zvýšený kontakt netopýrů ve skupině dále usnadňuje přenos infekčních chorob a parazitů (Horáček et al. 2014; Lučan et al. 2016). Severoameričtí netopýři na svých zimovištích vytvářejí obrovské kolonie čítající stovky až tisíce jedinců. Vzájemný kontakt je tedy výrazně častější než u netopýrů palearktu, kteří tvoří daleko menší seskupení (Wibbelt et al. 2010) (obr. 2). Je možné, že se strategie tvorby agregací u severoamerických populací stala s objevením WNS značně nevýhodnou (Wibbelt et al. 2010; Turner et al. 2015).

### 1.2.2 Tvorba agregací v souvislosti s WNS

Když se zkoumaly společné vlastnosti druhů netopýrů náchylných na vznik WNS v důsledku napadení *Pd*, nebyla tvorba agregací pro onemocnění syndromem určující. Patogenní plíseň *P. destructans* se jeví jako generalista, protože napadá netopýry napříč jejich ekologiemi a hibernačními strategiemi (Zukal et al. 2014). Je však zřejmé, že ačkoli shlukování netopýrů WNS přímo nepodmiňuje, může značně podporovat intenzitu jeho působení.

Agregace netopýrů mohou hrát významnou roli v přenosu onemocnění. Spory *Pd* jsou adhezivní a také poměrně velké a těžké (Gargas et al. 2009). Proto se jen stěží budou šířit vzduchem. Přenos *Pd* je zřejmě závislý na kontaktu (Lorch et al. 2011). Je to jednak kontakt se stěnami zimoviště, která slouží jako pasivní rezervoár spor plísně (Puechmaille et al. 2011), a samozřejmě kontakt mezi netopýry samými (Langwig et al. 2015). Přenos mezi netopýry se přitom děje bez ohledu na velikost populace (Langwig et al. 2012). V Severní Americe jsou nejvíce postiženy populace druhů tvořících na zimovištích velké skupiny, kdežto u soliterně zimujících druhů jsou dopady WNS podstatně menší (*ibid.*). Existují dále doklady o změně chování nakažených netopýrů, kteří upouští od tvorby agregací (Langwig et al. 2012; Wilcox et al. 2014). Izolace může



**Obr. 2:** Agregace netopýra velkého (*Myotis myotis*) s viditelnými povlaky plísně *P. destructans* (foto: vlastní archiv)

mít adaptivní charakter, kdy se relativně zdraví jedinci chrání před nakažením, nebo dochází ke stranění se nemocných, aby neohrozili ostatní (Wilcox et al. 2014). Netopýři se v těsných skupinách mohou také navzájem rušit. Při probuzení jednoho zvířete se vyvolá v rámci skupiny kaskáda probouzení okolních jedinců. Jindy nejen z energetického hlediska výhodné seskupení pak může působit právě opačně, energeticky netopýry více vyčerpává a je tzv. maladaptivní (Czenze et al. 2013; Turner et al. 2015).

Teoreticky by mohlo tvoření agregací přispívat v šíření netopýřích ektoparazitů, kteří mají v souvislosti s WNS potencionálně dvojí roli. Možné je šíření plísňe a jejích konidií na tělech ektoparazitů. Druhou možnou rolí je napomáhání vstupu houbových hyf *Pd* do pokožky skrze parazity narušená místa (Lučan et al. 2016).

Před objevením WNS v Severní Americe netopýři zimovali v obrovských skupinách po stovkách až tisících (Wibbelt et al. 2010). Ve vývoji tamějších populací netopýřů je v současné době sledována tendence ke snižování počtu jedinců v agregacích, které se tak přibližují evropským poměrům (Frick et al. 2015). Pokud je tento vztah mezi velikostí agregací a intenzitou onemocnění platný, měli by být soliterně zimující jedinci méně postiženi než ty ve shlucích. Ověření této hypotézy je jedním z cílů mé práce. V Evropě už byla zkoumána souvislost mezi velikostmi agregací a prevalencí vizuálně zjištělého výskytu *Pd* na netopýrech, kde však nebyl prokázán signifikantní vliv (Horáček et al. 2014). Vizuelně znatelný porost plísňe je ale jako známka onemocnění jen málo spolehlivý a nevypovídá o reálném rozsahu onemocnění. Za použití metod prosvěcování UV světlem či qPCR, které použiji v této práci, se může dosáhnout přesnějších výsledků.

## 2 Cíle práce

Je pravděpodobné, že v přenosu původce WNS hraje velkou roli vzájemný kontakt mezi netopýry, který je podporován tvorbou agregací při hibernaci. Proto jsem se ve své práci rozhodla na agregace netopýrů zaměřit. Cíle práce bych shrnula do následujících bodů:

- 1) Zhotovit databázi zahrnující počty netopýrů hibernujících v agregacích a mimo ně na vybraných zimovištích ČR
- 2) Zjistit zda přítomnost původce onemocnění (úroveň zatížení porostem  $Pd$ , tzv. „fungal load“) a intenzita onemocnění (počty WNS lézí) souvisí s agregováním netopýrů
- 3) Stanovit vztahy mezi třemi metodami hodnocení intenzity WNS: (1) vizuální kategorizací WNS, (2) zatížením porosty  $Pd$  a (3) počtem WNS lézí
- 4) Porovnat četnosti agregací na odlišných typech zimovišť (přirozená jeskynní zimoviště oproti starým důlním dílům).

Lze předpokládat, že netopýři zimující ve skupině budou intenzivněji postiženi WNS oproti jedincům zimujícím soliterně a budou mít na pokožce větší množství  $Pd$  díky snadnějšímu kontaktnímu přenosu spor mezi agregujícími jedinci. Dále je předpokladem, že se bude lišit poměr netopýrů zimujících v agregacích mezi odlišnými typy zimovišť, kvůli jejich rozdílnému mikroklimatickému charakteru.



## 3 Materiál a metody

### 3.1 Kvantifikace intenzity WNS a zjišťování množství *Pd* u netopýrů na vybraných zimovištích

Data o intenzitě onemocnění a množství *Pd* byla získávána v průběhu března a dubna roku 2015 a 2016 na 17 zimovištích ČR převážně z oblasti Jizerských hor a Jeseníků. Zkontrolováno bylo celkem 154 netopýrů. Druhově se jednalo hlavně o netopýra velkého (*Myotis myotis*) (147 jedinců), který je u nás nejvíce postihován WNS (Horáček et al. 2014, Zukal et al. 2014), sedmi jedinci byl zastoupen netopýr brvitý (*Myotis emarginatus*). U netopýrů bylo zaznamenáváno pohlaví (samec/samice), věk (adultní / subadultní jedinec), přítomnost v agregaci nebo mimo ni (v agregaci/samostatně) a typ zimoviště (jeskyně/štola). Přítomnost *Pd* a intenzita WNS byly zjišťovány třemi způsoby: (1) vizuálně, (2) pomocí stěru z levého křídla a následné analýzy prostřednictvím kvantitativní PCR (qPCR) a (3) pomocí prosvěcování UV světlem a spočtením lézí.

(1) K vizuálnímu hodnocení byla použita stupnice 0–3 (obdobně jako u práce Horáčka et al. (2014): 0 – žádný viditelný porost plísně, 1 – mírný porost, lehce rozptýlený na malé části těla, 2 – střední zasažení plísní, zřetelnější mycelia zejména v oblasti čenichu, 3 – velké plochy s povlakem plísně, na více částech těla.

(2) K analýze pomocí qPCR byl od každého netopýra pořízen stěr z plochy dorzální strany levého křídla. Konečným výsledkem analýzy byly údaje o množství DNA *Pd* v  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  plochy křídla (tzv. „fungal load“, zátěž *Pd*) vypočítané podle vzorce, který zahrnuje druhově specifickou plochu křídla podle Norberga a Raynera (1987). Analýza qPCR byla provedena způsobem, který je detailněji popsán v práci Zukala et al. (2016a). Kvantifikace DNA se měřila během 43 cyklů. Koncentrace DNA byla odvozena od kalibrační křivky zhotovené pomocí analýzy kontrolní kultury CCF3937 a vypočítána podle vzorečku ( $q_{PdDNA}$ ) =  $3.194 - 0,287 C_p$  ( $R^2 = 0,9719$ ), kde  $q$  je koncentrace DNA a  $C_p$  daný cyklus (*ibid.*). Při analýze qPCR byly ke zjištění *Pd* použity specifické primery (Shuey et al. 2014).

(3) K prosvěcování křídel UV světlem byla použita metodika, kterou vytvořili Turner et al. (2016). Kožní membrána netopýra byla přikládána na UV lampu s vlnovou délkou záření 368 nm (obr. 3). Byly pořízeny vždy 3 fotografie pod UV světlem ke

každému jedinci: záběr pravého křídla, levého křídla a uropatagia. Při práci bylo nutné použít brýle s UV filtrem. K fotografování byly použity přístroje Canon PowerShot G9 a PENTAX K-r. Fotografovalo se na dlouhou expozici se stativem. Oranžově zářící léze jsem pak počítala v několikanásobném zvětšení na počítači (obr. 4).

Protože byla k datům sbíraným v terénu přímo za účelem této práce přidávána ještě další data z jiných výzkumů, v databázi nejsou zahrnuty pro všechny netopýry všechny proměnné. Z celkového počtu 154 netopýrů ze vzorku byl u všech z nich proveden sěr na analýzu qPCR i vizuální hodnocení WNS. Pohlaví a věk jsou známy u 150 jedinců. Prosvěcování UV světlem za účelem spočtení WNS lézí se provedlo u všech netopýrů, ale na jedné lokalitě bez zahrnutí uropatagia (u 35 jedinců).



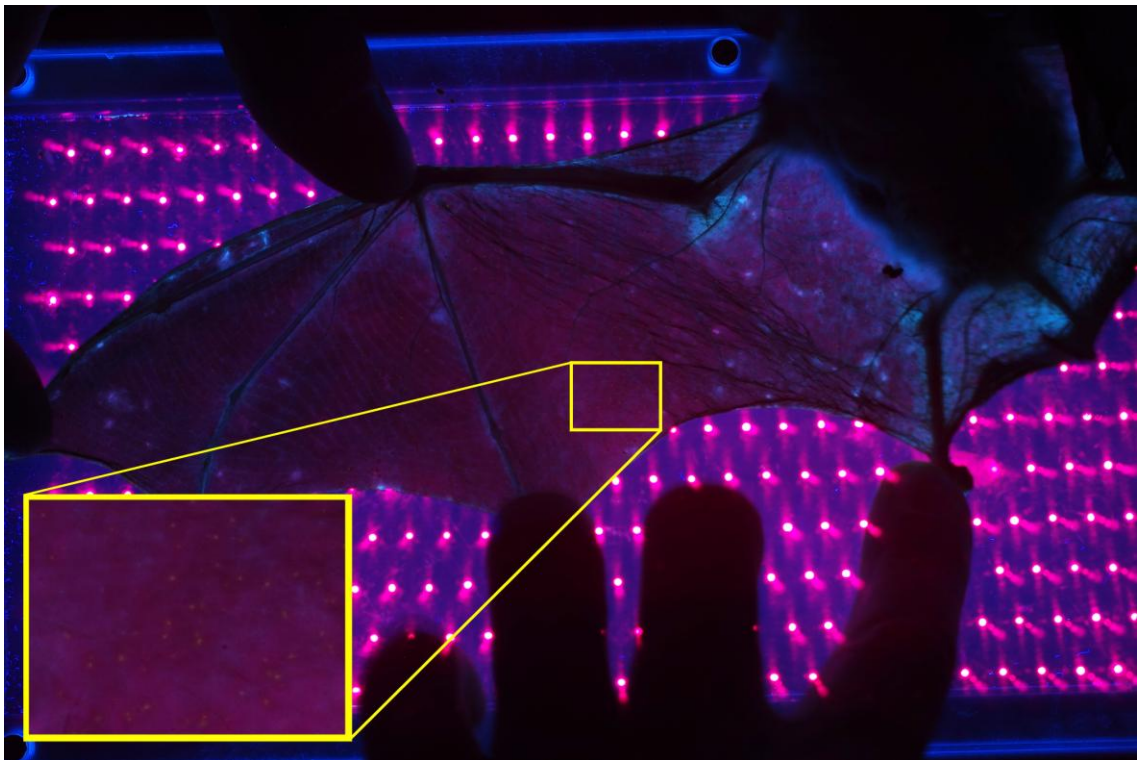
**Obr. 3:** Focení křídel netopýrů za využití podsvícení UV lampou v Májových jeskyních (foto: Jiří Šafář)

### 3.2 Agregace netopýrů na zimovištích

Po řadu let si někteří sčítatelé z České společnosti pro ochranu netopýrů (ČESON) zaznamenávali při každoročních sčítáních netopýrů na zimovištích i počty jedinců zastihnutých při zimování v agregaci. Informace o tvorbě agregací na českých zimovištích ale zůstávaly neucelené a bez využití. Pro účely této práce jsem shromáždila údaje o agregacích netopýrů z let 2012–2016 na celkem 36 českých

významných regionálních zimovištích netopýra velkého (*Myotis myotis*). Jsou to záznamy pořízené v rámci zimních sčítání, která probíhala během prosince až března. Vzniklá databáze agregací obsahuje název zimoviště, jeho typ (jeskyně/štola), datum kontroly, počty jedinců v jednotlivých agregacích (tj. skupina 2 a více zvířat) rozdělených podle druhů a celkový počet netopýrů na zimovišti podle druhu. Pro jednotlivé druhy jsem vypočítala podíl jedinců, kteří při dané kontrole zimovali v agregacích (tj. počet agregujících jedinců ku celkovému počtu netopýrů daného druhu na zimovišti). Získané hodnoty u každého zimoviště jsem následně průměrovala, abych dostala průměrný podíl netopýrů v agregacích pro jednotlivá zimoviště.

Z druhů jsou v databázi zastoupeny především netopýr velký (*Myotis myotis*) (442 zaznamenaných agregací), dále netopýr brvitý (*Myotis emarginatus*) (159 agregací), netopýr černý (*Barbastella barbastellus*) (25 agregací), netopýr vodní (*Myotis daubentonii*) (11 agregací) a netopýr Brandtův (*Myotis brandtii*) (9 agregací).



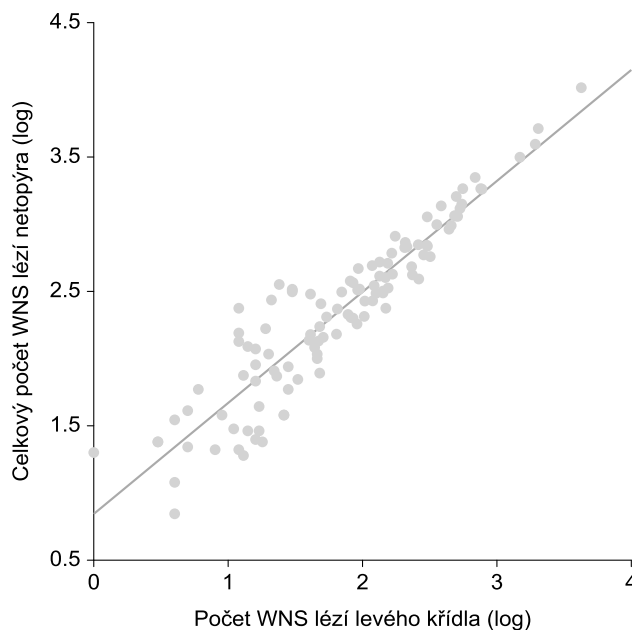
**Obr. 4:** Ve zvětšení patrné oranžově fluoreskující léze u levého křídla podsvíceného UV světlem (foto: vlastní archiv)

### 3.3 Statistické zpracování dat

#### 3.3.1 WNS léze a množství *Pd*

Před statistickým zpracováním data prošla následujícími úpravami. Rozložení počtu lézí u netopýrů bylo výrazně kladně zešikmené, proto jsem je transformovala logaritmickou transformací, abych dosáhla normálního rozdělení. Také výsledky z qPCR (množství DNA *Pd* na  $\text{cm}^2$  křídla neboli zátěž *Pd*), které jsem měla k dispozici přepočítané na plochu křídla, nevykazovaly normální rozdělení. Na tato data jsem aplikovala Box-coxovu transformaci.

Pomocí Pearsonovy korelace jsem dále ověřovala, zda odpovídá počet lézí levého křídla celkovému počtu lézí u netopýra. Tím jsem se zabývala mimo jiné z toho důvodu, že stěry ke zjištění množství DNA *Pd* (pro qPCR) byly pořízeny právě z plochy pouze levého křídla. Zjistila jsem pozitivní korelaci v počtu lézí celého těla a levého křídla ( $r=0,94$ ;  $P<0,001$ ) (obr. 5). To do jisté míry potvrzuje, že mohu qPCR analyzované stěry z levého křídla (zátěž *Pd*) i počty lézí pouze z levého křídla reprezentativně vztahovat na celého netopýra. Lineárním modelem jsem také zjišťovala, jak je těsný vztah mezi počtem lézí levého křídla a zátěží *Pd* na  $\text{cm}^2$  levého křídla. K určení míry korelace jsem využila Pearsonův korelační koeficient ( $r$ ).



**Obr. 5:** Vztah celkového počtu WNS lézí netopýra a počtu WNS lézí levého křídla. Celkový počet WNS lézí pozitivně koreluje s počtem na levém křídle

Hodnotila jsem dále úspěšnost vizuální detekce WNS. Zjišťovala jsem, zda se netopýři zařazení do 4 předdefinovaných kategorií vizuálního hodnocení od sebe průkazně odlišují v počtu zjištěných WNS lézí a v množství *Pd* zjištěném na pokožce křídla. K testování jsem použila ANOVu s post-hoc Tukey-Kramerovým testem.

Pro dvě hlavní závisle proměnné (celkový počet WNS lézí a zátěž *Pd*) jsem po jejich transformování (viz výše) sestavila dva modely GLM: 1) pro závisle proměnnou „počet WNS lézí“ s faktory: typ zimoviště, věk, pohlaví, přítomnost v agregaci a kovariátou proměnné průměrného podílu agregovaných netopýřů na zimovišti, 2) pro závisle proměnnou „množství *Pd*“ se stejnými faktory i kovariátou. Z modelů jsem postupně odebírala nesignifikanční faktory, až zůstaly jen ty, které nejvíce vysvětlovaly variabilitu sledované závisle proměnné. U faktorů se signifikantním vztahem k dané závisle proměnné jsem následně testovala rozdíl mezi kategoriemi pomocí t-testu. Speciální pozornost jsem věnovala proměnné přítomnost netopýra v agregaci, jakožto hlavnímu předmětu zkoumání této práce.

### 3.3.2 Tvorba agregací netopýřů na zimovištích

V databázi agregací jsem vytvořila kromě podílu agregujících jedinců na zimovišti (viz výše kap. 3.2) i další dvě proměnné, a to průměrná velikost agregace a největší velikost agregace na zimovišti. Tyto dvě proměnné neodpovídaly normálnímu rozdělení, proto jsem je transformovala a odebrala jednu průkazně odlehlou hodnotu (na největší velikost agregace jsem použila logaritmickou transformaci a na průměrnou velikost agregace odmocninovou transformaci).

Pomocí dvouvýběrového t-testu jsem zjišťovala vliv faktoru typ zimoviště na tvorbu agregací. Před provedením testu jsem vybírala vhodné proměnné z těch, co jsem vytvořila dříve a které nějakým způsobem kvantifikují tvorbu agregací na zimovišti. Pro přehled o vztazích jednotlivých proměnných jsem vytvořila korelační matici s využitím Pearsonova korelačního koeficientu ( $r$ ). Do matice jsem zahrнула tři výše zmiňované proměnné týkající se agregací. Proměnné největší velikost agregace a průměrná velikost agregace spolu korelovaly ( $r=0,82$ ;  $P<0,001$ ), proto jsem pro t-test zvolila zástupnou proměnnou těchto dvou, a to průměrnou velikost agregace. Dále jsem použila také proměnnou průměrný podíl netopýřů v agregacích. Ta totiž nekorelovala s největší velikostí agregace ( $r=0,04$ ;  $P=0,817$ ) ani s průměrným počtem jedinců v agregacích ( $r=0,00$ ;  $P=0,981$ ).

U zmiňovaných testů jsem zohledňovala 5% hranici hladiny významnosti. Pro všechny výše uvedené testy a úpravy dat jsem využila programů Microsoft Office Excel 2007 a NCSS 2009.

## 4 Výsledky

### 4.1 Intenzita WNS a množství *Pd*

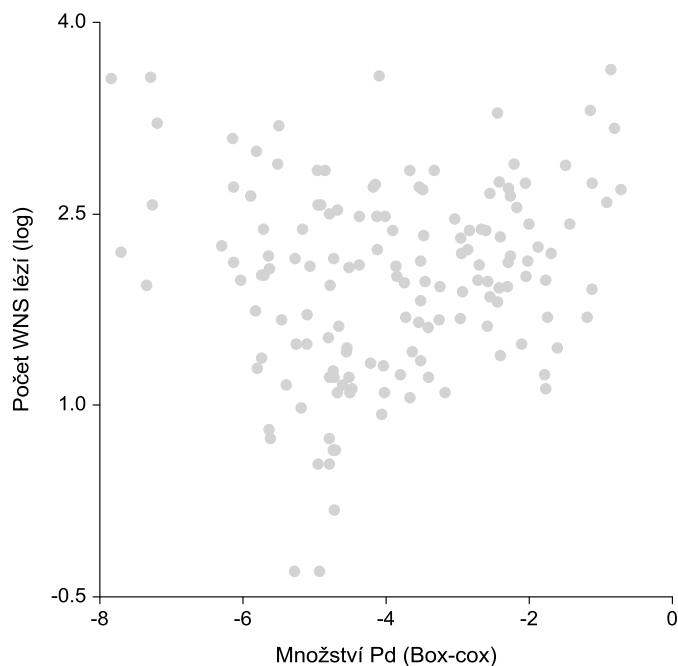
#### 4.1.1 Vztah mezi počtem lézí a množstvím *Pd*

Fotografie netopýřích křídel, které sloužily ke spočítání WNS lézí, byly pořizovány za velice náročných podmínek. Proto se u všech jedinců ( $n=154$ ) nepodařilo zachytit všechny snímky tak, aby byly léze jasně spočítatelné. U pěti netopýřů nebylo možné zaznamenat počet lézí. Prokázala jsem, že počet lézí levého křídla koreluje s celkovým počtem lézí (tj. obě křídla a uropatagium) ( $r=0,93$ ;  $P<0,001$ ) (obr. 5).

Počet lézí levého křídla a množství *Pd* vztažené na  $\text{cm}^2$  křídla (tzv. „fungal load“) spolu nekorelují ( $r=0,13$ ;  $P=0,122$ ) (obr. 6).

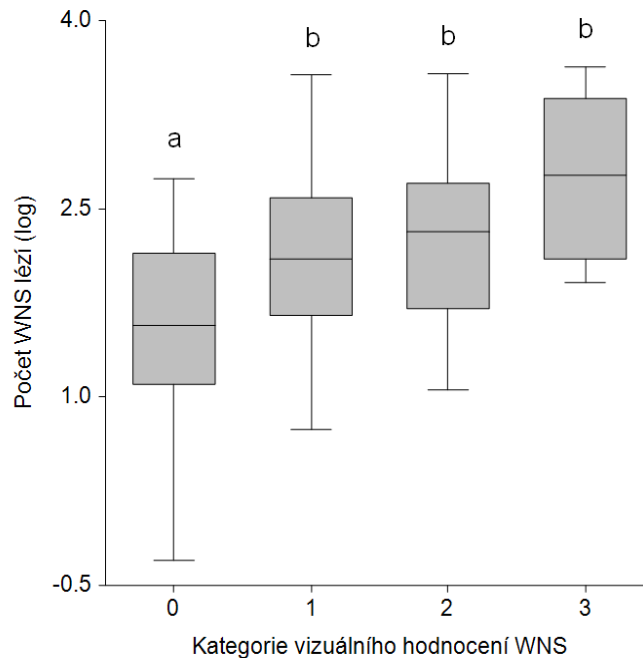
#### 4.1.2 Vizuální diagnostika WNS

V datech nasbíraných pro tuto práci nebyl žádný netopýř považován na základě vizuální diagnostiky WNS za falešně pozitivního. To znamená, že u všech netopýřů vizuálně zařazených do kategorií 1–3 (s výskytem viditelného porostu plísně) byla prokázána

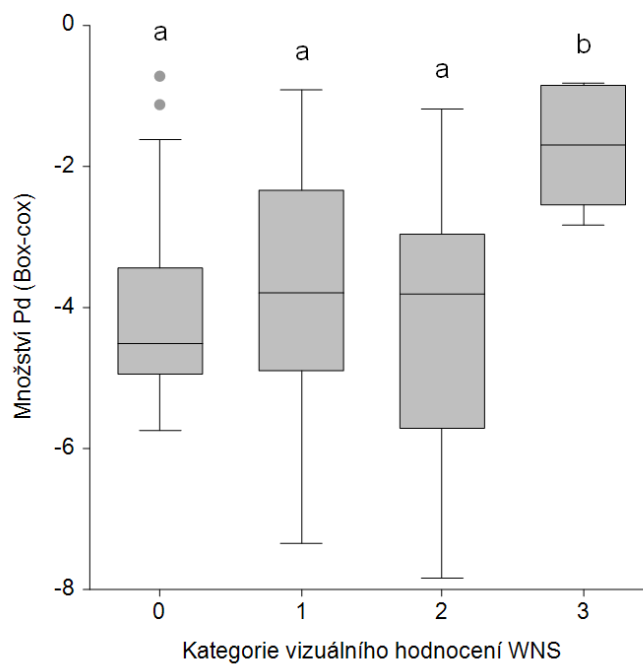


**Obr. 6:** Vztah počtu WNS lézí (levé křídlo) a množství *Pd* na  $\text{cm}^2$  levého křídla (tzv. „fungal load“). Počet WNS lézí na množství *Pd* nezávisí

přítomnost *Pd* a výskyt WNS lézí. Celkem 32 % netopýrů pak bylo hodnoceno kategorií 0 jako falešně negativní, tj. nejevilo pouhým okem viditelné známky onemocnění, přestože u nich byla zjištěna *Pd*. Z pohledu WNS lézí bylo falešně negativních výsledků 31 %. Pouze u jediného netopýra, který dle vizuálního hodnocení



**Obr. 7:** Počty WNS lézí netopýrů u jednotlivých kategoriích vizuálního hodnocení WNS. Kategorie 0 se statisticky významně odlišuje od ostatních



**Obr. 8:** Množství *Pd* na  $\text{cm}^2$  křídla (tzv. „fungal load“) u jednotlivých kategoriích vizuálního hodnocení WNS. Kategorie 3 se statisticky významně odlišuje od ostatních



náležel do kategorie 0 (bez viditelného porostu plísně), se sice prokázala přítomnost *Pd*, ale žádné WNS léze nalezeny nebyly.

Kategorie vizuálního zhodnocení stupně WNS (0–3) se signifikantně odlišují v počtu WNS lézí ( $F=12,39$ ;  $P<0,001$ ). Nejméně lézí mají netopýři zařazení do kategorie 0, která se průkazně odlišuje od kategorií 1–3, které se mezi sebou signifikantně neliší, ačkoli je z grafu patrná vzestupná tendence (obr. 7). Pro jednotlivé kategorie vizuálního hodnocení byly zjištěny mediány počtu WNS lézí levého křídla: kategorie 0 (36,5); kat. 1 (124); kat. 2 (207); kat. 3 (857,5). Stupně vizuálního hodnocení se signifikantně liší v závislosti na množství *Pd* u netopýra ( $F=4,78$ ;  $P=0,003$ ). V tomto případě se průkazně odlišuje kategorie 3 (netopýři s největším počtem lézí) od kategorií 0–2, které vzájemně rozlišené nejsou (obr. 8).

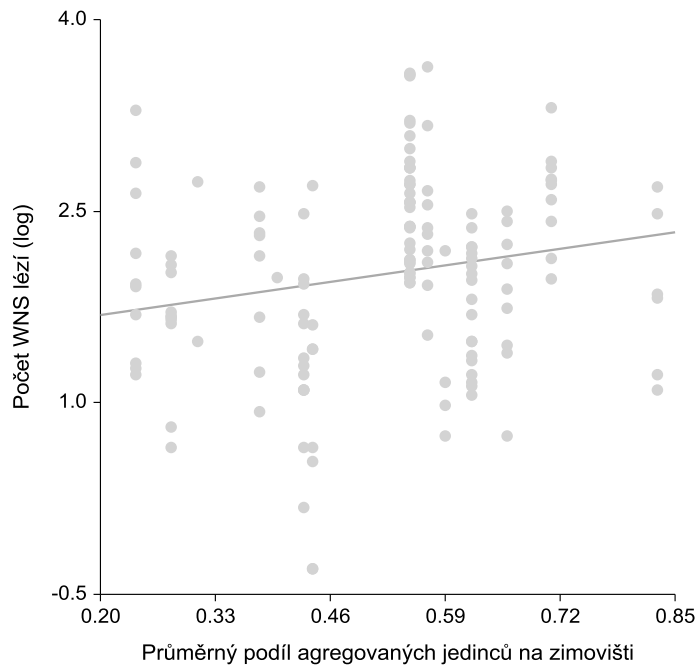
#### 4.1.3 Vliv vybraných faktorů na intenzitu WNS a množství *Pd*

Pomocí GLM byl testován vliv vybraných faktorů (tab. 1), ke kterým byla připojena proměnná podíl agregujících jedinců na zimovišti (tab. 2). Při sestavení GLM pro závisle proměnnou počet WNS lézí vyšel signifikantní vliv faktorů: pohlaví ( $F=6,41$ ;  $P=0,012$ ), věk ( $F=6,32$ ;  $P=0,013$ ), podíl netopýrů v agregacích na zimovišti ( $F=5,57$ ;  $P=0,020$ ) (obr. 9). Z modelu jsem pro nepřítomnost vlivu vyloučila faktory: typ zimoviště ( $F=2,42$ ;  $P=0,122$ ), přítomnost jedince v agregaci ( $F=0,05$ ;  $P=0,826$ ).

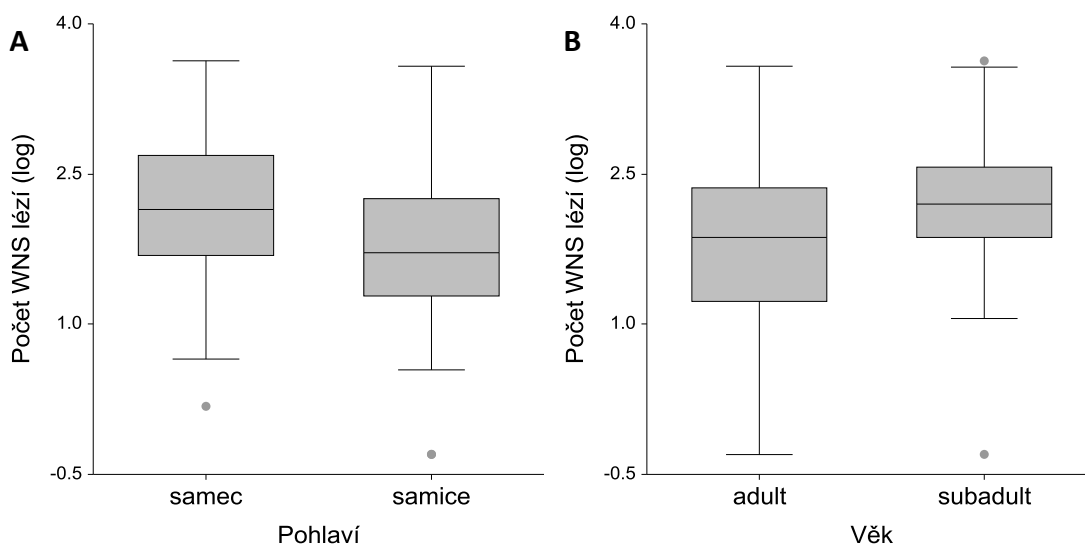
**Tab. 1:** Počty jedinců ve vzorku a mediány s rozpětím kvartilů ( $x_{25}$ – $x_{75}$ ) u intenzity WNS (počet lézí levého křídla) a množství *Pd* v ng na cm<sup>2</sup> křídla (tzv. „fungal load“) u kategorií sledovaných proměnných (pohlaví, stáří, typ zimoviště a přítomnost jedince v agregaci)

Kategorie proměnných	Počet WNS lézí		Množství <i>Pd</i> [ng/cm <sup>2</sup> ]	
	Počet jedinců	Medián ( $x_{25}$ – $x_{75}$ )	Počet jedinců	Medián ( $x_{25}$ – $x_{75}$ )
samice	66	51 (18,5–182,75)	69	4,25 (0,88–47,46)
samec	79	142 (49–492)	81	5,41 (0,28–57,19)
adult	88	73 (16,25–226)	92	4,31 (0,92–58,19)
subadult	57	157 (74–374)	58	4,01 (0,26–42,06)
jeskyně	51	85 (22–385)	51	27,05 (1,08–77,40)
štola	98	122,5 (27,5–307,75)	103	3,01 (0,28–16,57)
v agregaci	67	122 (40–304)	69	10,31 (1,02–58,86)
samostatně	82	98,5 (25,25–346,25)	85	2,19 (0,32–32,53)
Celkem	149	104 (27–328)	154	4,31 (0,62–48,49)

Následně jsem otestovala rozdíly mezi kategoriemi u pohlaví a věku. Samice mají více WNS lézí než samci ( $P=0,004$ ) (obr. 10: A) a subadultní jedinci mají více lézí než adulti ( $P=0,005$ ) (obr. 10: B). Testovala jsem také vliv kombinace pohlaví a věku na počet WNS lézí. Adultní samice mají nejméně WNS lézí a odlišují se průkazně od subadultních samců, kteří mají lézí nejvíce ( $F=5,36$ ;  $P=0,002$ ) (obr. 11).

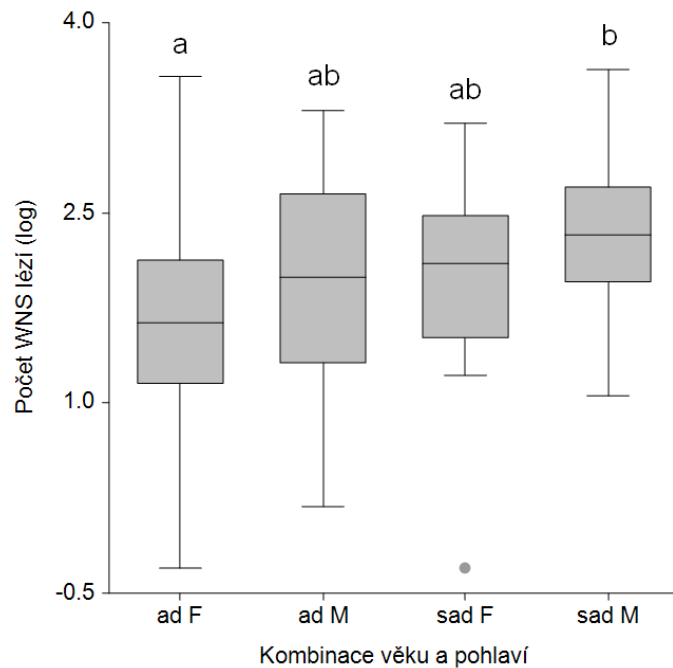


**Obr. 9:** Vztah mezi průměrným počtem WNS lézí a průměrným podílem agregujících jedinců na zimovišti

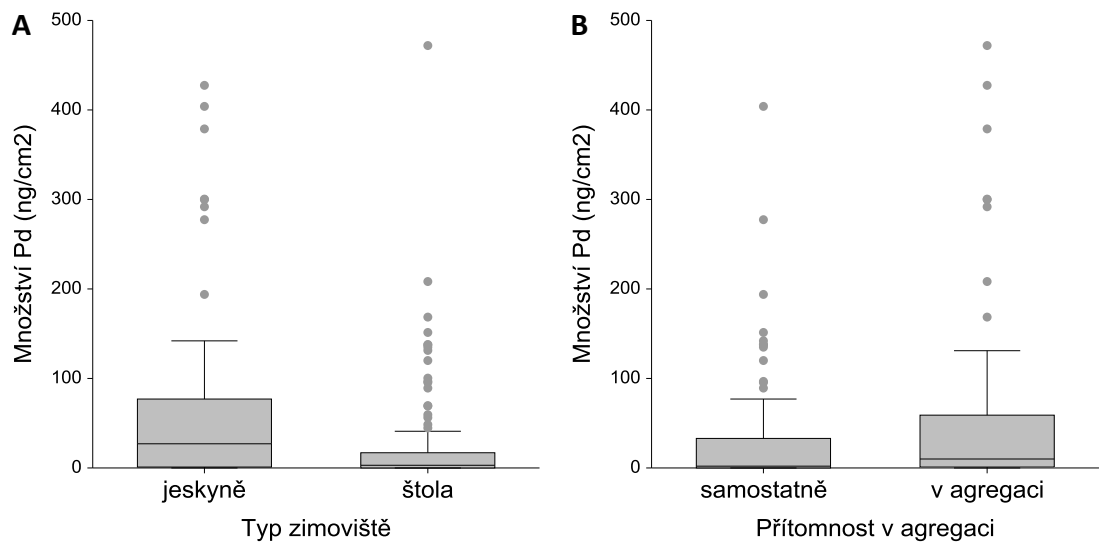


**Obr. 10:** Vliv pohlaví (samice/samec) a věku (adult/subadult) na množství WNS lézí u netopýrů. A) Samci mají průkazně více lézí než samice. B) Subadulti mají více lézí než adultní jedinci

Model GLM se závisle proměnnou množstvím *Pd* ukázal signifikanci pouze jednomu faktoru: typ zimoviště ( $F=15,37$ ;  $P<0,001$ ). Z modelu neměly vliv faktory: pohlaví ( $F=0,61$ ;  $P=0,436$ ), věk ( $F=0,13$ ;  $P=0,714$ ), přítomnost v agregaci ( $F=1,52$ ;  $P=0,220$ ),



**Obr. 11:** Vliv kombinace věku a pohlaví jedinců na počet WNS lézí. Výčet kategorií: ad F (adultní samice,  $n=44$ ), ad M (adultní samec,  $n=48$ ), sad F (subadultní samice,  $n=25$ ), sad M (subadultní samec,  $n=33$ ). Adultní samice mají lézí nejméně a subadultní samci nejvíce, navzájem se od sebe signifikantně liší



**Obr. 12:** Vliv typu zimoviště (jeskyně/štola) a přítomnosti jedince v agregaci (v agregaci/samostatně) na množství *Pd* na  $\text{cm}^2$  křídla. A) V jeskyních mají netopýři průkazně více *Pd* než ve štolách. B) Netopýři v agregacích mají více *Pd* než samostatní jedinci

podíl agregujících jedinců na zimovišti ( $F=2,60$ ;  $P=0,109$ ). Následně jsem testovala odlišnost kategorií u typu zimoviště. Netopýři v jeskyních mají více *Pd* na pokožce než ti ve štolách ( $P<0,001$ ) (obr. 12: A).

Nakonec jsem se zaměřila na faktor přítomnost netopýřů v agregaci. Ačkoli v obou modelech GLM nevychází signifikantní závislost na tomto faktoru (viz výše), z dat jsou patrné vyšší hodnoty množství *Pd* u netopýřů přítomných v agregaci než u samostatně zimujících (tab. 1, obr. 12: B).

## 4.2 Tvorba agregací na zimovištích

### 4.2.1 Počty jedinců v agregacích

Proměnné největší velikost agregace a průměrná velikost agregace spolu korelují ( $r=0,81$ ;  $P<0,001$ ) (tab. 2). Podíl netopýřů v agregacích nekoreluje s největší velikostí agregace ( $r=0,04$ ;  $P=0,817$ ) ani s průměrným počtem jedinců v agregacích ( $r=0,004$ ;  $P=0,981$ ). Pro celý vzorek (36 zimovišť) je podíl agregovaných netopýřů mediánem 0,5 (tab. 2).

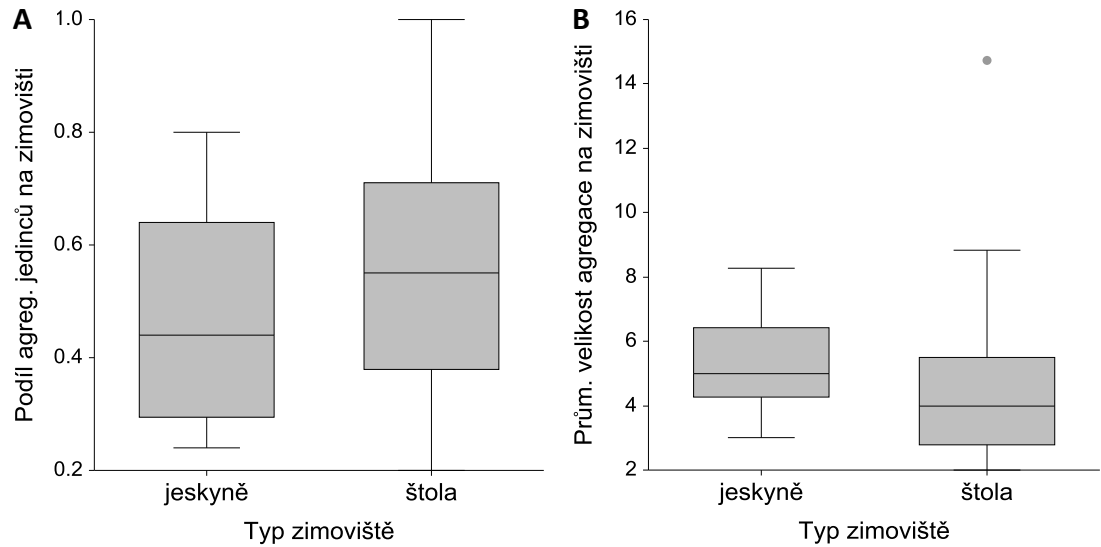
**Tab. 2:** Mediány s rozpětím kvartilů ( $x_{25}-x_{75}$ ) u proměnných týkajících se agregací na dvou typech zimovišť (jeskyně/štola) a na všech zimovištích celkem

Typ zimoviště	Počet	Největší velikost agregace	Průměrná velikost agregace	Průměrný podíl netopýřů v agregacích
jeskyně	9	6,0 (4,5–15,5)	5,0 (4,3–6,4)	0,4 (0,3–0,6)
štola	27	8,0 (3–15)	4,0 (2,8–5,5)	0,6 (0,4–0,7)
Celkem	36	7,5 (4–14,8)	4,6 (3–5,5)	0,5 (0,4–0,7)

### 4.2.2 Vliv typu zimoviště na agregování netopýřů

Typ zimoviště (jeskyně/štola) neovlivňuje podíl netopýřů v agregacích ( $P=0,278$ ) (obr. 13: A). Neprokázal se ani vztah typu zimoviště a průměrné velikosti agregací netopýřů na zimovišti ( $P=0,079$ ) (obr. 13). Nicméně ve štolách byl zjištěn mírně vyšší podíl

netopýřů v agregacích a o něco menší průměrné velikosti agregací než v jeskyních (obr. 13, tab. 2). Obojí však statisticky neprokazatelně.



**Obr. 13:** Vliv typu zimoviště (jeskyně/štola) A) na podíl netopýřů přítomných v agregaci na zimovišti a B) na průměrnou velikost agregace na zimovišti. Mezi jeskyněmi a štolami v obou případech není signifikantní rozdíl

## 5 Diskuze

White-nose syndrome (WNS) je nedávno objevené onemocnění, jehož původcem je plíseň *Pseudogymnoascus destructans* (*Pd*). Předpokládá se, že v přenosu tohoto patogenu hraje velkou roli vzájemný kontakt mezi netopýry, který je podporován tvorbou agregací při hibernaci. Z mých výsledků vyplývá, že tvorba agregací v evropských podmínkách může napomáhat k šíření *Pd*, přesto však nezintenzivňuje projevy WNS. Intenzita onemocnění je přitom podle mých zjištění největší u samců a mladých jedinců.

### 5.1 Vztah mezi počtem WNS lézí a množstvím *Pd*

Počet WNS lézí levého křídla podle mých výsledků nekoreluje s množstvím *Pd* na cm<sup>2</sup> křídla. Tento výsledek je v nesouladu se zjištěním Zukala et al. (2016a), kde korelace mezi počtem lézí a zátěží *Pd* zjištěna byla. Je třeba podotknout, že výsledek práce Zukala et al. (2016a) vychází z rozsáhlejšího výzkumu, který zahrnoval ve vzorku 481 netopýrů. Odlišnost výsledků tedy může být způsobena nižším počtem netopýrů ve vzorku. Netopýři se při pravidelných probouzení čistí a tím mohou stírat mycelia plísně z pokožky. V tomto okamžiku pak spolu počet WNS lézí a množství *Pd* na pokožce netopýra korelovat nemusí. Protože nebyla nijak monitorována činnost netopýrů před odebráním vzorku ke stěru na qPCR, není jasné, jak dlouho se před vzorkováním daný jedinec probudil a jakou měrou byl schopný se od plísně očistit. Je tedy možné, že takovéto chování netopýrů může přispívat ke zkreslení zjištěného množství *Pd* z pokožky vztaženému k počtu WNS lézí. Riziko tohoto zkreslení bude samozřejmě větší u menšího vzorku jedinců, což může být případ mých výsledků.

### 5.2 Vizualní diagnostika WNS

Stupně vizuálního hodnocení (0–3) podle výsledků této práce trendem relativně kopírují intenzitu WNS i množství *Pd* na pokožce netopýrů (obr. 7 a 8). Je patrné, že u raných fází onemocnění je vizuální odhad intenzity onemocnění těžší než u netopýrů s již rozvinutým WNS. Na možnosti vizuálně zhodnotit stupeň WNS se navíc opět podílí i stírání viditelného mycelia výše zmiňovaným čištěním netopýrů během pravidelných probouzení. Z netopýrů kontrolovaných pro tuto práci nebyl žádný jedinec vizuálně

hodnocen falešně pozitivně. Pokud totiž byly na netopýrovi zaznamenány jakékoli viditelné bílé porosty mycelia, byla zde prokázána přítomnost *Pd* analýzou qPCR a rovněž WNS prostřednictvím diagnostických WNS lézí. Jedinců, kteří nejevili žádné vizuální známky porostu *Pd*, a přesto se u nich prokázala přítomnost *Pd* laboratorně, bylo dohromady 32 %. Když zkoumali pravděpodobnost vizuální detekce *Pd* u 928 netopýrů šesti druhů v Severní Americe, falešně negativních výsledků bylo 77 % (Janicki et al. 2015), tj. více než dvakrát tolik. Rozdílnost v množství těchto tzv. kryptických napadení *Pd* je nejspíše způsobena druhovým zastoupením. Pravděpodobnost vizuální detekce *Pd* je totiž druhově specifická (*ibid.*). Vzorek netopýrů v této práci je složený převážně z jednoho druhu (*Myotis myotis*), a proto by se měly hodnoty prezentované v této práci vztáhnout konkrétně na tento druh, nikoli na jiné druhy nebo souhrnně na evropské druhy netopýrů.

### 5.3 Vliv pohlaví a věku na intenzitu WNS

Na počet WNS lézí má průkazný vliv pohlaví a věk jedince. Subadultní jedinci a samci měli průkazně více WNS lézí než adulti a samice. Zároveň mají průkazně více lézí subadultní samci oproti adultním samicím. U množství *Pd* mezi těmito skupinami rozdíl není. To naznačuje, že ačkoli je zátěž *Pd* stejná, mohou být právě mladí a samci z nějakého důvodu náchylnější k prorůstání kůže plísní a tvoření WNS lézí.

Mladí jedinci jsou přirozeně zdravotně náchylnější k onemocněním a také u netopýrů jsou míry přežívání subadultů obecně považovány za nižší než u dospělých jedinců (např. Tuttle 1976, Horáček 1985 in Postawa a Nagy 2016; Sendor a Simon 2003), i když se to nemusí silně projevovat každoročně a u všech lokalit (Jonasson a Willis 2011). U subadultních jedinců se při výzkumu severoamerického netopýra hnědavého (*Myotis lucifugus*) neprokázala šetrnost s energetickými zásobami v průběhu hibernace (posuzovanou podle hmotnosti tukových zásob), přestože jsou mladí jedinci menší a zásob mohou mít k dispozici méně než dospělci (Kunz et al. 1998; Jonasson a Willis 2011). Poklesy tělesné kondice v průběhu hibernace u nich byly rychlejší než u dospělých jedinců (Jonasson a Willis 2011). Je možné, že se teprve učí, jak s tukovými rezervami šetřit (*ibid.*), což ovlivní svým chováním, které může zahrnovat například výběr místa vhodných teplotních podmínek (Boyles et al. 2007), dobu strávenou ve strnulém stavu a frekvenci probouzení nebo také tvorbu agregací (Brown

1999; Boyles et al. 2008). Tohle vše může být úzce spojeno i s odoláváním nemocem a přispíváním k náchylnosti mladých jedinců také k WNS.

Mezi pohlavími u netopýrů nebyl za obvyklých podmínek hibernace shledán rozdíl v míře přežití (např. Sendor a Simon 2003). V Severní Americe při výzkumu netopýra hnědavého (*Myotis lucifugus*), který je jedním z tammích nejvíce WNS postižených druhů, pozorovali vliv pohlaví na přežití při působení WNS (Johnson et al. 2014; Grieneisen et al. 2015). Samice dosahovaly větší pravděpodobnosti přežití než samci (Johnson et al. 2014). Vyplývá to nejspíše ze skutečnosti, že adultní samice vstupují do hibernace s většími tukovými zásobami než adultní samci a subadultní jedinci, navíc v průběhu hibernace dovedou ve spotřebě energie více šetřit (Kunz et al. 1998; Jonasson a Willis 2011). Přičemž netopýři šetří energii tím způsobem, že hibernují v delších úsecích (tj. probouzí se méně často) a hluboce (sníží maximálně svůj metabolismus) (*ibid.*). Nabízí se tu vysvětlení nízkého počtu lézí u samic tím, že hibernují po delších úsecích a nemají tedy příležitost se čistit od porostů *Pd* tak často jako samci. Této hypotéze však moje výsledky odporují. Průkazné rozdíly mezi pohlavími v množství *Pd* na pokožce křídla jsem ve své práci nezjistila.

Hluboké a dlouhé stavy strnulosti nejsou pro hibernující netopýry jednoznačně výhodnější, naopak s sebou nesou fyziologické a ekologické náklady (například v podobě nahromadění metabolitů (Boyles et al. 2006), většího potlačení smyslového vnímání a imunity či spánkového deficitu (Boyles et al. 2007)). Přesto je pro samice nutné šetřit energií, i když mají na začátku větší tukové zásoby (Kunz et al. 1998; Jonasson a Willis 2011; Johnson et al. 2014). Na jaře po skončení hibernace totiž samice potřebují dostatek energie pro spuštění hormonálních změn, které vyvolají ovulaci. Vajíčko v tuto dobu může být oplodněno spermiemi, které mají samice v pohlavním ústrojí od podzimního páření (Jonasson a Willis 2011). Z tohoto důvodu, a také pro schopnost samic létat gravidní či s mládětem na těle, se u netopýrů včetně *M. lucifugus* (*ibid.*) a *M. myotis* (Lisón et al. 2014) vyskytuje pohlavní dimorfismus. Dospělým samicím je proto umožněno mít větší tukové zásoby a být tak odolnější v průběhu hibernace k energetickým ztrátám, v Severní Americe spojeným i s vlivem WNS (Jonasson a Willis 2011). Johnson et al. 2014 ve své práci podotýkají, že zatímco lepší tělesná kondice jistě přispívá k míře přežívání v případě WNS, podle jejich analýzy přežití existují další zatím neodhalené faktory odvozené od pohlaví, které rozdílnost v přežití netopýrů ovlivňují.



V evropských podmínkách mohou v otázce WNS hrát roli ektoparazitičtí roztoči. V Evropě jsou netopýři mnohem více zatíženi ektoparazitami než v Severní Americe (Horáček et al. 2014). Parazité způsobují netopýřím hostitelům narušení pokožky a s tím spojený stres. Nepřetržité vystavování tomuto druhu poškozování pokožky mohlo u evropských netopýřů vypěstovat určitou toleranci a odolnost (*ibid.*). Zajímavé je, že se u netopýřů liší v množství ektoparazitů samci od samic (Christe et al. 2007). Je to dáno odlišným způsobem života v průběhu roku. Zatímco dospělí samci a mladí nereproduktivní jedinci vyhledávají samostatné úkryty, dospělé samice se sdružují a vytvářejí letní mateřské kolonie, kde společně pečují o mláďata. V takovýchto koloniích jsou velice vhodné podmínky pro množení ektoparazitů a jejich přenos mezi jedinci (*ibid.*). Nejpočetnější společenstva ektoparazitů se při výzkumech nacházela právě na dospělých samicích, čímž se dospělé samice průkazně odlišovaly od dospělých samců (Lučan 2006; Christe et al. 2007; Postawa a Nagy 2016). Subadultní jedinci měli průměrně méně ektoparazitů než dospělci (Christe et al. 2007; Postawa a Nagy 2016). Zjištěné početnosti ektoparazitů na netopýřech podle pohlaví a věku nápadně inverzně připomínají rozdílnosti v počtu WNS lézí prezentovaných v této práci. Dospělé samice tu měly úplně nejméně lézí a významně se odlišovaly od mladých samců. Samice bez ohledu na věk měly více lézí než samci a také adulti bez ohledu na pohlaví měli více lézí než subadulti. Moje výsledky tedy nahrávají spíše hypotéze o přispívání ektoparazitů k odolnosti proti účinkům WNS než protichůdné hypotéze o funkci ektoparazitů jako faktoru přispívajícím k šíření a větší intenzitě WNS, který může mít ve skutečnosti zanedbatelný vliv (Lučan et al. 2016).

#### **5.4 Vliv tvorby agregací na intenzitu WNS a přenos *Pd***

Podle mých výsledků průměrný podíl agregovaných jedinců na zimovišti koreluje s počtem WNS lézí jedinců. Zároveň se však navzdory předpokladům v této práci neověřila rozdílnost v počtu WNS lézí mezi jedinci přímo přítomnými v agregaci a těmi zimujícími jednotlivě. Tvoření agregací tedy na množství WNS lézí u netopýřů nějaký poměrný vliv má, ale je rozeznatelný pouze na úrovni celého zimoviště nikoli jedinců. Agregace zřejmě přispívají k šíření *Pd* mezi agregujícími jedinci (Langwig et al. 2015) a čím dříve se *Pd* na netopýra dostane, tím má pak tato pomalu rostoucí houba více času na rozrůstání v průběhu hibernace. Ve výsledcích této práce se ukázalo, že množství *Pd* na plochu křídla je mírně vyšší u jedinců hibernujících ve skupině, než u těch zimujících

jednotlivě, což by odpovídalo hypotéze o snazším přenosu mezi netopýry v agregaci. Vliv přítomnosti jedince v agregaci se však zároveň neprokázal u počtu WNS lézí. Z toho vyplývá, že ačkoli je množství plísně na netopýrovi ve větší koncentraci vlivem přenosu, nemusí se tím zvýšit intenzita prorůstání *Pd* kůží a množství WNS lézí.

Agregace v našich podmínkách tedy zřejmě nevedou k větší intenzitě onemocnění WNS jako v Severní Americe (Langwig et al. 2012; Turner et al. 2015). Je to pravděpodobně dáno odlišným charakterem tvorby agregací u palearktických a nearktických netopýrů. Agregace tvořené zdejšími netopýry jsou velikostně mnohem menší a nestabilní (Wibbelt et al. 2010; Frick et al. 2015). Agregace u nás sice budou mít nejspíš vliv na přenos *Pd* mezi netopýry, ale v menším počtu jedinců nebude tak efektivní jako u severoamerických agregací, které čítají stovky až tisíce jedinců (*ibid.*). Dalším podstatným rozdílem je, že WNS nakažení netopýři v Severní Americe se častěji probouzejí ze strnulosti (Warnecke et al. 2012). V tamějších velkých agregacích se napadení jedinci navzájem vyrušují ze spánku jinak výhodným synchronizovaným probouzením (Boyles et al. 2008; Boratynski et al. 2012; Czenze et al. 2013; Turner et al. 2015), což je energeticky nadměrně vyčerpává a zintenzivňuje to negativní působení *Pd* (Czenze et al. 2013; Turner et al. 2015).

## 5.5 Vliv typu zimoviště na množství *Pd* u netopýrů

Typ zimoviště na počet WNS lézí u netopýrů podle mých výsledků nemá vliv. Zato na množství *Pd* na pokožce netopýrů ano. V jeskyních jsou jedinci na pokožce porostlí větším množstvím *Pd* než ve štolách. Jedním z možných vysvětlení je, že v přirozeně vzniklých jeskyních může panovat stabilnější a chladnější klima než ve štolách (např. Vanderwolf et al. 2012) a netopýři se v důsledku toho tolik neprobouzejí (Boyles et al. 2007), prodlužují dobu strávenou ve strnulém stavu a přicházejí tak o možnost častěji čistit svou pokožku od porostů *Pd*.

Alternativním vysvětlením vlivu typu zimoviště na WNS je, že rozdílné mikroklimatické podmínky prostředí zimovišť by mohly ovlivňovat rychlost růstu a množství *Pd* na pokožce netopýrů. Ideálními podmínkami pro růst *Pd* jsou vysoká vlhkost a vyšší teplota (Langwig et al. 2012), přičemž její teplotní optimum pro růst se pohybuje mezi 12–16 °C a rozmezí, kdy je stále schopna růstu je 3–19 °C (Verant et al. 2012). Většině netopýrů vyhovují při hibernaci teploty v rozmezí 2–10 °C (Glover 2006). Pokud budeme považovat mikroklima štol obecně za více variabilní, větší

rozdílnost podmínek v rámci štoly může znamenat vyšší šanci ve výskytu mikroklimaticky vhodných podmínek k růstu *Pd*. Tato hypotéza ovšem nepodporuje zde předkládaný výsledek, kdy větší množství *Pd* bylo na netopýrech v jeskyních, kde lze předpokládat chladnější klima (např. Vanderwolf et al. 2012). Zobecnit charakter teplot panujících na zimovištích je však těžké, protože každé podléhá svému specifickému morfologickému charakteru a teploty se s postupem zimního období mění (Daan 1973). Navíc netopýři v průběhu hibernace mohou měnit konkrétní místa v zimovišti podle měnících se okolních podmínek a jejich aktuálních metabolických potřeb (např. Daan 1973; Hanzal a Průcha 1988).

Typy zimovišť se dále ve spojitosti s mikroklimatem mohou lišit i mírou agregování jedinců, které se podílí na přenosu *Pd* (Langwig et al. 2015). Zjistilo se, že na chladnějších místech netopýři vytvářejí větší množství skupin a po více jedincích (Daan 1973; Hanzal a Průcha 1988; Boratyński et al. 2012), což by mohlo vysvětlit zvýšený porost *Pd* u chladnějších jeskyní. Pokud však uvážíme teplotní preference *Pd* pro růst, pak snadný přenos mezi agregujícími jedinci ve skupinách už nebude v chladnějších podmínkách tolik podporován zvýšeným růstem mycelia. Zdá se tedy, že výskyt agregací nedovede vysvětlit rozdíly v množství *Pd*, které mezi jeskyněmi a štolami byly v této práci zjištěny. Navíc moje další výsledky nepotvrzují průkaznou závislost agregování jedinců na typu zimoviště.

## 5.6 Vliv typu zimoviště na agregování netopýřů

Typ zimoviště oproti očekávaným výsledkům této práce průkazně neovlivňuje velikost agregací (vyjádřeno průměrnou velikostí agregace na zimovišti) ani podíl agregujících jedinců z celkového počtu zimujících netopýřů na zimovišti. Nutno však zmínit, že ačkoli statisticky neprůkazně, hodnoty velikostí agregací o něco větší u jeskyní a podíly agregujících jedinců je zase větší u štol. Náznaky těchto vztahů jsou také v souladu s přehledem početnosti největších agregací netopýra druhu *Myotis myotis* v mé bakalářské práci věnované zimovištím (Havlová 2014), kde bylo vyhodnocováno na 466 zimovišť ČR. Největší agregace *M. myotis* tu byly početnější v jeskyních než ve štolách. Mohli bychom proto předpokládat, že ve štolách se můžeme setkat s větším podílem netopýřů v mnoha malých agregacích, kdežto v jeskyních bude agregujících méně, ale ve skupinách větších rozměrů.

## 6 Závěrem

Výsledky této práce poukazují na to, že netopýři v agregacích mohou mít sice větší množství porostu *Pd* na pokožce, ale intenzitou reálného onemocnění nejsou více zasaženi než jednotlivci. Evropští netopýři v minulosti mohli projít velkými vymíráními na WNS za podpory přenosu *Pd* v agregacích, podobně jako ti američtí. Dnes jsou vůči původci WNS ve srovnání se severoamerickými netopýry tolerantní (např. Martínková et al. 2010; Pikula et al. 2012; Zukal et al. 2016a) a zimování v agregacích ke zvýšené intenzitě WNS současně nemusí přispívat.

Agregace tvořené americkými netopýry jsou velikostně mnohem větší než u netopýrů zimujících v palearktické oblasti (Wibbelt et al. 2010) a podle nedávných výzkumů se s rozšířením WNS blíží právě k palearktickým poměrům (Frick et al. 2015). Dále jsou známé zprávy o severoamerických populacích, jejichž jedinci se z nějakého důvodu energeticky nevyčerpávají častějším probouzením z hibernace v důsledku WNS a nákazu přežívají (Lilley et al. 2016). Tato pozorování by mohla předznamenat pozitivní vývoj v toleranci či rezistenci alespoň některých druhů severoamerických netopýrů k tomuto závažnému onemocnění (Frick et al. 2016; Lilley et al. 2016; Langwig et al. 2017).

## 7 Souhrn

V této práci jsem zkoumala možné vlivy zimního agregování netopýrů na intenzitu „syndromu bílého nosu“ (WNS) a šíření jejího původce plísně *Pseudogymnoascus destructans* (*Pd*). Ke zjištění intenzity WNS a množství *Pd* bylo na 17 zimovištích zkoumáno 154 netopýrů. Dále jsem se zabývala vytvořením přehledu o tvorbě agregací na českých zimovištích, k čemuž byly shromážděny informace o 36 zimovištích. Hlavní výsledky jsou shrnuty do následujících bodů:

1. Počet zjištěných WNS lézí pod UV světlem nekoreluje s množstvím *Pd* na netopýrech zjištěným stěry a analyzovaným metodou qPCR. Tento výsledek je pravděpodobně důsledkem malého vzorku jedinců ( $n=154$ ) a efektem čištění netopýrů v průběhu pravidelných přerušování spánku, kdy si jedinci plíseň z povrchu těla stírají. To je také jeden z důvodů, proč se nedaří přesně hodnotit intenzitu onemocnění podle viditelných známek porostu plísně. Falešně negativně bylo hodnoceno 31 % průkazně WNS nemocných netopýrů a 32 % s přítomností *Pd*. Pravděpodobnost vizuální detekce onemocnění se zvyšuje s jeho větší intenzitou. Nižší intenzity jsou zjištěné slabě nebo vůbec.
2. Na počet WNS lézí má průkazný vliv věk a pohlaví jedince. Více lézí měli samci než samice a subadulti než adulti. Zároveň byl signifikantní rozdíl v počtu WNS lézí mezi adultními samicemi a subadultními samci. Množství *Pd* ale nebylo ovlivněno věkem ani pohlavím, z čehož vyplývá, že mladí jedinci a samci jsou zřejmě náchylnější na napadení *Pd* za vzniku WNS lézí.
3. Přítomnost jedince v agregaci nemá vliv na počet WNS lézí, i když byla na úrovni zjištěna slabá korelace počtu lézí u jedinců a podíl netopýrů v agregaci na zimovišti. Přítomnost v agregaci nebo mimo ni měla hraničně signifikantně vliv na množství *Pd* na pokožce křídel. Na úrovni celého zimoviště se však závislost mezi množstvím *Pd* a podílem agregujících netopýrů neprokázala.
4. Typ zimoviště má vliv na množství *Pd* na netopýrech, ale ne na intenzitu WNS definovanou počtem lézí. Na netopýrech v přirozeně vzniklých jeskyních bylo větší množství plísně než ve štolách. Jeskyně se od štol liší stabilitou mikroklimatických podmínek, teplotou a vlhkostí. Je však nejasné, co z podmínek v jeskyních může závislost na vyšším výskytu *Pd* na netopýrech podmiňovat.

5. Typy zimovišť se mezi sebou neliší velikostmi agregací a podílem agregujících jedinců na zimovišti. Ač statisticky neprůkazně, moje údaje naznačují, že ve štolách by mohl být vyšší podíl zimujících jedinců v agregacích než v jeskyních, ale netopýři se zde budou sdružovat do více menších agregací, kdežto u jeskyní budou převažovat agregace větších rozměrů.

## Literatura

- Altringham JD. 2011. Bats: from evolution to conservation. 2nd ed. New York: Oxford University Press. Chapter 4, Torpor and hibernation; s. 97–112.
- Bandouchová H, Bartonička T, Berková H, Brichta J, Černý J, Kováčová V, Kolarik M, Köllner B, Kulich P, Martínková N, Řehák Z, Turner GG, Zukal J, Pikula J. 2015. *Pseudogymnoascus destructans*: Evidence of Virulent Skin Invasion for Bats Under Natural Conditions, Europe. *Transbound Emerg Dis.* 62(1):1–5.
- Blehert DS, Hicks AC, Behr M, Meteyer CU, Berlowski-Zier BM, Buckles EL, Coleman JTH, SR, Gargas A, Niver R, Okoniewski JC, Rudd RJ, Stone WB. 2009. Bat white-nose syndrome: an emerging fungal pathogen? *Science.* 323(5911):227–227.
- Blehert DS. 2012. Fungal disease and the developing story of bat white-nose syndrome. *PLoS Pathog.* 8(7):e1002779.
- Bohn SJ, Turner JM, Warnecke L, Mayo C, McGuire LP, Misra V, Bollinger TK, Willis CKR. 2016. Evidence of ‘sickness behaviour’ in bats with white-nose syndrome. *Behaviour.* 153(8):981–1003.
- Boratyński JS, Rusiński M, Kokurewicz T, Bereszyński A, Wojciechowski MS. 2012. Clustering behavior in wintering greater mouse-eared bats *Myotis myotis* – the effect of micro-environmental conditions. *Acta Chiropterol.* 14(2):417–424.
- Bouma HR, Carey HV, Kroese FGM. 2010. Hibernation: the immune system at rest? *J Leukocyte Biol.* 88(4):619–624.
- Boyles JG, Brack V. 2009. Modeling survival rates of hibernating mammals with individual-based models of energy expenditure. *J Mammal.* 90:9–16.
- Boyles JG, Dunbar MB, Storm JJ, Brack V. 2007. Energy availability influences microclimate selection of hibernating bats. *J Exp Biol.* 210(24):4345–4350.
- Boyles JG, Dunbar MB, Whitaker JO. 2006. Activity following arousal in winter in North American vespertilionid bats. *Mammal Rev.* 36(4):267–280.
- Boyles JG, Storm JJ, Brack Jr V. 2008. Thermal benefits of clustering during hibernation: a field test of competing hypotheses on *Myotis sodalis*. *Funct Ecol.* 22(4):632–636.
- Brownlee-Bouboulis SA, Reeder DM. 2013. White-nose syndrome-affected little brown myotis (*Myotis lucifugus*) increase grooming and other active behaviors during arousals from hibernation. *J Wildlife Dis.* 49(4):850–859.
- Carey CS, Boyles JG. 2015. Interruption to cutaneous gas exchange is not a likely mechanism of WNS-associated death in bats. *J Exp Biol.* 218(13):1986–1989.
- Courtin F, Stone WB, Risatti G, Gilbert K, Van Kruiningen HJ. 2010. Pathologic findings and liver elements in hibernating bats with white-nose syndrome. *Vet Pathol.* 47(2):214–219.
- Cryan PM, Meteyer CU, Blehert DS, Lorch JM, Reeder DM, Turner GG, Webb J, Behr M, Verant M, Russell RE, Castle KT. 2013. Electrolyte depletion in white-nose syndrome bats. *J Wildlife Dis.* 49(2):398–402.
- Cryan PM, Meteyer CU, Boyles JG, Blehert DS. 2010. Wing pathology of white-nose syndrome in bats suggests life-threatening disruption of physiology. *BMC biology.* 8(1):135.
- Czenze ZJ, Park AD, Willis CK. 2013. Staying cold through dinner: cold-climate bats rewarm with conspecifics but not sunset during hibernation. *J Comp Physiol B.* 183(6):859–866.

- Daan S. 1973. Activity during natural hibernation in three species of vespertilionid bats. *Neth J Zool.* 23(1):1–71.
- Daszak P, Cunningham AA, Hyatt AD. 2000. Emerging infectious diseases of wildlife – threats to biodiversity and human health. *Science.* 287(5452):443–449.
- Flieger M, Bandouchová H, Černý J, Chudíčková M, Kolařík M, Kováčová V, Martínková N, Novák P, Šebesta O, Stodůlková E, Pikula J. 2016. Vitamin B<sub>2</sub> as a virulence factor in *Pseudogymnoascus destructans* skin infection. *Scientific Reports.* 6.
- Frick WF, Cheng TL, Langwig KE, Hoyt JR, Janicki AF, Parise KL, Foster JT, Kilpatrick AM. 2016. Pathogen dynamics during invasion and establishment of white-nose syndrome explain mechanisms of host persistence. *Ecology.* 98(3): 624–631.
- Frick WF, Pollock JF, Hicks AC, Langwig KE, Reynolds DS, Turner GG, Butchkoski CM, Kunz TH. 2010. An emerging disease causes regional population collapse of a common North American bat species. *Science.* 329:679–682.
- Frick WF, Puechmaille SJ, Hoyt JR, Nickel BA, Langwig KE, Foster JT, Barlow KE, Bartonička T, Feller D, Haarsma AJ, et al. 2015. Disease alters macroecological patterns of North American bats. *Global Ecol Biogeogr.* 24(7):741–749.
- Gargas A, Trest MT, Christensen M, Volk TJ, Blehert DS. 2009. *Geomyces destructans* sp. nov. associated with bat white-nose syndrome. *Mycotaxon.* 108:147–154.
- Geiser F. 2004. Metabolic rate and body temperature reduction during hibernation and daily torpor. *Annu Rev Physiol.* 66:239–274.
- Glover AM. 2006. The ecology and conservation of cave roosting bats in the Yorkshire Dales [doctoral dissertation]. [Leeds (UK)]: University of Leeds.
- Grieneisen LE, Brownlee-Bouboulis SA, Johnson JS, Reeder DM. 2015. Sex and hibernaculum temperature predict survivorship in white-nose syndrome affected little brown myotis (*Myotis lucifugus*). *Royal Society open science.* 2(2):140470.
- Hanzal V, Průcha M. 1988. Sezónní dynamika netopýřích společenstev na zimovištích Českého krasu v letech 1984–1986. *Lynx, n. s.* 24:15–35.
- Havlová P. 2014. Morfologická charakteristika zimovišť netopýřů ve vztahu k WNS onemocnění [bakalářská práce]. [Olomouc (CZ)]: Univerzita Palackého v Olomouci.
- Horáček I. 1985. Population ecology of *Myotis myotis* in central Bohemia (Mammalia: Chiroptera). Univerzita Karlova.
- Horáček I, Bartonička T, Lučan RK. 2014. Macroecological characteristics of bat geomycosis in the Czech Republic: results of five years of monitoring. *Vespertilio.* 17:65–77.
- Hoyt JR., Sun K, Parise KL, Lu G, Langwig KE, Jiang T, Yang S, Frick WF, Kilpatrick AM, Foster JT, Feng J. 2016. Widespread bat white-nose syndrome fungus, Northeastern China. *Emerg Infect Dis.* 22(1):140.
- Christe P, Glaizot O, Evanno G, Bruyndonckx N, Devevey G, Yannic G, Patthey P, Maeder A, Vogel P, Arlettaz R. 2007. Host sex and ectoparasites choice: preference for, and higher survival on female hosts. *J Anim Ecol.* 76(4):703–710.
- Janicki AF, Frick WF, Kilpatrick AM, Parise KL, Foster JT, McCracken GF. 2015. Efficacy of visual surveys for white-nose syndrome at bat hibernacula. *PLoS ONE.* 10(7):e0133390.
- Johnson JS, Reeder DM, McMichael III JW, Meierhofer MB, Stern DW, Lumadue SS, Sigler LE, Winters HD, Vodzak ME, Kurta A, Kath JA, Field KA. 2014. Host, pathogen, and



- environmental characteristics predict white-nose syndrome mortality in captive little brown myotis (*Myotis lucifugus*). PLoS ONE. 9(11):e112502.
- Jonasson KA, Willis CK. 2011. Changes in body condition of hibernating bats support the thrifty female hypothesis and predict consequences for populations with white-nose syndrome. PLoS ONE. 6(6):e21061.
- Kunz TH, Wrazen JA, Burnett CD. 1998. Changes in body mass and fat reserves in pre-hibernating little brown bats (*Myotis lucifugus*). Ecoscience. 5(1):8–17.
- Langwig KE, Frick WF, Bried JT, Hicks AC, Kunz TH, Kilpatrick AM. 2012. Sociality, density-dependence and microclimates determine the persistence of populations suffering from a novel fungal disease, white-nose syndrome. Ecol Lett. 15:1050–1057.
- Langwig KE, Hoyt JR, Parise KL, Frick WF, Foster JT, Kilpatrick AM. 2017. Resistance in persisting bat populations after white-nose syndrome invasion. Phil Trans R Soc. B 372:20160044.
- Langwig KE, Frick WF, Reynolds R, Parise KL, Drees KP, Hoyt JR, Cheng TJ, Kunz TH, Foster JT, Kilpatrick AM. 2015. Host and pathogen ecology drive the seasonal dynamics of a fungal disease, white-nose syndrome. Proc R Soc B: Biological Sciences. 282(1799):20142335.
- Lilley TM, Johnson JS, Ruokolainen L, Rogers EJ, Wilson CA, Schell SM, Field KA, Reeder DM. 2016. White-nose syndrome survivors do not exhibit frequent arousals associated with *Pseudogymnoascus destructans* infection. Front Zool. 13(1):1.
- Lisón F, Haz A, González-Revelles C, Calvo JF. 2014. Sexual size dimorphism in greater mouse-eared bat *Myotis myotis* (Chiroptera: Vespertilionidae) from a Mediterranean region. Acta Zool-Stockholm. 95(2):137–143.
- Lorch JM, Meteyer CU, Behr MJ, Boyles JG, Cryan PM, Hicks AC, Ballmann AE, Coleman JT, Redell DN, Reeder DM, Blehert DS. 2011. Experimental infection of bats with *Geomyces destructans* causes white-nose syndrome. Nature. 480(7377):376–378.
- Lorch JM., Minnis AM, Meteyer CU, Redell JA, White JP, Kaarakka HM, Muller LK, Lindner DL, Verant ML, Shearn-Bochsler V, Blehert DS. 2015. The fungus *Trichophyton redellii* sp. nov. causes skin infections that resemble white-nose syndrome of hibernating bats. J Wildlife Dis. 51(1):36–47.
- Lučan RK. 2006. Relationships between the parasitic mite *Spinturnix andegavinus* (Acari: Spinturnicidae) and its bat host, *Myotis daubentonii* (Chiroptera: Vespertilionidae): seasonal, sex-and age-related variation in infestation and possible impact of the parasite on the host condition and roosting behaviour. Folia parasitol. 53(2):147.
- Lučan RK, Bandouchová H, Bartonička T, Pikula J, Zahradníková A, Zukal J, Martínková N. 2016. Ectoparasites may serve as vectors for the white-nose syndrome fungus. Parasites & vectors. 9(1):1.
- Martínková N, Bačkor P, Bartonička T, Blažková P, Červený J, Falteisek L, Gaisler J, Hanzal V, Horáček D, Hubálek Z, et al. 2010. Increasing incidence of *Geomyces destructans* fungus in bats from the Czech Republic and Slovakia. PLoS ONE. 5(11):e13853.
- McGuire LP, Turner JM, Warnecke L, McGregor G, Bollinger TK, Misra V, Foster JT, Frick WF, Kilpatrick AM, Willis CKR. 2016. White-nose syndrome disease severity and a comparison of diagnostic methods. EcoHealth. 13(1):60–71.
- Meteyer CU, Buckles EL, Blehert DS, Hicks AC, Green DE, Shearn-Bochsler V, Thomas NJ, Gargas A, Behr MJ. 2009. Histopathologic criteria to confirm white-nose syndrome in bats. J Vet Diagn Invest. 21:411–414.

- Muller LK, Lorch JM, Lindner DL, O'Connor M, Gargas A, Blehert DS. 2013. Bat white-nose syndrome: a real-time TaqMan polymerase chain reaction test targeting the intergenic spacer region of *Geomyces destructans*. *Mycologia*. 105(2):253–259.
- Norberg UM, Rayner JM. 1987. Ecological morphology and flight in bats (Mammalia; Chiroptera): wing adaptations, flight performance, foraging strategy and echolocation. *Philos T Roy Soc B*. 316(1179):335–427.
- Pikula J, Bandouchova H, Novotný L, Meteyer CU, Zukal J, Irwin NR, Zima J, Martínková N. 2012. Histopathology confirms white-nose syndrome in bats in Europe. *J Wildlife Dis*. 48(1):207–211.
- Postawa T, Nagy Z. 2016. Variation of parasitism patterns in bats during hibernation: the effect of host species, resources, health status, and hibernation period. *Parasitology research*. 115(10):3767–3778.
- Průcha M, Hanzal V. 1989. Some aspects of hibernation of bats wintering in the Bohemian Karst (Central Bohemia, Czechoslovakia). *Acta Univ Caroli Biol*. 33:315–333.
- Puechmaile SJ, Wibbelt G, Korn V, Fuller H, Forget F, Mühldorfer K, Kurth A, Bogdanowicz W, Borel Ch, Bosch T, et al. 2011. Pan-European distribution of white-nose syndrome fungus (*Geomyces destructans*) not associated with mass mortality. *PLoS ONE*. 6(4):e19167.
- Rajkumar SS, Li X, Rudd RJ, Okoniewski JC, Xu J, Chaturvedi S, Chaturvedi V. 2011. Clonal genotype of *Geomyces destructans* among bats with white-nose syndrome, New York, USA. *Emerg Infect Dis*. 17(7):1273–1276.
- Reeder DM, Frank CL, Turner GG, Meteyer CU, Kurta A, Britzke ER, Vodzak ME, Darling SR, Stihler CW, Hicks AC, Jacob R, Grieneisen LE, Brownlee SA, MullerLK, Blehert DS. 2012. Frequent arousal from hibernation linked to severity of infection and mortality in bats with white-nose syndrome. *PLoS ONE*. 7(6):e38920.
- Sendor T, Simon M. 2003. Population dynamics of the pipistrelle bat: effects of sex, age and winter weather on seasonal survival. *J Anim Ecol*. 72(2):308–320.
- Shuey MM, Drees KP, Lindner DL, Keim P, Foster JT. 2014. Highly sensitive quantitative PCR for the detection and differentiation of *Pseudogymnoascus destructans* and other *Pseudogymnoascus* species. *Appl environ microb*. 80(5):1726–1731.
- Thomas DW, Fenton MB, Barclay RM. 1979. Social behavior of the little brown bat, *Myotis lucifugus*: I. Mating behavior. *Behav Ecol Sociobiol*. 6(2):129–136.
- Turner GG, Meteyer CU, Bartoň H, Gumbs JF, Reeder DM, Overton B, Bandouchová H, Bartonička T, Martínková N, Pikula J, Zukal J, Blehert DS. 2014. Nonlethal screening of bat-wing skin with the use of ultraviolet fluorescence to detect lesions indicative of white-nose syndrome. *J Wildlife Dis*. 50(3):566–573.
- Tuttle MD. 1976. Population ecology of the gray bat (*Myotis grisescens*): factors influencing growth and survival of newly volant young. *Ecology*. 57(3):587–595.
- Twente JW. 1955. Some aspects of habitat selection and other behavior of cavern-dwelling bats. *Ecology*. 36(4):706–732.
- Vanderwolf KJ, McAlpine DF, Forbes GJ, Malloch D. 2012. Bat populations and cave microclimate prior to and at the outbreak of white-nose syndrome in New Brunswick. *Can Field Nat*. 126(2):125–134.

- Verant ML, Boyles JG, Waldrep W, Wibbelt G, Blehert DS. 2012. Temperature-dependent growth of *Geomyces destructans*, the fungus that causes bat white-nose syndrome. PLoS ONE. 7(9):e46280.
- Verant ML, Carol M, Speakman JR, Cryan PM, Lorch JM, Blehert DS. 2014. White-nose syndrome initiates a cascade of physiologic disturbances in the hibernating bat host. BMC physiology. 14(1):10.
- Warnecke L, Turner JM, Bollinger TK, Lorch JM, Misra V, Cryan PM, Wibbelt G, Blehert DS, Willis CKR. 2012. Inoculation of bats with European *Geomyces destructans* supports the novel pathogen hypothesis for the origin of white-nose syndrome. P Natl Acad Sci USA. 109(18):6999–7003.
- Warnecke L, Turner JM, Bollinger TK, Misra V, Cryan PM, Blehert DS, Wibbelt G, Willis CK. 2013. Pathophysiology of white-nose syndrome in bats: a mechanistic model linking wing damage to mortality. Biol Letters. 9(4):20130177.
- Webb PI, Speakman JR, Racey PA. 1996. How hot is a hibernaculum? A review of the temperatures at which bats hibernate. Can J Zool. 74(4):761–765.
- Wibbelt G, Kurth A, Hellmann D, Weishaar M, Barlow A, Veith M, Prüger J, Görföl T, Grosche L, Bontadina F, et al. 2010. White-nose syndrome fungus (*Geomyces destructans*) in bats, Europe. Emerg Infect Dis. 16(8):1237–1242.
- Wibbelt G, Puechmaille SJ, Ohlendorf B, Mühldorfer K, Bosch T, Görföl T, Passior K, Kurth A, Lacreman D, Forget F. 2013. Skin lesions in European hibernating bats associated with *Geomyces destructans*, the etiologic agent of white-nose syndrome. PLoS ONE. 8(9):e74105.
- Wilcox A, Warnecke L, Turner JM, McGuire LP, Jameson JW, Misra V, Bollinger TC, Willis CKR. 2014. Behaviour of hibernating little brown bats experimentally inoculated with the pathogen that causes white-nose syndrome. Anim Behav. 88:157–164.
- Wilder AP, Frick WF, Langwig KE, Kunz TH. 2011. Risk factors associated with mortality from white-nose syndrome among hibernating bat colonies. Biol lett. 7(6):950–953.
- Zukal J, Band'ouchová H, Bartonička T, Berková H, Brack V, Brichta J, Dolinay M, Jaron KS, Kováčová V, Kovařík M, Martínková N, Ondráček K, Řehák Z, Turner GG, Pikula J. 2014. White-Nose Syndrome Fungus: A Generalist Pathogen of Hibernating Bats. PLoS ONE. 9(5):e97224.
- Zukal J, Band'ouchová H, Brichta J, Cmoková A, Jaroň KS, Kolařík M, Kováčová V, Kubátová A, Nováková A, Orlov O, Pikula J, Presetnik P, Šuba J, Zahradníková Jr. A, Martínková N. 2016a. White-nose syndrome without borders: *Pseudogymnoascus destructans* infection tolerated in Europe and Palearctic Asia but not in North America. Scientific reports. 6.
- Zukal J, Berková H, Madaraszová J. 2016b. Flying or sleeping: flight activity of bats in natural cave with confirmed WNS. Folia Zool. 65(1).