

Detekce reprodukční aktivity perlorodky říční *Margaritifera margaritifera* pomocí imunologické reakce jejího hostitele



Ondřej Slavík, Tomáš Veselý, Pavel Horký, Karel Douda, Jitka Kolářová

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE



Detekce reprodukční aktivity perlorodky říční *Margaritifera margaritifera* pomocí imunologické reakce jejího hostitele

Autorský kolektiv: Ondřej Slavík*, Tomáš Veselý‡, Pavel Horký*, Karel Douša*,
Jitka Kolářová #

**Katedra zoologie a rybářství, Česká zemědělská univerzita v Praze, Kamýcká
129, 165 21 Praha 6 – Suchbátov*

‡ Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Hudcova 296/70, 621 00 Brno

*# Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany
vod, Jihočeské výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz a
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický, Zátíší 728/II, 389 25 Vodňany*

Vydala: Katedra zoologie a rybářství, Česká zemědělská univerzita
v Praze, Kamýcká 129, 165 21 Praha 6 – Suchbátov

Vydání: první vydání

Rok vydání: 2016

ISBN

© Česká zemědělská univerzita v Praze

<http://katedry.czu.cz/kzr/>



Tato metodika je určena zejména orgánům ochrany přírody, případně správcům vodních toků a subjektům hospodařícím ve volných vodách ke zjištění reprodukční aktivity kriticky ohrožené perlířodky říční *Margaritifera margaritifera*. Metodika je založená na sledování imunitní reakce hostitele pstruha obecného na přítomnost parazitických vývojových stádií perlířodky. Jedná se tedy o bezkontaktní metodu, která umožňuje hodnotit reprodukční aktivitu perlířodek v místech jejich známého výskytu, a zároveň i ověřit možnosti výskytu perlířodky v nových lokalitách.

Metodika byla zpracována za finanční podpory TA ČR (www.tacr.cz; projekt TB010MZP048).



Obsah

1	Úvod do problematiky	4
2	Metodický postup	6
2.1	Odlov ryb	6
2.2	Odběr a zpracování vzorků krve	7
2.3	Enzymoimunoanalytický test (ELISA)	9
3	Ověření metody v terénu	11
4	Souhrn	12
5	Použitá literatura	13



1 Úvod do problematiky

Perlorodka říční (*Margaritifera margaritifera*; obr. 1) je v Evropě, ale i v celém jejím holarktickém areálu rozšíření kriticky ohroženým druhem mlže (Young, 1991). Početnost jejích populací v posledních desetiletích na většině míst původního výskytu klesla o 80 - 90% (Geist, 2010). V některých oblastech, jako například v Polsku, již zcela vyhynula (Dyduch-Falniowska & Zajac, 2011). Rozšíření a početnost perlorodky v České republice následuje obdobný trend. Z původních statisícových kolonií rozšířených po velké části území ČR (Dyk, 1992) v současné době zbývá několik izolovaných populací situovaných většinou do příhraničních toků v podhorských oblastech. Aktivita vedoucí k ochraně perlorodky a jejího biotopu se v ČR řídí zejména dle Záchranného programu (Švanyga a kol., 2013) v návaznosti na zákon č. 114/1992 sb. o ochraně přírody a krajiny a Evropskou směrnicí o stanovištích 92/43/EEC v rámci soustavy NATURA 2000.



Obr. 1: Perlorodky říční v přirozeném prostředí (foto P. Horký)

Sběr za účelem zisku perel je často uváděn jako počáteční historická příčina poklesu stavu populací perlorodky (např. Moorkens, 1999), nicméně hlavní problémy lze spatřovat v komplexní změně charakteru původních stanovišť. Mezi tradičně uváděné příčiny způsobující



zvýšenou úmrtnost perlorodek patří eutrofizace a chemické znečištění (např. Bauer & Wachtler, 2001), ale i nedostupnost vhodného substrátu v toku v důsledku zvýšené eroze a sedimentace (např. Geist & Auerswald, 2007). Problematické je i narušení vápníkového metabolismu perlorodky v důsledku kyselých dešťů (Hruška, 1998; Frank & Gerstmann, 2007) nebo nedostatek potravního detritu pro jednotlivá vývojová stadia (Hruška 1999, Dort & Hruška 2008; Dort 2009).

Často opomíjeným aspektem ekologie perlorodky, ale i dalších druhů chráněných sladkovodních mlžů, je parazitická fáze jejich vývojových stádií, tzv. glochidií. Tato parazitická fáze je klíčová pro vývoj samostatných juvenilních jedinců a tím i pro obnovu a udržení stavu populací. Hostiteli glochidií jsou ryby, které jim po dobu parazitické fáze poskytují výživu a zároveň umožňují šíření mlžů s jinak omezenou pohybovou kapacitou na větší vzdálenosti (Horký a kol., 2014). Pro úspěšný vývoj parazitického stadia mlžů je klíčová hostitelská kompatibilita. Přítomnost glochidií u hostitelů totiž vyvolává imunologickou reakci, která může vést až k nucenému odpadnutí nedovyvinutých glochidií. Dostupnost vhodných rybích hostitelů je proto zásadní podmínkou pro úspěšnou reprodukci ohrožených mlžů (Douda a kol., 2014). Mezi původní hostitele perlorodky se řadí i hlavatka obecná *Hucho hucho*, L. a losos obecný, *Salmo slar*, L. (Young and Wiliams 1984 a,b). Nicméně jediným v současnosti dostupným hostitelem populací perlorodky přežívajících v malých tocích střední Evropy je pstruh obecný *Salmo trutta*, L. (Bauer 1987b; obr. 2). Je známo, že pstruzi si po invadaci glochidii vytváří částečnou rezistenci proti dalšímu napadení (Bauer 1987a, Bauer and Vogel, 1987). Tuto imunologickou reakci se podařilo poprvé detekovat Slavíkovi a kol. (2010). Díky přítomnosti specifických protilátek v krvi pstruhů je výše citovanou metodou možné hodnotit reprodukční aktivitu perlorodek v místech jejich známého výskytu a zároveň i ověřit možnosti výskytu perlorodky v nových lokalitách.

Tato metodika na základě získaných výsledků optimalizuje původní metodu Slavíka a kol. (2010). Zároveň popisuje přesný postup, který je nutné dodržet pro získání relevantních výsledků při jejím použití.



2 Metodický postup

2.1 Odlov ryb

Těžiště současného výskytu perlorodek v ČR je v podhorských a horských tocích a proto lze jako nejvhodnější metodu získání ryb pro odběry krve a následné imunologické analýzy uvést odlov elektrickým agregátem. Odlov agregátem a nakládání s ulovenými rybami musí být realizované v souladu s platnou legislativou ČR (vyhláška č. 50/1978 Sb. o odborné způsobilosti v elektrotechnice; zákon č. 246/1992 Sb. na ochranu zvířat proti týrání; zákon o rybářství č. 99/2004 Sb.). Podrobnosti o správném postupu při odlovu ryb elektrickým agregátem uvádí např. Randák a kol. (2013). Lze konstatovat, že v malém členitém toku je pro odlov ideální použít přenosný elektrický agregát (např. EFKO FEG 1500; obr. 3), se kterým je lovec pohyblivější. Při použití tohoto typu agregátu je obvykle dostatečná dvou až tříčlenná rybolovná četa.



Obr. 2: Pstruh obecný - hostitel glochidií perlorodky říční (foto P. Horký)

Odlov je vhodné provést šest až osm týdnů po předpokládaném rozmnožování perlorodky v toku, kdy je hladina sledovaných protilátek v krvi pstruhů nejvyšší (protilátky se ale začnou objevovat již cca 3 týdny po setkání pstruha s glochidii). Vzhledem k obvyklému načasování reprodukční aktivity perlorodky je vhodnou dobou pro odlov cca. polovina září. Termín odlovu je ale nutné přizpůsobit vývoji teplot. Ve velmi studených letech, kdy se může vypouštění glochidií posunout až na začátek září, lze doporučit posunutí odlovů na cca.



polovinu října. Při posunutých odlovech je ale nutné počítat s možným vlivem reprodukční migrace invadovaných pstruhů na získané výsledky. Cílem odlovu je získat minimálně patnáct jedinců pstruha z jedné lokality. Velikost pstruhů pro odběry by se měla pohybovat okolo hranice 15 cm celkové délky, aby byl zajištěn minimální negativní vliv odběru krve na další přežití jedince v toku. Na jednom toku s výskytem perlorodky je vhodné tímto způsobem odlovit čtyři až pět lokalit. Lokality by měly být vybrané s ohledem na známý výskyt kolonií perlorodky v toku. Ideální je rovnoměrné rozmístění lokalit nad a pod koloniemi s důrazem na minimální ovlivnění samotných perlorodek.



Obr. 3: Odlov ryb přenosným elektrickým agregátem (foto O. Slavík)

2.2 Odběr a zpracování vzorků krve

Odběr krve pstruhů k imunologickým analýzám se provádí na břehu řeky v místě odlovu. Ryby jsou po odběru vypuštěny zpět do toku. Punkcí kaudální cévy se odebírá minimální množství krve (0,1 -1,3 ml, dle velikosti ryby) (obr. 4). Pstruzi musí být před odebráním krve anestetizováni v souladu se Zákonem na ochranu zvířat proti týrání č. 246/1992 Sb. ve znění pozdějších předpisů. K anestezii je vhodné použít 2-phenoxyethanol, případně další ověřené látky, dle metodiky FROV JU č.77 (Kolářová a kol., 2012).



Na základě optimalizace imunologické metody bylo ověřeno, že pro sledování imunitní reakce pstruha na glochidia perlorodky **je možné kromě krevního séra použít i krevní plazmu** a to se srovnatelným výsledkem. Použití plazmy je výhodné z toho důvodu, že pro získání vzorku dostatečného objemu pro následnou analýzu postačuje menší množství odebrané krve. Použití plazmy rovněž celkově usnadňuje a zjednodušuje odběry krve testovaných ryb a následné zpracování vzorků.

Odběr krve za účelem získání krevního séra nebo krevní plazmy je však metodicky odlišný.

Pro získání **krevního séra** se krev odebírá do odběrového materiálu bez použití protisrážecích prostředků, je ponechána v odběrových zkumavkách 1 hod v klidu a dále inkubována 12 hodin při teplotě 4°C (v terénu se použije chladicí box s ledem). Po 12-tihodinové inkubaci je provedeno odstředění (1000 x g, 15 min, 4°C) a krevní sérum je odsáto mikropipetou. Vzorky krevního séra lze pak skladovat dlouhodobě při -20°C.

Pro získání **krevní plazmy** je nutné použít odběrový materiál (injekční jehly, injekční stříkačky, odběrové zkumavky) ošetřený protisrážecím prostředkem (např. Heparin Léčiva inj., 1x10ml/50KU). Odebranou krev je třeba po jemném promíchání v heparinizované zkumavce odstředit (do 4 000 x g, 10 min) do 1 hodiny po odběru. To znamená, že odstředění krve je obvykle nutné provést přímo v terénu. Pak lze vzorky plazmy umístit do chladicího boxu s ledem, co nejdříve uložit do -20°C a takto skladovat dlouhodobě.



Obr. 4: Odběr krve z kaudální vény v terénu (foto P. Horký)



2.3 Enzymoimunoanalytický test (ELISA)

Vzorky odebraného pstružního séra nebo plazmy jsou následně použité pro vlastní zpracování metodou ELISA (Avrameas and Guilbert, 1971). ELISA je úspěšně používána pro stanovení protilátek experimentálně vakcinovaných druhů ryb (Melingen et al., 1995; Knopf et al., 2000). Podstatou metody je stanovení vazby antigen/protilátka konjugátem vhodným enzymem, který katalyzuje vznik barevného produktu reakcí se substrátem. Základním prvkem metody je adsorpce primární složky na pevném nosiči, kterým je polystyrenová mikrotitrační destička. V rámci optimalizace bylo testováno několik typů destiček a jako nejvhodnější se prokázalo použití *destiček NUNC Maxisorp*, které jsou pro aplikaci této metody doporučené. V průběhu testování byly rovněž vyzkoušené různé způsoby uspořádání enzymoimunoanalytického testu a doporučená byla *přímá sendvičová ELISA*.

Pro účely tohoto specifického ELISA testu prokazujícího výskyt specifických protilátek pstruha obecného po infekci glochidii perlorodky říční je nutné použít antigen, vyšetřované vzorky séra nebo plazmy a peroxidázový konjugát hyperimunního antiséra. Způsob jejich získání/zpracování je uvedený níže.

Antigen

Antigen byl získán z glochidií perlorodky říční (*M. margaritifera*), které byly po zamražení následně rozmrazeny a dezintegrovány ultrazvukem (Artek Sonic Dismembrator, USA; obr. 5a). Sonikace probíhala v ledové tříšti, nejdříve 5 cyklů v trvání 10 sekund při 35% výkonu přístroje, poté dalších 5 cyklů (10 sekund) při výkonu 60%. Následovalo další zamražení a rozmražení (-80°C) a závěrečná sonikace 5 x 10s při 60% výkonu. Takto připravený homogenizát glochidií byl ultracentrifugován (15 000 x g, 15 min., 4°C), rozdělen na alikvoty a skladován zamražen (-20°C) pro použití v ELISA testu.

V průběhu optimalizace metody byl připravený nový antigen, který byl testovaný současně s antigenem dlouhodobě zmrazeným. Mezi výsledky získanými pomocí obou antigenů nebyly nalezené rozdíly. Bylo tak prokázáno, že *antigen lze dlouhodobě skladovat* bez ztráty jeho účinnosti a zároveň byla prokázána stabilita výsledků při využití opakovaně získaného antigenu. Antigen byl v průběhu testování vázán na mikrotitrační desky v různých ředěních, přičemž jako nejvhodnější se prokázalo *ředění 1 : 3 000 ve vazném uhličitanovém pufru pH 9,6*.



Hyperimunní antisérum

Hyperimunní antisérum bylo získané imunizací králíka domácího (*Oryctolagus cuniculus* f. *domestica*; plemeno Novozélandský bílý) pstružím imunoglobulinem (Ig) z krevního séra pstruhů, kteří byli řízeně infikováni glochidii. Imunoglobulin byl připraven trojím srážením séra při 40% nasycení síranem amonným. Po posledním srážení byl vzorek dialyzován proti PBS a koncentrace pstružího Ig měřena fotometricky při 280 nm (19.1mg/ml). Králík byl následně imunizován subkutánně na dvě místa hřbetu pstružím Ig v dávce 900 µg v PBS emulgovaným 1 : 1 ve Freundově kompletním adjuvans (Sigma). Stejná dávka byla použita i pro dvě následné reimunizace, avšak bylo použito Freundovo inkompletní adjuvans (Sigma). Dva týdny po poslední imunizaci byla v anestezii získána krev obsahující specifické protilátky. Z ní bylo připraveno sérum a následně trojím srážením síranem amonným získána IgG frakce. Tato frakce byla zamražena pro další použití při sestavení ELISA metody k průkazu pstružích imunoglobulinů.

Konjugát

Králičí IgG protilátky proti pstružímu Ig (RAIgGAStIg) byly konjugovány perjodátovou metodou (Boorsma & Streefkerk 1979) s křenovou peroxidázou (SIGMA). Přímý peroxidázový konjugát proti pstružímu IgM byl testován v různých ředěních. Bylo stanoveno, že nejvyšší použité **ředění IgM 1 : 6 000** dává dostatečnou odezvu, a proto bylo v optimalizované metodě použito. Testovaná pstruží séra byla při optimalizaci metody rovněž vyšetřována v různém ředění, přičemž jako vhodnější se prokázalo **ředění testovaného séra 1:100**. Pro poslední krok metody a vizualizaci byl použitý substrát obsahující chromogen (TMB) a peroxid vodíku. Enzymatická reakce probíhala 5-10 minut při pokojové teplotě, poté byla reakce zastavena přidáním 100µl 1M kyseliny sírové (obr. 5b). Absorbance vzniklého zabarvení byla měřena na ELISA readeru (obr. 5c) při vlnové délce 450 nm (OD450).

Při optimalizaci ELISA metody byl opakovaně použit panel předpokládaně pozitivních a předpokládaně negativních sér k ověření hodnoty „cut-off“, tedy hranice oddělující pozitivní a negativní imunologickou reakci. Při finálním testování v optimalizované ELISA metodě byla **hodnota cut-off** zvolena **0,200** (obr. 5d). Séra přesahující tuto hodnotu byla hodnocena jako pozitivní.



Obr. 5a: Sonikátor (foto T. Veselý)



Obr. 5b: Jedno a vícekanálové pipety (foto T. Veselý)



Obr. 5c: ELISA reader (foto T. Veselý)



Obr. 5d: zpracování výsledků (foto T. Veselý)

3 Ověření metody v terénu

Celkem bylo v průběhu optimalizace a následného testování metody provedeno ELISA vyšetření u 930 vzorků a to včetně opakovaného vyšetřování kontrolních sér v různých ředěních. Imunologická odpověď pstruhů na infekci glochidii perlorodky byla testována v podélném profilu řeky Blanice, která patří mezi toky s nejvyšší populační hustotou perlorodky ve střední Evropě. Celkově byla prokázána imunitní reakce a tedy kontakt s glochidii perlorodky říční u 62% hodnocených pstruhů. Byla tak úspěšně ověřena funkčnost metody v terénním prostředí a zároveň byla potvrzena reprodukční aktivita perlorodky na významné lokalitě jejího výskytu.



4 Souhrn

Pomocí této metodiky je možné hodnotit reprodukční aktivitu perlorodek v místech jejich známého výskytu, a zároveň i ověřit možnosti výskytu perlorodky v nových lokalitách pomocí specifického antigenu.

Odlov ryb musí proběhnout v období šest až osm týdnů od předpokládaného rozmnožování perlorodky v toku, kdy je hladina sledovaných protilátek v krvi pstruhů nejvyšší. Vzhledem k obvyklé době reprodukční aktivity perlorodky je vhodnou dobou pro odlov cca. polovina září, ale odběry je nutné přizpůsobit teplotnímu průběhu daného roku.

Pro sledování imunitní reakce pstruha na glochidie perlorodky je možné kromě séra použít i krevní plazmu a to se srovnatelným výsledkem.

Nejvhodnější uspořádání enzymoimunanalytického testu je přímá sendvičová ELISA, při které je doporučeno použít destičky NUNC Maxisorp.

Doporučené ředění jednotlivých látek v testu je následující: antigen vázaný na mikrotitrační desky v ředění 1 : 3 000 ve vazném uhličitanovém pufru pH 9,6; přímý peroxidázový konjugát proti pstružimu v ředění IgM 1 : 6 000; testovaná krevní séra (plazma) v ředění 1:100.

Absorbance vzniklého zabarvení je měřena na ELISA readeru při vlnové délce 450 nm (OD450). Hranice oddělující pozitivní a negativní imunologickou reakci (cut-off) byla určena na 0,200. Séra přesahující tuto hodnotu jsou hodnocena jako pozitivní.

Imunologické analýzy v současné době realizuje laboratoř Virových chorob ryb Výzkumného ústavu veterinárního lékařství, v.v.i., pod vedením Ing. Tomáše Veselého, CSc. Cena jedné analýzy předpřipravených vzorků je cca. 300 Kč. Do celkových nákladů je ale nutné zahrnout i odlov ryb, odběr krve a přípravu vzorků, jejichž cena je v závislosti na lokalitě a počtu vzorků cca. 20 - 30 000 Kč.



5 Použitá literatura

- Avrameas, S., & B. Guilbert. 1971. Enzyme Labeled Antibodies for Measurement of Cell Components. *Annales de l Institut Pasteur* 121: 697-714.
- Bauer G. 1987a. The parasitic stage of the freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera* L.) II. Susceptibility of brown trout. *Archiv für Hydrobiologie* 76:403-412.
- Bauer G. 1987b. The parasitic stage of the freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera* L.) III. Host relationship. *Archiv für Hydrobiologie* 76:413-423.
- Bauer, G. & Wächtler, K. 2001. Ecology and Evolution of the freshwater Mussels Unionida; Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Bauer, G. & C. Vogel. 1987. The parasitic stage of the freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera* L.) I. Host response to glochidiosis. *Archiv für Hydrobiologie* 76:393-402. *Archiv für Hydrobiologie* 76:393-402.
- Boersma, D. M., & J. G. Streefkerk. 1979. Periodate Or Glutaraldehyde for Preparing Peroxidase Conjugates. *Journal of Immunological Methods* 30:245-255.
- Dort, B. 2009. Perlorodka říční (*Margaritifera margaritifera* L.) v povodí horního toku Teplé Vltavy. Nепublikovaná zpráva pro NP Šumava, 16 pp.
- Dort, B. & Hruška, J. 2008. Speciální revitalizační studie pramenných oblastí Blanice. Závěrečná zpráva pro AOPK ČR, NP a CHKO ŠUMAVA, 205 pp. + příloha CD, nēpublikováno depon in AOPK ČR
- Douda, K., Sell, J., Kubikova-Pelakova, L., Horky, P., Kaczmarczyk, A., & Mioduchowska, M. 2014. Host compatibility as a critical factor in management unit recognition: population-level differences in mussel-fish relationships. *Journal of Applied Ecology*, 51: 1085–1095.
- Dyduch-Falniowska, A. Zając, Katarzyna 2011. Polska Czerwona Księga Zwierząt: *Margaritifera margaritifera* (Linneaus, 1758). Instytut Ochrony Przyrody PAN. [dostę 6 października 2011].
- Dyk, V. 1992. Profilová ohrožovatelé lokalit perlorodky říční. *Erica, Plzeň*, 1: 21-38



- Frank, H. & Gerstmann, S. 2007. Declining populations of freshwater pearl mussels (*Margaritifera margaritifera*) are burdened with heavy metals and DDT/DDE. *Ambio* 36, 571-574.
- Geist J. & Auerswald K. 2007. Physicochemical stream bed characteristics and recruitment of the freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera*). *Freshwater Biology*, 52: 2299-2316.
- Geist, J. 2010. Strategy for the conservation of endangered freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera* L.): a synthesis of conservation genetics and ecology. *Hydrobiologia* 664:69-88.
- Horký, P. Douda, K., Maciak, M. Závorka, L. & Slavík, O. 2014. Parasite-induced alterations of host behaviour in a riverine fish: the effects of glochidia on host dispersal. *Freshwater Biology*, 59: 1452–1461.
- Hruška, J. 1998. Záchrana genofondu oligotrofních vod v ČR metodou aktivní ochrany biotopu a populace perlorodky říční a Realizace projektu komplexní péče o NNP Blanice - hydrologický rok 1997-1998. Výsledná zpráva programu *Margaritifera* za období 11/1997 - 10 1998. *Nature Management, Volary*.
- Hruška, J. 1999. Nahrungsansprüche der Flußperlmuschel und deren halbnatürliche Aufzucht in der Tschechischen Republik. *Heldia*, Band 4, Sonderheft 6, München: 69 – 79.
- Knopf, K., K. Naser, M. H. T. van der Heijden, & H. Taraschewski. 2000. Evaluation of an ELISA and immunoblotting for studying the humoral immune response in *Anguillicola crassus* infected European eel *Anguilla anguilla*. *Diseases of Aquatic Organisms* 43:39-48.
- Kolářová, J., Velíšek, J., Nepejchalová, L., Svobodová, Z., Kouřil, J., Hamáčková, J., Máchová, J., Piačková, V., Hajšlová, J., Holadová, K., Kocourek, V., Klimánková, E., Modrá, H., Dobšíková, R., Groch, L. & Novotný, L., 2012. *Anestetika pro ryby* (aktualizované vydání z roku 2007). Edice Metodik, FROV JU, Vodňany, č. 77, 25 s.
- Meltingen, G. O., S. O. Stefansson, A. Berg, & H. I. Wergeland. 1995. Changes in Serum-Protein and IgM Concentration During Smolting and Early Post-Smolt Period in Vaccinated and Unvaccinated Atlantic Salmon (*Salmo-Salar* L). *Fish & Shellfish Immunology* 5:211-221.



- Moorkens E. A. 1999. Conservation Management of the Freshwater Pearl Musel *Margaritifera margaritifera*. Part 1: Biology of the species and its present situation in Ireland. Irish Wildlife Manuals, No. 8, 4–31.
- Randák, T. a kol. 2013. Rybářství ve volných vodách. Vodňany. 438 s., ISBN 978-80-87437-50-6
- Slavík, O. a kol. 2010. Hodnocení přítomnosti a reprodukční aktivity perlorodky říční (*Margaritifera margaritifera*) v říčním toku prostřednictvím analýzy krve pstruhů obecných (*Salmo trutta m. fario*). Závěrečná zpráva pro Norské Fondy. MŽP, Odbor péče o krajinu, 26 stran.
- Švanyga J. a kol. 2013. Záchranný program perlorodky říční *Margaritifera margaritifera* v České republice. AOPK ČR.
- Young, M. R. 1991. Conserving the freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera* L.) in the British Isles and continental Europe. Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems 1: 73-77.
- Young, M. R. & J. Williams. 1984a. The reproductive biology of the freshwater pearl musel *Margaritifera margaritifera* (Linn) in Scotland – I. Field studies. Archiv für Hydrobiologie 99:405-422.
- Young, M. R. & J. Williams. 1984b. The reproductive biology of the freshwater pearl musel *Margaritifera margaritifera* (Linn) in Scotland – II. Laboratory studies. Archiv für Hydrobiologie 100:29-43.