NACIONALNI INŠTITUT ZA **BIOLOGIJO**
NATIONAL INSTITUTE OF **BIOLOGY**

eRAKI: Vzpostavitev biomonitoringa naslednje generacije za spremljanje povzročitelja račje kuge (*Aphanomyces astaci*) in tujerodnih rakov

VMESNO POROČILO

Ljubljana
15. oktober 2026
št. 1681/2026

Večna pot 121, SI-1000 Ljubljana
T +386 (0)59 232 701, **E** tajnistvo@nib.si, **www.nib.si**

ISO 9001 Q-688

NALOGA:	**eRAKI: Vzpostavitev biomonitoringa naslednje generacije za spremljanje povzročitelja račje kuge (*Aphanomyces astaci*) in tujerodnih rakov (CRP V1-2526)**
FINANCER:	**Ministrstvo za okolje in prostor** **Dunajska cesta 48** **1000 Ljubljana** **Vsebinska spremljevalka na MOP: Branka Tavzes** **Javna agencija za znanstvenoraziskovalno in inovacijsko dejavnost Republike Slovenije** **Bleiweisova cesta 30** **1000 Ljubljana**
IZVAJALEC:	**Nacionalni inštitut za biologijo (NIB)** **Oddelek za raziskave organizmov in ekosistemov** **Večna pot 121** **SI-1000 Ljubljana**
PROJEKT:	**POGODBA št. C2560-25-310012**
DELOVNA SKUPINA:	**dr. David Stanković, univ. dipl. biol.** **dr. Tijana Veličković, magister biologije** **dr. Matjaž Bedjanič, univ. dipl. biol.** **dr. Al Vrezec, univ. dipl. biol.**
KONTAKT:	T: 059 23 27 31 E: david.stankovic@nib.si

David Stanković

Digitalno podpisal David Stanković
Datum: 2026.11.04 13:58:28 +01'00'

Datum:
Ljubljana, 15.10.2026

KAZALO

1. PODATKI O PROJEKTU 4
2. POVZETEK 5
3. OPISNO POROČILO O REALIZACIJI PREDLOŽENEGA PROGRAMA DELA 7
3.1. DS1: Vzpostavitev standardiziranega sistema za detekcijo *A. astaci* na osnovi eDNA oz. DNA 7
3.2. DS2: Vzpostavitev sistema za genotipizacijo *A. astaci* na osnovi eDNA in DNA 17
3.3. DS3: Vzpostavitev standardiziranega sistema za detekcijo tujerodnih vrst rakov na osnovi eDNA 27
3.4. DS4: Uporaba DNA in eDNA metodologije za monitoring tujerodnih rakov in povzročitelja račje kuge 29
4. ODSTOPI OD PREDVIDENEGA PROGRAMA DELA 30
5. DISEMINACIJA 30
6. PRILOGA 30
7. LITERATURA 30

1. PODATKI O PROJEKTU

1. Šifra (ARRS) ter naziv izvajalca in soizvajalcev projekta (raziskovalne organizacije):

105	Nacionalni inštitut za biologijo
0510-0406	Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta

2. Šifra projekta:

V1-2526, POGODBA št. C2560-25-310012 (MOP)

3. Naslov projekta

3.1. Naslov projekta v slovenskem jeziku:

eRAKI: Vzpostavitev biomonitoringa naslednje generacije za spremljanje povzročitelja račje kuge (*Aphanomyces astaci*) in tujerodnih rakov (CRP V1-2526)

3.2. Naslov projekta v angleškem jeziku:

Establishing a Next-Generation Biomonitoring Program for the Surveillance of *Aphanomyces astaci*, the Causative Agent of Crayfish Plague, and Invasive Crayfish

4. Ključne besede projekta v slovenskem jeziku

4.1. Ključne besede v slovenskem jeziku

Okoljska DNK, eDNA, *Aphanomyces astaci*, genotipizacija, potočni raki, raki deseteronožci, izumiranje vrst, Natura 2000, zavarovana območja, ogrožene vrste, invazivne tujerodne vrste, IAS, račja kuga, biodiverziteta, oomicete, program upravljanja območij Natura 2000

3.4. Ključne besede v angleškem jeziku

Environmental DNA, eDNA, *Aphanomyces astaci*, Genotyping, Crayfish, Decapods, Species Extinction, Natura 2000, Nature Protected Areas, Endangered Species, Invasive Alien Species, IAS, Crayfish Plague, Biodiversity, Oomycetes, The Natura 2000 Management Programme

5. Šifri ter imeni in priimka vodij projekta:

33151	dr. David Stanković – vodja na NIB
24296	Dr. Darja Kušar – vodja na VF

2. POVZETEK

V Sloveniji je bilo v naravi doslej zabeleženih več tujerodnih vrst potočnih rakov: signalni rak (*Pacifastacus leniusculus*), trnavec (*Faxonius limosus*), močvirski škarjar (*Procambarus clarkii*), ozkoškarjevec (*Pontastacus leptodactylus*) in rdečeškarjevec (*Cherax quadricarinatus*), morebiti pa tudi marmornati škarjar (*Procambarus virginalis*). Pričakovati je tudi njihovo nadaljnje širjenje iz sosednjih držav in morebitne vnose novih vrst. Tujerodni raki predstavljajo dvojno grožnjo: lahko so prenašalci in rezervoarji povzročitelja račje kuge, oomicete *Aphanomyces astaci*, hkrati pa domorodnim vrstam konkurirajo za življenjski prostor in vire ali jih plenijo. Skupaj z degradacijo habitatov in onesnaževanjem so tujerodni raki in bolezni, ki jih prenašajo, med glavnimi dejavniki upadanja domorodnih vrst potočnih rakov. Mednje spadajo jelševec (*Astacus astacus*), koščak (*Austropotamobius torrentium*) in koščenec (*Austropotamobius pallipes*). Vse tri vrste so zavarovane s slovensko zakonodajo, zadnji dve pa sta uvrščeni tudi v prilogi II in V Direktive EU o habitatih. Slovenija mora zato zagotavljati njuno ugodno stanje ohranjenosti. Zaskrbljujoče je, da sta njuni stanji ocenjeni kot neugodni (U1), lokalne populacije pa so izginile na 45 % vzorčnih mest, vključenih v monitoring.

Ciljni raziskovalni projekt (CRP) »eRAKI: Vzpostavitev biomonitoringa naslednje generacije za spremljanje povzročitelja račje kuge (*Aphanomyces astaci)* in tujerodnih rakov« naslavlja pomembne izzive varstva biotske raznovrstnosti v Sloveniji. Njegov namen je vzpostaviti standardizirane molekularne pristope za zgodnje odkrivanje in genotipizacijo *A. astaci* ter zaznavanje tujerodnih rakov na podlagi okoljske DNA (eDNA). Ti pristopi omogočajo neinvazivno in stroškovno učinkovito spremljanje, ki je ključno za pravočasno ukrepanje. Glavni cilji projekta so: (1) vzpostavitev sistema za zaznavanje *A. astaci* z analizo eDNA; (2) razvoj sistema za genotipizacijo *A. astaci* iz okuženih rakov in okoljskih vzorcev; (3) izvedba nacionalnega presečnega pregleda prisotnosti in genotipov *A. astaci*; (4) priprava sheme monitoringa račje kuge ter (5) vzpostavitev standardiziranega sistema za zaznavanje tujerodnih rakov z analizo eDNA.

Projekt je razdeljen na štiri delovne sklope. Prvi je namenjen vzpostavitvi standardiziranega sistema za zaznavanje *A. astaci* z analizo eDNA oziroma DNA. V prvem letu smo razvijali protokole za analizo vzorcev vode in neinvazivno odvzetih brisov, pripravljali postopke za določitev meje zaznave s kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo (qPCR) ter delovne različice protokolov preizkusili na izbranih lokacijah v Sloveniji. *A. astaci* smo uspešno zaznali v vzorcih eDNA z območij, kjer je bila prisotnost oomicete znana že prej (Črna mlaka pri Lopati, gramoznice pri Bukovcih, Drava in Ceršak), ter z območij, na katerih smo jo ugotovili na novo (Sušnica severno od Lopate, Koprivnica pod Šmartinskim jezerom in pritoki Savinje južno od Laškega). Ker je za interpretacijo rezultatov pomemben tudi ažuren podatek o

prisotnosti domorodnih rakov, smo razvili dodatne protokole za njihovo zaznavanje z eDNA in jih združili v dva dupleksna testa qPCR: za sočasno zaznavanje koščaka in jelševca oziroma koščenca in jelševca.

Drugi delovni sklop je namenjen vzpostavitvi sistema za genotipizacijo *A. astaci* na podlagi eDNA in DNA. V prvem letu smo razvijali in preizkušali protokole ter izvedli pilotno genotipizacijo na območju Lopate in v Sušnici severno od Lopate, kjer smo zabeležili pogin koščakov. Analiza vzorcev DNA in eDNA iz potoka Črna mlaka pri Lopati je potrdila prisotnost genotipa D, ki ga prenaša močvirski škarjar. V vzorcih DNA iz Sušnice smo potrdili genotip A, ki je prisoten pri domorodnih vrstah rakov; v vzorcih eDNA pa smo poleg genotipa A v enem vzorcu zaznali tudi genotip D.
Tretji delovni sklop je namenjen vzpostavitvi standardiziranega sistema za zaznavanje tujerodnih vrst rakov z analizo eDNA. V prvem letu smo razvili in preizkusili protokole za štiri vrste – signalnega raka, trnavca, močvirskega škarjarja in rdečeškarjevca – ter določali meje zaznave testov qPCR. Za prve tri vrste smo razvili tudi kombinirani test qPCR za sočasno preverjanje prisotnosti več vrst.

Četrti delovni sklop je namenjen uporabi metod DNA in eDNA pri spremljanju tujerodnih rakov in povzročitelja račje kuge. V prvem letu smo pripravili popis in zbrali razpoložljive arhivske tkivne vzorce potočnih rakov, ki so bili v preteklih letih v Sloveniji testirani za prisotnost *A. astaci*. Uporabili jih bomo za presečni pregled razširjenosti genotipov *A. astaci* v Sloveniji.

3. OPISNO POROČILO O REALIZACIJI PREDLOŽENEGA PROGRAMA DELA

Raziskovalni projekt obsega štiri delovne sklope. V nadaljevanju predstavljamo dejavnosti, opravljene v prvem letu izvajanja projekta, po posameznih sklopih.

3.1. DS1: Vzpostavitev standardiziranega sistema za detekcijo *A. astaci* na osnovi eDNA oz. DNA

Namen tega delovnega sklopa je vpeljati, validirati in optimizirati pristope na osnovi eDNA za odkrivanje in spremljanje povzročitelja račje kuge, *A. astaci*, v slovenskih vodotokih. Specifični cilji delovnega sklopa so:

- razvoj robustnega in praktičnega protokola za vzorčenje, izolacijo in analizo eDNA za namen rutinske detekcije *A. astaci* s testom qPCR;
- določitev spodnje meje detekcije testa qPCR za *A. astaci*;
- preizkus protokola v različnih tipih vodotokov v Sloveniji, kjer je bila v preteklosti potrjena prisotnost *A. astaci* ali prisotnost populacij tujerodnih rakov;
- ocena sezonske dinamike zaznave *A. astaci* na osnovi eDNA; in
- interpretacija zaznavanja *A. astaci* preko eDNA.

<u>V prvem letu izvajanja raziskovalnega projekta so bile izvedene naslednje dejavnosti.</u>

DS1.1: DOLOČITEV MEST VZORČENJA

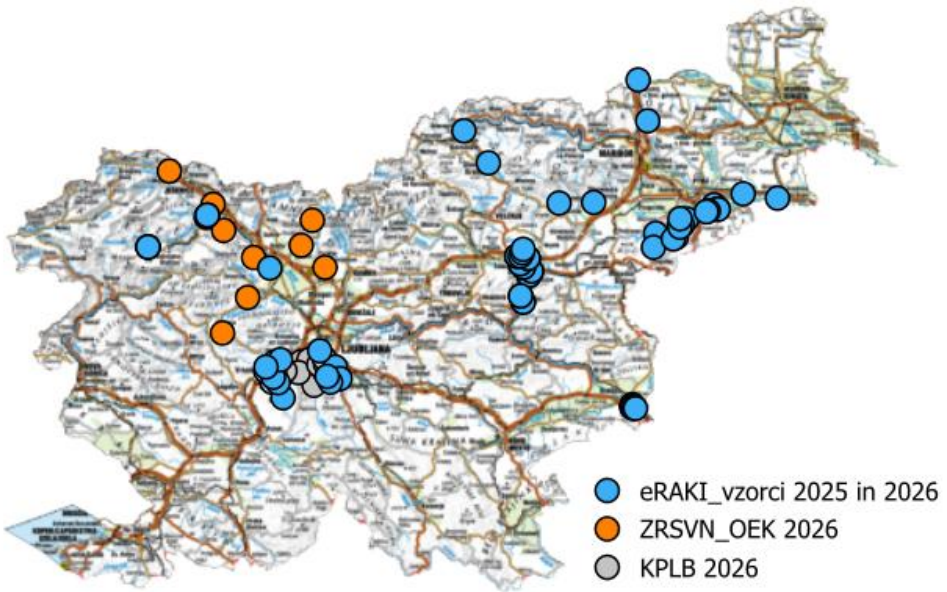
Optimizacija in testiranje razvitih protokolov sta potekala na vzorčnih mestih, na katerih smo v preteklosti zabeležili (latentno) okužbo z *A. astaci* ali izbruh račje kuge oziroma je bila tam znana prisotnost tujerodnih rakov. V prvem letu izvajanja projekta je vzorčenje za potrebe zaznavanja *A. astaci* z analizo eDNA potekalo na naslednjih vzorčnih mestih (slika 1):

- Širše območje počivališča Lopata – potok Črna mlaka, Sušnica s pritoki južno in severno od avtoceste, Šmartinsko jezero, pritoki Savinje nizvodno od vtoka Koprivnice. Pri izboru teh mest smo se povezali tudi z Zavodom za ribištvo (ZZRS). Del vzorčnih mest je bil vzorčen v sklopu strokovnih nalog za ZZRS v letu 2025 in 2026, a so analize eDNA za ugotavljanje prisotnost *A. astaci* del projekta eRAKI.
- Dravinja/Drava – gramoznice ob Dravi v Bukovcih, Dravinja pri Zg. Pristavi, pri Vidmu pri Ptuju in pri Loški Gori, potok Peklača, Pesnica pri Pesniškem Dvoru in Forminu, Ložnica, Drava pri Markovcih in pri Ormožu. Ta mesta vzorčenja so bila deloma izbrana v sinergiji s projektom LIFE-IP NATURA.SI in deloma v povezavi z raziskovalnim projektom

Opredelitev in dinamika viromov pri uspešnih invazivnih vrstah rakov (N1-0441). Georeferencirani podatki o vseh vzorčnih mestih so navedeni v prilogi.

- Mura – potok Ceršak. To vzorčno mesto je bilo izbrano v sinergiji s projektom N1-0441.
- Mrtvica Topla struga. To vzorčno mesto je bilo vzorčeno v povezavi z raziskovalnim projektom Vpliv virusov neavtohtonih rakov na ogrožene evropske rake (N1-0532).
- Sava Bohinjka na iztoku iz Bohinjskega jezera in Jezernica na iztoku iz Blejskega jezera.
- Mislinja – pri Otiškem vrhu in pri Mali vasi.
- Ljubljansko barje. Mesta so bila v letu 2025 vzorčena v sklopu strokovne naloge za Krajinski Park Ljubljnsko barje, a so analize eDNA za prisotnost *A. astaci* del projekta eRAKI.

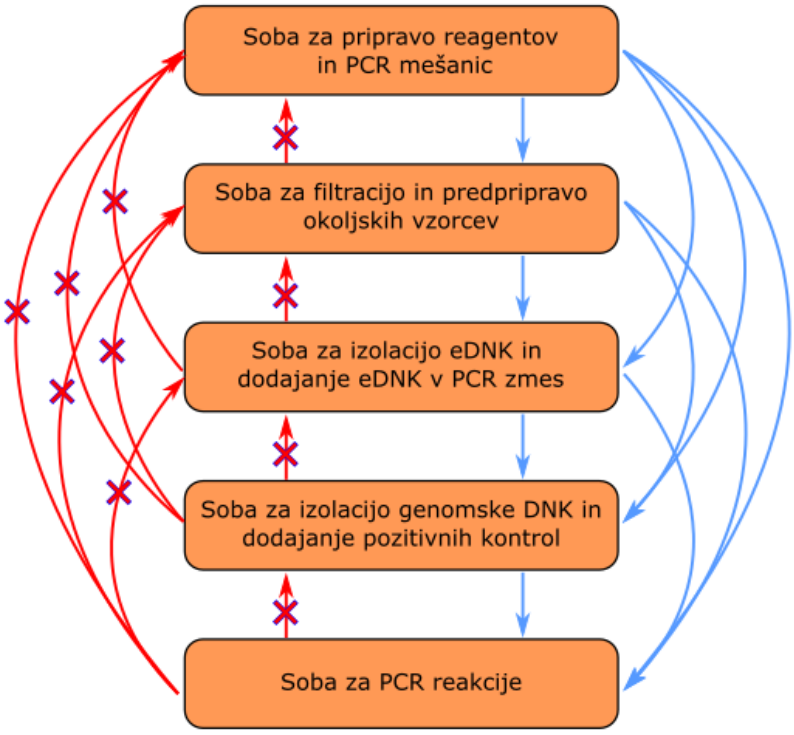
Poleg navedenih lokacij smo v okviru strokovne naloge za Krajinski park Ljubljansko barje za prisotnost *A. astaci* v letu 2026 analizirali še 20 vzorčnih mest na Ljubljanskem barju. V okviru strokovne naloge za ZRSVN (OE Kranj), povezane s projektom Interreg SI–AT BIOdiverseWetNet, smo v letu 2026 vzorčili in analizirali še 10 vzorčnih mest na Gorenjskem (slika 1).



Slika 1. Zemljevid z vzorčnimi mesti za detekcijo *A. astaci* z analizo eDNA, ki smo jih obiskali v prvem letu projekta. Modro označena mesta smo vzorčili izključno v sklopu projekta eRAKI, oranžno označena mesta smo vzorčili v sklopu strokovne naloge za KPLB in sivo označena mesta pa v sklopu strokovne naloge za ZRSVN.

DS1.3: RAZVOJ PROTOKOLA eDNA ZA DETEKCIJO *A. astaci*

Pri analizah okoljske DNA je treba upoštevati priporočila dobre laboratorijske prakse (Gingera, 2018), ki zmanjšujejo tveganje kontaminacije in razgradnje eDNA ter s tem pojav lažno pozitivnih in lažno negativnih rezultatov. Za posamezne faze dela priporočamo uporabo ločenih laboratorijskih prostorov: filtracijo vzorcev (ki jo je mogoče izvesti tudi na terenu), izolacijo eDNA iz filtrov, pripravo reakcijskih mešanic PCR, dodajanje pozitivnih kontrol in analizo po PCR (slika 2). Priporočamo, da je oprema za analize eDNA namenjena izključno temu delu in se ne uporablja za izolacijo tkivne DNA ali analizo produktov PCR. Vso opremo in delovne površine je treba redno čistiti in jih po vsaki uporabi dekontaminirati, da odstranimo morebitne ostanke nukleinskih kislin. Za dekontaminacijo lahko uporabljamo natrijev hipoklorit (varikina) v sveže pripravljeni 10–20-odstotni razredčitvi (Champlot et al. 2010). Kovinske in steklene pripomočke lahko dodatno suho steriliziramo vsaj 4 ure pri 185 °C (Blumberg 1987). V vseh postopkih moramo za preprečevanje kontaminacije z aerosoli uporabljati konice pipet s filtri. Rokavice menjamo med vzorci. Za zmanjšanje navzkrižne kontaminacije imamo pri vsakem koraku analize hkrati odprto le eno mikroepruveto z vzorcem. Za prepoznavanje morebitnih lažno pozitivnih vzorcev, ki so posledica kontaminacije eDNA, v vseh korakih (filtriranje, izolacija eDNA, qPCR testi) uporabljamo slepo oz. negativno kontrolo. Za preverjanje delovanja reakcij v analize vključimo tudi pozitivne kontrole.

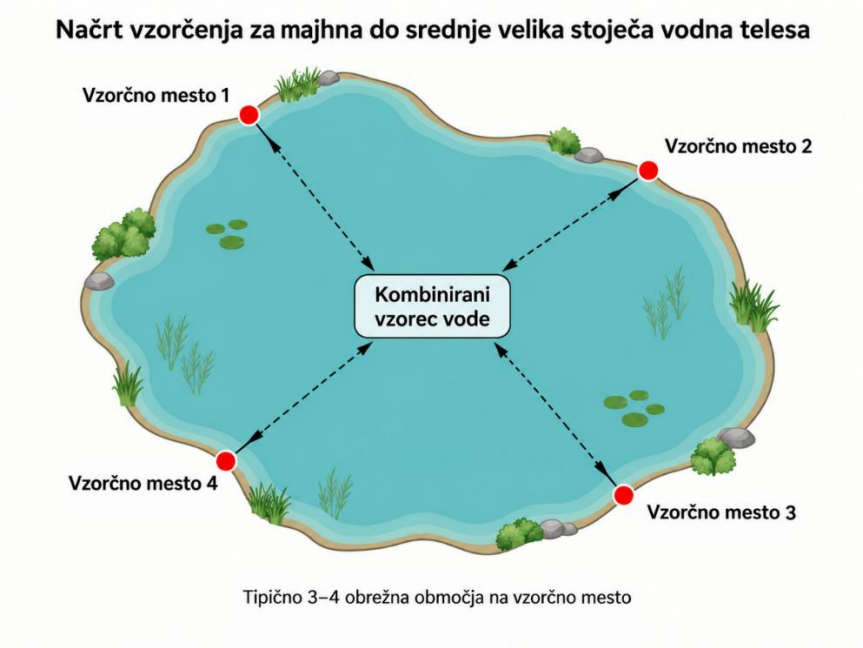


Slika 2. Shema razporeditve laboratorijskih prostorov za analize eDNA. Enosmerni potek dela zmanjšuje tveganje kontaminacije z DNA, zlasti s produkti PCR. Prenos materiala je dovoljen le v smeri modrih puščic; prenos v smeri rdečih puščic lahko povzroči kontaminacijo s tarčno DNA.

V sklopu raziskovalnega projekta smo v prvem letu razvili praktične in robustne protokole za vzorčenje, izolacijo in analizo okoljske DNA za detekcijo *A. astaci*. Trenutno uporabljamo delovno različico protokola, ki ga bomo do naslednje sezone vzorčenja še optimizirali. V nadaljevanju predstavljamo povzetke posameznih postopkov.

Vzorčenje

Čas vzorčenja je pri analizah eDNA pomemben dejavnik. Za vzorčenje sta praviloma najprimernejši pozna pomlad oziroma zgodnje poletje ter pozno poletje oziroma jesen. Manj primerna sta zima, ko so raki manj aktivni, in višek poletja, ko lahko visoke temperature ter povečana mikrobiološka aktivnost pospešijo razgradnjo eDNA. Poleti so lahko v vodi prisotne tudi večje količine organskih snovi, ki zavirajo reakcije PCR (npr. huminske kisline in tanini; Blabolil in sod., 2022). Praviloma odvzamemo 3–10 L vode v dekontaminirane plastične posode, ki jih na vzorčnem mestu predhodno speremo z lokalno vodo. Vodo zajemamo z obale in pri tem pazimo, da ne vzvrtinčimo sedimenta. V manjših hitro tekočih potokih je lahko zadosten odvzem na enem reprezentativnem mestu, v počasi tekočih in večjih vodotokih pa je priporočljivo združiti prostorsko ločene podvzorce. Njihovo število in razporeditev prilagodimo velikosti in dostopnosti vodotoka ter heterogenosti habitata. Točke odvzema naj bodo ekološko relevantne za potočne rake, na primer ob bregovih, kamnih, potopljenih strukturah ali drugih primernih skrivališčih. V manjših do srednje velikih stoječih vodah (ribniki, gramoznice, mlake) izberemo približno tri do štiri prostorsko ločene obrežne odseke oziroma druga reprezentativna območja (slika 3). V velikih ali zelo heterogenih vodnih telesih posamezne odseke obravnavamo kot ločena vzorčna mesta.



Slika 3: Shema vzorčenja majhnih do srednje velikih stoječih vodnih teles.

Pri odvzemu vode poskrbimo, da vzorec vsebuje čim manj nepotrebnih suspendiranih delcev, zato se izogibamo vzorčenju neposredno po:

- hoji po strugi;
- premikanju kamnov;
- lovljenju rakov s pastmi ali mrežo na vzorčnem mestu;
- drugih dejavnostih, ki močno premešajo sediment.

Če je bil sediment pred kratkim premešan, počakamo, da se večji delci posedejo, ali odvzamemo vodo na drugi bližnji točki.

Kadar je mogoče, odvzamemo razmeroma bistro vodo iz vodnega stolpca in se izogibamo neposrednemu zajemanju sedimenta, saj lahko suspendirani delci in z njimi povezane spojine, kot so huminske snovi, motijo nadaljnje molekularne analize. Podobno tudi proizvajalec filtrirnega sistema odsvetuje vzorčenje neposredno po motenju sedimenta oziroma zajemanje vode z veliko suspendiranimi delci.

Za preprečevanje prenosa oomicete A. astaci je ključna dekontaminacija oziroma zamenjava obutve med vzorčenjem različnih območij, na primer porečij.

Filtracijo praviloma izvajamo v laboratoriju, mogoče pa jo je opraviti tudi na terenu. Vzorce vode do filtracije zaščitimo pred svetlobo in jih po vzorčenju prepeljemo v laboratorij. Vse vzorce filtriramo na dan odvzema. Uporabljamo peristaltično črpalko, ki omogoča sočasno filtracijo več vzorcev. Ob vsakem sklopu filtriranja vključimo negativno kontrolo, in sicer 0,5 L deionizirane vode. Vzorce filtriramo v dveh tehničnih ponovitvah. Za manjše vodotoke uporabljamo diskovne filtre iz steklenih mikrovlaken z velikostjo por 1,5 µm in filtre iz mešanih celuloznih estrov z velikostjo por 1,2 µm. Za večja vodna telesa (npr. Drava, Dravinja in gramoznica Trebež) uporabljamo tudi filtrirne kapsule Sylphium (velikost por 0,8–5 µm), ki omogočajo filtracijo večjih količin vode. Po filtraciji iz filtrov odstranimo čim več preostale vode. Diskovne filtre do izolacije eDNA hranimo pri −20 °C, kapsule Sylphium pa konzerviramo z namenskim pufrom in jih lahko krajši čas shranjujemo v hladilniku (slika 4).



Slika 4. Prikaz filtriranja vzorcev. Analiza eDNA je sledila enosmernemu delovnemu toku skozi ločene prostore – filtriranje poteka v prvem prostoru.

Izolacija

Za izolacijo eDNA z diskovnih filtrov uporabljamo napravo za avtomatizirano izolacijo nukleinskih kislin Maxwell RSC 48 (Promega) s kompletom reagentov »Maxwell® RSC PureFood GMO and Authentication Kit« po protokolu za »Automated Purification of Fish eDNA from Pond Water (Promega)«. V vsak vzorec vključimo polovico filtra z velikostjo por 1,2 µm in polovico filtra z velikostjo por 1,5 µm. Za homogenizacijo filtrov uporabljamo mehanski homogenizator Bead Mill MAX (VWR) – v vsak vzorec dodamo dekontaminirano kroglico iz nerjavečega jekla (4,5 mm) in dekontaminirano keramično kroglico (1,2 mm) ter vzorec stresamo dvakrat po pol minute pri hitrosti 4,5 m/s. Po mehanski homogenizaciji v vsak vzorec dodamo še proteinazo K in vzorec inkubiramo. V vsako izolacijo dodamo še negativno kontrolo filtracije. Izolirano eDNA do analize qPCR hranimo pri −20 °C.

Izolacijo eDNA iz filtrov Sylphium izvajamo po protokolu proizvajalca (Sylphium, 2024).

Test qPCR

Za zaznavanje *A. astaci* v vzorcih eDNA uporabljamo vrstno specifični test qPCR s hidrolizno sondo TaqMan MGB, ki so ga opisali Strand in sod. (2023; preglednica 1). Test pomnožuje 131 bp dolg odsek regije ITS. Nadomešča predhodno uporabljeni test Vrålstada in sod. (2009), saj je bolj specifičen in ne pomnožuje DNA drugih vrst rodu *Aphanomyces*, ki niso povezane z izbruhi račje kuge, na primer *Aphanomyces fennicus*.

Preglednica 1. Zaporedja uporabljenih oligonukleotidnih začetnikov in sonde, uporabljenih za detekcijo *A. astaci*. Pričakovana dolžina pomnoženega odseka je 131 bp.

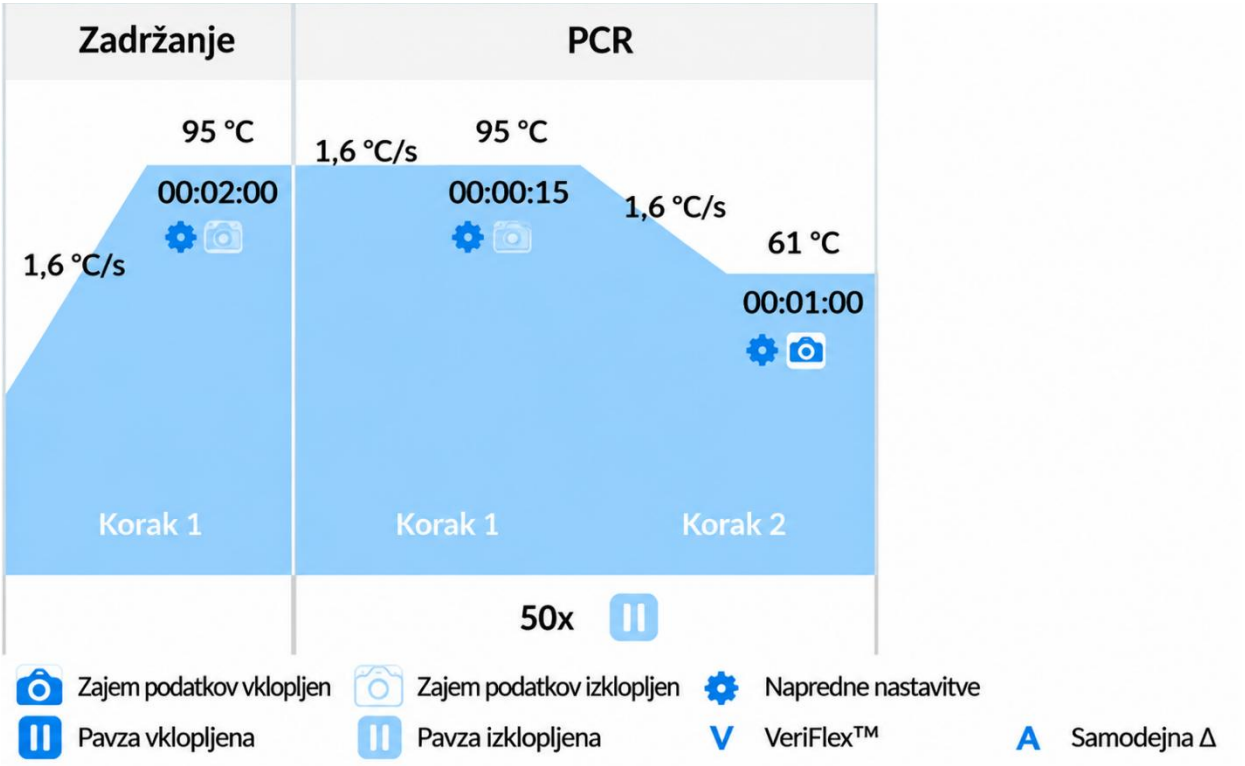
Oligonukleotid	*Zaporedje (5'-3')*	*Končna konc. [µM]*	*Vir*
AphAstITS_15F	TATCCACGTGAATGTATTCTTTAT	0,4 µM	Strand in sod. (2023)
AphAstITS_145R	GCTAAGTTTATCAGTATGTTATTTA	0,4 µM	
AphAstITS_61T	FAM:AAGAACATCCCAGCAC:MGBEQ	0,1 µM	

Vsak vzorec eDNA najprej analiziramo v štirih ponovitvah (preglednica 2). Vzorce brez zaznanega signala *A. astaci* dodatno analiziramo v dveh ponovitvah po predhodni trikratni razredčitvi. Obvezno vključimo negativne kontrole filtracije in izolacije DNA, negativne kontrole qPCR (brez matrične DNA) ter pozitivno kontrolo, pripravljeno iz tkiva okuženega potočnega raka ali sintetične DNA.

Reakcije izvajamo v končnem volumnu 12 µL, ki vsebujejo 6 µL reakcijske mešanice 2× PerfeCTa qPCR ToughMix (Quantabio), začetne oligonukleotide in sondo v koncentracijah iz preglednice 1 ter 2,5 µL izolirane eDNA. Temperaturni program obsega začetno denaturacijo pri 95 °C za 2 minuti, ki ji sledi 50 ciklov denaturacije pri 95 °C za 15 sekund ter prileganja začetnih oligonukleotidov in podaljševanja pri 61 °C za 1 minuto (slika 5). Fluorescenco merimo pri 61 °C.

Analizo je treba ponoviti, če pozitivne kontrole ne pokažejo pričakovanega pomnoževanja ali če se v negativnih kontrolah pojavi signal, značilen za *A. astaci*.

Pri vseh pozitivnih kontrolah smo zaznali pričakovano pomnoževanje tarčne DNA, medtem ko pri negativnih kontrolah pomnoževanja nismo zaznali. Za zmanjšanje tveganja navzkrižne kontaminacije smo laboratorijske postopke izvajali po enosmernem delovnem procesu v fizično ločenih prostorih za filtracijo, izolacijo DNA, pripravo reakcijskih mešanic, dodajanje matrične DNA, dodajanje pozitivnih kontrol in analizo qPCR.



Slika 5. Shema temperaturnih pogojev za analizo eDNA vzorcev s qPCR testom.

Preglednica 2. Primer razporeditve reakcij na plošči za zaznavanje *A. astaci* z analizo eDNA in testom qPCR. Razporeditev omogoča sočasno analizo 20 vzorčnih mest v štirih ponovitvah. Vključene so štiri negativne kontrole (voda za molekularne analize oziroma kontrola filtracije) in pozitivne kontrole z DNA *A. astaci*, izolirano iz tkiva okuženega raka; X – prazno mesto.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Lok 2	Lok 4	Lok 6	Lok 8	Lok 10	Lok 12	Lok 14	Lok 16	Lok 18	Lok 20	neg filt	poz kontrola
B												
C												
D												
E	Lok 1	Lok 3	Lok 5	Lok 7	Lok 9	Lok 11	Lok 13	Lok 15	Lok 17	Lok 19	neg PCR	X
F												X
G												X
H												X

DS1.4: KONVENCIONALNO VZORČENJE IN DETEKCIJA *A. astaci*

Za primerjavo zaznavanja *A. astaci* z analizo eDNA in konvencionalnimi pristopi smo na lokacijah z znano prisotnostjo tujerodnih rakov izvedli vzorčenje oziroma v sodelovanju z ZZRS pridobili tkivne vzorce z naslednjih mest (slika 6):

- Potok Črna mlaka – močvirski škarjar;
- Gramoznice Tepež ob Dravi v Bukovcih – trnavec;
- Drava pri Markovcih – signalni rak;
- Potok Ceršak – signalni rak
- Ribnik Lava – ozkoškarjevec
- Reka Pivka – ozkoškarjevec;

V mrtvici Topla struga pri Čatežu smo poskusili vzorčiti tudi rdečeškarjevca. Postavili smo 44 vrš, vendar nismo ujeli nobenega osebka. Da bi preverili, ali je vrsta na tej lokaciji dejansko izginila, bomo opravili še analizo eDNA; vzorci vode so že filtrirani.

Poleg tkivnih vzorcev smo signalne rake iz Drave pri Markovcih in iz potoka Ceršak vzorčili tudi z neinvazivnim postopkom, in sicer z odvzemom brisov (Slika 6). Na obeh mestih smo najprej odvzeli vzorce vode za analizo eDNA, nato brise, nazadnje pa še osebke rakov za konvencionalno analizo. Tako zbrani vzorci bodo omogočili primerjavo učinkovitosti različnih pristopov. Analizi eDNA na obeh mestih nista potrdili prisotnosti domorodnih rakov. Od tujerodnih vrst smo zaznali le signalnega raka, na obeh mestih pa tudi povzročitelja račje kuge, A. astaci.



Slika 6. Zemljevid vzorčnih mest za odvzem tkivnih vzorcev in brisov tujerodnih rakov.

DS1.5: RAZVOJ PROTOKOLA ZA INTERPRETACIJO REZULTATOV ANALIZE eDNA ZA DETEKCIJO *A. astaci*

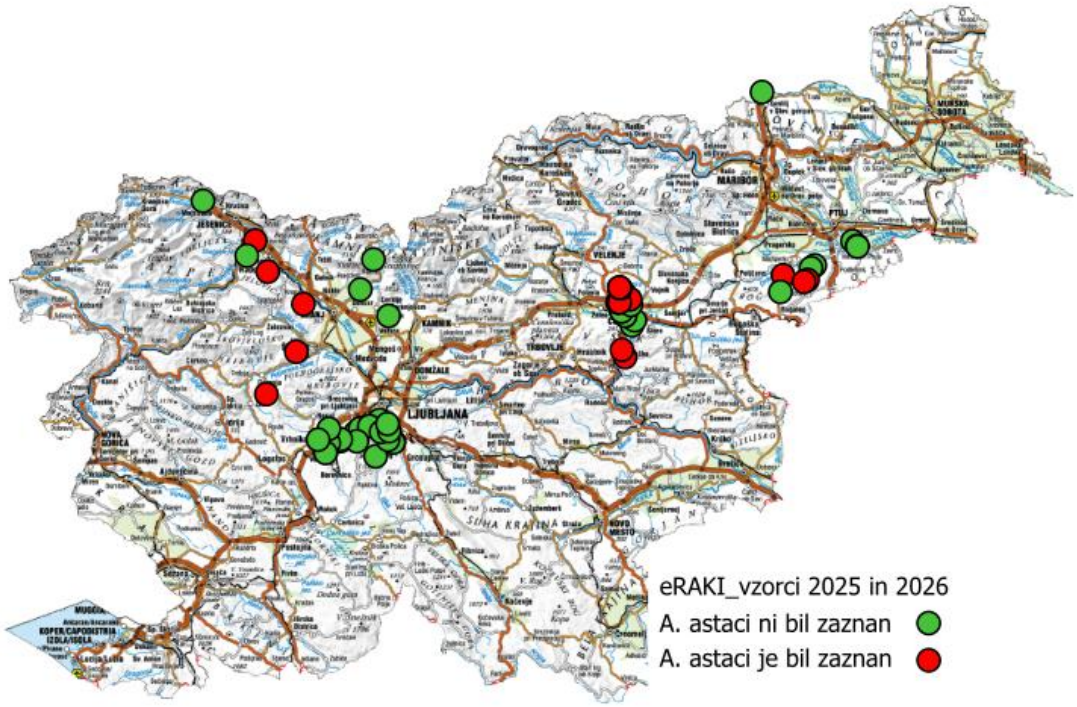
V kontekstu interpretacije rezultatov smo za detekcijo *A. astaci* v vzorcih eDNA na podlagi obstoječe literature (Strand in sod., 2019) izbrali konzervativno mejo za prepoznavo pozitivnega signala s testom qPCR. Za pozitiven rezultat štejemo le signal A. astaci z vrednostjo Cq < 41. Če signal zaznamo šele pri vrednosti Cq ≥ 41, rezultat obravnavamo kot neodločljiv, ne pa pozitiven. V prihodnje se bo naše raziskovalno delo osredotočalo na primerjavo eDNA, konvencionalnih rezultatov in brisov.

Med izvajanjem projekta smo ugotovili, da je za interpretacijo rezultatov zaznavanja *A. astaci* z eDNA pomemben ažuren podatek o prisotnosti domorodnih rakov. Zato smo razvili tudi protokole za njihovo zaznavanje z eDNA. Za jelševca smo uporabili oligonukleotidni panel Ruscha in sod. (2020), za koščenca panel Manfrina in sod. (2022), za koščaka pa smo razvili lasten panel (preglednica 3). Preverili smo, da slednji uspešno zaznava obe evolucijski liniji, prisotni v Sloveniji (CSE in GK/Kolpa). Posamezne panele smo združili v dva dupleksna testa qPCR, ki omogočata sočasno zaznavanje koščaka in jelševca oziroma koščenca in jelševca v eni reakciji.

Preglednica 3. Zaporedja uporabljenih oligonukleotidnih začetnikov in sond za detekcijo domorodnih potočnih rakov na podlagi eDNA, s pričakovano dolžino fragmenta, uporabljeno koncentracijo oligonukleotidov v reakciji qPCR in navedbo vira. Panel za zaznavanje koščaka smo razvili sami.

Oligonukleotid	*Dolžina fragmenta*	*Zaporedje (5'-3')*	*Konc. qPCR [µM]*	*Vir*
koščak (*Austropotamobius torrentium*)				
Ator-2_F	108 bp	CGCYCCTAAAATTGAAGAAACCC	0,2	neobjav.
Ator-2_R		TGAACTGTCTAYCCCCCCTTAG	0,2	
Ator-2_p		HEX:TCCCTAAATCTACAGAGGC:MGBEQ	0,125	
jelševec (*Astacus astacus*)				
Aast-1_F	83 bp	CCCCTTTRGCATCAGCTATTG	0,5	Rusch in sod. (2020)
Aast-1_R		CGAAGATACACCTGCCAAGTGT	0,5	
Aast-1_p		FAM:CTCATGCAGGCGCAT:MGBEQ	0,25	
Koščenec (*Austropotamobius pallipes*)				
Apal_F	136 bp	CCCAGGAAATTTAAGCCTTTTCA	0,2	Manfrin in sod. (2022)
Apaltor_R		TATTATGACCGTGCTAAGGTAGCA	0,2	
Apal_probe		[FAM]CAACCATTCATACCAGCCTTC[MGBEQ	0,1	

Dosedanje analize eDNA, ki smo jih opravili v sklopu projekta eRAKI in v sklopu strokovnih nalog z ZRSVN in KP Ljubljansko barje, so potrdile prisotnost *A. astaci* v več potokih na Gorenjskem (Jezernica – iztok iz Bohinjskega jezera, Rakovec, Piškovica, Grabnarica, Besnica in Zala; analize so bile opravljene v sklopu strokovne naloge za ZRSVN), na območju Lopate (Črna mlaka, Sušnica s pritoki, Lahomnica, Rečica in Koprivnica), kot tudi v Halozah (Pesjak, Peklača) in gramoznicah Trebež ob Dravi pri Bukovcih (preglednica 4). Podatke bomo deponirali v portal NarcIS, ko bodo kartografirani v končni obliki.



Slika 7. Zemljevid z rezultati analize prisotnosti *A. astaci* v vzorcih eDNA. Del vzorcev na Gorenjskem in v Ljubljanskem barju je bil analiziran v sklopu strokovnih nalog za ZRSVN oz. za KP Ljubljansko barje. V zeleno označenih mestih prisotnosti *A. astaci* nismo zaznali, v rdeče označenih mestih pa smo zaznali prisotnost *A. astaci*.

Preglednica 4. Vzorčna mesta, analizirana za prisotnost *A. astaci* z analizo eDNA. + AST – prisotnosti *A. astci* smo zaznali; - AST – prisotnosti *A. astaci* nismo zaznali. Rezultati za območje Lopate so podani v preglednici 7 in 8.

Oznaka vzorčnega mesta	Ime vzorčnega mesta	Koordinate (XD96, YD96)	Datum vzorčenja	prisotnost *A. astaci*
ER26-86	Drava pri Markovich	571628, 138839	18.8.2026	+ AST
ER26-85	Ceršak	550518, 173577	18.8.2026	- AST
Drava 3	Trebež, gramoznica "No. 1" ob Dravi, na levem bregu 800m Z od Vopošnice	572725, 137733	7.11.2025	+ AST
Drava 4	Trebež, gramoznica "No. 2" ob Dravi, na levem bregu 800m JZZ od Vopošnice	572774, 137566	7.11.2025	- AST
LI25-1	Zg. Sveča, Pesjak, potok Pesjak 100m V od Pesjaka	555419, 130894	7.11.2025	+ AST
LI25-2	Stoperce, potok Skralska 1,14 km JJZ od Sv. Antona v Stopercah	554794, 127005	7.11.2025	- AST
LI25-3	Dolena, desni pritok Peklače - potok Domanjšek 520m S od Turkoša	562827, 133188	7.11.2025	- AST
LI25-7	Dolena, potok Peklača ob cesti S od Hodoše pri domačiji Vavpotič	561948, 132555	7.11.2025	- AST
LI25-10	Kočice, potok Peklača pri razcepu ceste 300m J od Krošljega vrha	561132, 129786	7.11.2025	+ AST
LI25-6	Kočice, potok Peklača ob cesti v Podložine	560311, 129361	7.11.2025	+ AST
Vzorci so bili analizirani v sklopu strokovne naloge za ZRSVN				
ER26-70	Mlinca	420128, 148254	23.9.2026	- AST
ER26-71	Piškovica	432281, 138916	23.9.2026	+ AST
ER26-72	Grabnarica	435237, 131711	23.9.2026	+ AST
ER26-73	Besnica	443466, 124121	23.9.2026	+ AST
ER26-74	Sopotnica	441888, 113071	23.9.2026	- AST
ER26-75	Zala	434642, 102651	23.9.2026	+ AST

Oznaka vzorčnega mesta	Ime vzorčnega mesta	Koordinate (XD96, YD96)	Datum vzorčenja	prisotnost *A. astaci*
ER26-78	Beli potok (pritok Kokre)	459051, 136395	2.10.2026	- AST
ER26-87	Rakovec	456793, 127535	6.10.2026	+ AST
ER26-88	Dobovšek	463429, 121400	6.10.2026	- AST
Vzorci so bili analizirani v sklopu strokovne naloge za KP Ljubljansko barje				
ER26-56	Kanal Peščenek	460336, 95526	7.7.2026	- AST
ER26-65	Farjevec pred iztokom v Ljubljanico	461309, 97126	10.7.2026	- AST
ER26-57	Dremavščica	464664, 92107	7.7.2026	- AST
ER26-58	Želimeljščica pred iztokom v Ižico	464575, 91895	7.7.2026	- AST
ER26-66	Ribniki pri stari vrhniški opekarni	455776, 94249	10.7.2026	- AST
ER26-67	Radna pred iztokom v Ljubljanico	456795, 95149	10.7.2026	- AST
ER26-33/34	Maherjev graben	452223, 92239	24.6.2026	- AST
ER26-68	Iška pred iztokom v Ljubljanico	458942, 95690	10.7.2026	- AST
ER26-59	Iztok iz Strahomerškega bajerja	460389, 88661	7.7.2026	- AST
ER26-35/36	Mlinski potok pred iztokom v Podpeško jezero	456033, 92175	24.6.2026	- AST
ER26-37/38	Bistra	448589, 89949	24.6.2026	- AST
ER26-39/40	Bevški Jarek	452272, 92638	24.6.2026	- AST
ER26-60	Retje – barjansko okno	463276, 92513	7.7.2026	- AST

Oznaka vzorčnega mesta	Ime vzorčnega mesta	Koordinate (XD96, YD96)	Datum vzorčenja	prisotnost *A. astaci*
ER26-41/42	Zrnica pred iztokom v Ljubljanico	449465, 91773	24.6.2026	- AST
ER26-61	Kanal Peščenek	461683, 94371	7.7.2026	- AST
ER26-43/44	Črni graben pri Dolu pri Borovnici	448741, 89464	24.6.2026	- AST
ER26-62	Ižica	463569, 94556	7.7.2026	- AST
ER26-45/46	Ižica pri Igu	449504, 95102	24.6.2026	- AST
ER26-63	Izar pred iztokom v Ižico	463169, 96240	7.7.2026	- AST
ER26-76	Vtok v Ribnik RD Vrhnika	446973, 92549	22.9.2026	- AST

3.2. DS2: Vzpostavitev sistema za genotipizacijo *A. astaci* na osnovi eDNA in DNA

Namen tega DS je vpeljati, testirati in optimizirati pristope za genotipizacijo *A. astaci* v slovenskih vodotokih na osnovi analize eDNA in DNA brisov površine rakov. Specifični cilji tega DS so:

- ocena primernosti vzorcev eDNA in neinvazivnih vzorcev (bris površine rakov) za genotipizacijo A. astaci;
- razvoj robustnega in praktičnega protokola za genotipizacijo *A. astaci*;
- določitev spodnje meje (LOD) za detekcijo genotipov *A. astaci* s testom qPCR; in
- preizkus protokola v različnih tipih vodotokov, kjer pričakujemo prisotnost različnih genotipov *A. astaci*.

V prvem letu izvajanja raziskovalnega projekta so bile izvedene naslednje dejavnosti.

DS2.1: PILOTNA AKCIJA - GENOTIPIZACIJA *A. astaci* NA OBMOČJU LOPATE

Pilotno genotipizacijo *A. astaci* na območju Lopate smo izvedli po množičnem poginu koščakov, ki smo ga novembra 2025 zaznali v potoku Sušnica. Prisotnost povzročitelja v poginulih rakih so z metodo qPCR (Kušar in sod., 2013) preverili v laboratoriju Inštituta za mikrobiologijo in parazitologijo Veterinarske fakultete, ki sodeluje v projektu. Za izolacijo DNA so uporabili tkivo zadka (3–5 segmentov trebušne kutikule), ki so mu dodali del tkiva z lezijo. Rezultate pozitivnih testov qPCR glede na stopnjo okuženosti razvrščamo v razrede A1 (možna prisotnost), A2 (zelo nizka), A3 (nizka), A4 (zmerna), A5 (visoka), A6 (zelo visoka) in A7 (izjemno visoka) (Kušar in sod., 2013).

Analizirali smo 37 vzorcev: 27 koščakov iz Sušnice in 10 močvirskih škarjarjev iz Črne mlake (preglednica 6). Vsi koščaki so bili ob odvzemu že mrtvi, močvirski škarjarji pa so bili živi in brez vidnih znakov bolezni. Glede na ohranjenost kadavrov smo koščake analizirali posamično ali združene po dva oziroma tri osebke. Na povzročitelja račje kuge so bili pozitivni vsi vzorci koščakov razen enega (ta je vseboval dva osebka) ter vsi vzorci močvirskih škarjarjev razen dveh. Med koščaki je prevladovala stopnja okuženosti A3, med močvirskimi škarjarji pa je bila stopnja okuženosti večinoma nižja, najpogosteje A2 (preglednica 6).

Vse vzorce s stopnjo okuženosti A3 ali A4 smo dodatno genotipizirali s testom qPCR (preglednica 6). Pri vseh analiziranih koščakih smo potrdili genotip A, pri vseh analiziranih močvirskih škarjarjih pa genotip D. Za genotipizacijo smo uporabili panele, ki so jih razvili Di Domenico in sod. (2021; glej DS2.5)

Preglednica 5. Laboratorijska analiza za potrditev račje kuge.

Oznaka vzorca	Opis	Opomba	Agent level (final)
RK1	*A. torrentium*, Sušnica, gorvodno 5 po 2 tednih, 14.11.2025 D. Stanković, T.Veličković	1 rak	A2
RK2		1 rak	A3
RK3		1 rak	A2
RK4	*P. clarkii*, kanal Črne mlake, Lopata, Celje, 46.2514, 15.2363 - 46.2606, 15.2234, 28.05.2025. L. Mrzelj, M. Bedjanič (abdomen + telzon skupaj v vzorec)	1 rak	A2
RK5		1 rak	A3
RK6		1 rak	A0
RK7		1 rak	A2
RK8		1 rak	A2
RK9		1 rak	A2
RK10		1 rak	A0
RK11		1 rak	A3
RK12		1 rak	A4
RK13		1 rak	A2
RK14	*A. torrentium*, Sušnica, srednjevodno, cca. 1.11.2025, D. Stanković, M. Bedjanič	2 raka (eni precej razpadli)	A4
RK15		2 raka (eni precej razpadli)	A4
RK16		2 raka (eni precej razpadli)	A1
RK17		2 raka (eni precej razpadli)	A3
RK18		2 raka (eni precej razpadli)	A0
RK19		2 raka (eni precej razpadli)	A3
RK20		2 raka (eni precej razpadli)	A4
RK21	*A. torrentium*, Sušnica, dolvodno, cca. 1.11.2025, D. Stanković, M. Bedjanič	2-3 raki (precej razpadli raki)	A3
RK22		2-3 raki (precej razpadli raki)	A3
RK23		2-3 raki (precej razpadli raki)	A2
RK24		2-3 raki (precej razpadli raki)	A3

Preglednica 6. Genotipizacija vzorcev s testom qPCR.

Oznaka vzorca	Opis	Opomba	Agent level (final)	Genotype
RK2	*A.torrentium*, Sušnica, 14.11.2025	1 rak	A3	A
RK5	*P. clarkii*, 28.05.2025.	1 rak	A3	D
RK11		1 rak	A3	D
RK12		1 rak	A4	D
RK14	*A. torrentium*, Sušnica, srednjevodno, cca. 1.11.2025,	2 raka (eni precej razpadli)	A4	A
RK15		2 raka (eni precej razpadli)	A4	A
RK17		2 raka (eni precej razpadli)	A3	A
RK19		2 raka (eni precej razpadli)	A3	A
RK20		2 raka (eni precej razpadli)	A4	A
RK21	*A. torrentium*, Sušnica, dolvodno, cca. 1.11.2025	2-3 raki (precej razpadli raki)	A3	A
RK22		2-3 raki (razpadli raki)	A3	A
RK24		2-3 raki (razpadli raki)	A3	A

Poleg tkivnih vzorcev smo analizirali vzorce eDNA z območja Lopate za ugotavljanje prisotnosti *A. astaci* (preglednica 7). Na izbranih lokacijah z območja Lopate in Sušnice, kjer smo leta 2025 zabeležili množičen pogin koščakov, smo genotip *A. astaci* poskusili določiti tudi vzorcem eDNA (preglednica 7). *A. astaci* smo zaznali v obeh vzorcih z območij, kjer je prisoten močvirski škarjar, in na vseh analiziranih lokacijah v Sušnici, povezanih s poginom. V Črni mlaki smo potrdili genotip D. Med vzorci s Sušnice smo v enem vzorcu potrdili genotip A, v drugem pa genotipa A in D, čeprav z analizo eDNA na tem delu Sušnice nismo zaznali močvirskega škarjarja. V preostalih vzorcih genotipa nismo uspeli določiti.

Tudi vzorce eDNA iz leta 2026, kjer je bila potrjena prisotnost domorodnih rakov ali pa močvirskega škarjarja, smo analizirali za prisotnost *A. astaci*, vendar jih še nismo genotipizirali (preglednica 8).

Preglednica 7. Detekcija in genotipizacija *A. astaci* na osnovi eDNA, območje Lopate, leto 2025. PC – močvirski škarjar; AST – *A. astaci*; AST-A – *A. astaci* genotip A genotip A, AST-D – *A. astaci* genotip D; '+' – pozitiven signal je bil zaznan; '-' – pozitiven signal ni bil zaznan; ('/') število pozitivnih replikatov glede na vse replikate. Odebeljeno označeni vzorci predstavljajo lokalitete na Sušnici, kjer smo v letu 2025 zabeležili množičen pogin koščakov.

Vzorčno mesto	Koordinate (E, N)	Datum vzorčenja	PC	AST	AST-A	AST-D
Zadrževalnik MOL	517195, 124574	18.6.2025	+(8/8)	+(3/6)	-(0/4)	-(0/4)
Črna mlaka	517648, 124040	17.10.2025	+(8/8)	+(3/6)	-(0/4)	+(3/4)
Sušnica srednjevodno	**517768, 127543**	**14.11.2025**	**-(0/8)**	**+(6/6)**	**+(2/4)**	**-(0/4)**
Desni pritok Sušnice 1	**517199, 128183**	**14.11.2025**	**-(0/8)**	**+(4/6)**	**-(0/4)**	**-(0/4)**
Desni pritok Sušnice 2	**517286, 127894**	**14.11.2025**	**-(0/8)**	**+(6/6)**	**-(0/4)**	**-(0/4)**
Sušnica gorvodno 5	**517249, 128145**	**14.11.2025**	**-(0/8)**	**+(4/6)**	**+(1/4)**	**+(4/4)**

Preglednica 8. Detekcija *A. astaci* na osnovi eDNA, območje Lopate, leto 2026. PC – močvirski škarjar; PC v 2025 – zaznava močvirskega škarjarja v 2025; AST – *A. astci*; AA – jelševec, AT – koščak; X – vzorec (še) ni bil testiran; ('/') število pozitivnih replikatov glede na vse replikate.

Vzorčno mesto	Koordinate (D48/GK) (X, Y)	Datum vzorčenja	**PC**	PC v 2025	AST	AA	AT
Sušnica 3	125943, 518893	6.7.2026	-(0/6)	-	-(0/4)	X	X
		6.10.2026	-(0/6)		X	X	X
Voglajna, Celje	119789, 521143	23.6.2026	-(0/6)	-	-(0/4)	X	X
		6.10.2026	-(0/6)		X	X	X
Koprivnica 4, Celje	123472, 520273	6.7.2026	-(0/6)	X	-(0/4)	X	X
		6.10.2026	-(0/6)		X	X	X

Vzorčno mesto	Koordinate (D48/GK) (X, Y)	Datum vzorčenja	**PC**	PC v 2025	AST	AA	AT
Podsevčnica, Lopata	124088, 518158	6.7.2026 6.10.2026	-(0/6) +(1/4)	-	-(0/4) X	X X	X X
Ložnica, Medlog	121955, 518061	23.6.2026 6.10.2026	-(0/6) -(0/6)	-	-(0/4)	X	X
Savinja 1, Medlog	120951, 518914	23.6.2026, 6.10.2026	-(0/6) -(0/6)	-	-(0/4)	X	X
Pritok 2, Črna Mlaka	124125, 517176	23.6.2026, 6.10.2026	-(0/6) -(0/6)	-	-(0/4)	X	X
Lahomnica	111308, 518917	23.6.2026, 6.10.2026	-(0/6) -(0/6)	X	+(1/4)	-	+
Ločnica	118718, 520600	23.6.2026, 6.10.2026	-(0/6) -(0/6)	X	-(0/4)	X	X
Rečica	113011, 518197	23.6.2026, 6.10.2026	-(0/6) -(0/6)	X	+(2/8)	-	+
Sušnica 1	518004, 124098	6.7.2026	-(0/6)	-	-(0/4)	-	-
Sušnica srednjevodno	127543, 517768	6.7.2026	-(0/6)	-	-(0/4)	-	+
Koprivnica pod iztokom iz Šmartinskega jezera	125208, 519749	6.7.2026	-(0/6)	X	+(3/8)	+	-
Pritok Ribnika Natura	126091, 517846	6.7.2026	-(0/6)	X	-(0/4)	-	+
Ribniki S od Ribnika Natura	126443, 518344	6.7.2026	-(0/6)	X	-(0/4)	-	-
Sušnica 2	124622, 518487	6.7.2026	-(0/6)	+	-(0/4)	-	-

DS2.2: MESTA VZORČENJA VODE IN KONVENCIONALNO VZORČENJE POTOČNIH RAKOV

Vzorci DNA, izolirane iz tkiv in brisov v DS1, so predvideni tudi za genotipizacijo v DS2. Med vzorci eDNA bomo v genotipizacijo vključili predvsem tiste z najmočnejšimi signali.

DS2.4: GENOTIPIZACIJA *A. astaci* NA OSNOVI RAZLIČNIH PRISTOPOV

Iz tkivnih vzorcev in brisov, odvzetih v prvem letu projekta, smo izolirali DNA, ki jo bomo najprej analizirali za prisotnost *A. astaci*. Vse pozitivne vzorce z najmanj stopnjo okuženosti A2 bomo poskusili genotipizirati. Poleg testa qPCR bomo preverili tudi primernost drugih pristopov oziroma izbranih molekularnih označevalcev.

DS2.5: RAZVOJ PROTOKOLA ZA GENOTIPIZACIJO *A. astaci* S TESTOM qPCR

Za genotipizacijo smo protokol qPCR iz DS1 nadgradili z izbiro ustreznega oligonukleotidnega panela za posamezen genotip. Poleg panelov za zaznavanje genotipov A in D smo že preizkusili tudi panel za genotip E (preglednica 9).

Preglednica 9. Zaporedja oligonukleotidnih začetnikov in sond za genotipizacijo *A. astaci* ter pričakovane dolžine pomnoženih odsekov. Panele so razvili Di Domenico in sod. (2021).

Oligonukleotid	*Dolžina fragmenta*	*Zaporedje (5'-3')*
Aast_A_fwd	71 bp	CAGTCCCACGAGCCGAAA
Aast_A_rev		CCATCGCTGCTTGCAAGAC
Ast_A_probe		JOE:TCGCGCTTCTAGTGCTTCTATTCGATCCA:TAM
Aast_D_fwd	67 bp	AATTTGACGATGTGCAATGGAA
Aast_D_rev		TCCGCTTTCATTTTGCAAATATT
Ast_D_probe		FAM: CCGTTTCAACAAACAGTGG:TAM
Aast_E_fwd	74 bp	TGCCTGGAGTATTGCCTGAAT
Aast_E_rev		TACGCGCAAACCTATCTCTGAA
Aast_E_probe		JOE-CGTGCGAGCAAAAGCCT CAACTCG-TAMRA

3.3. DS3: Vzpostavitev standardiziranega sistema za detekcijo tujerodnih vrst rakov na osnovi eDNA

Namen tega delovnega sklopa je razviti, preizkusiti in optimizirati pristope na podlagi eDNA za zaznavanje in spremljanje tujerodnih vrst rakov v slovenskih vodnih telesih. Specifični cilji so:

- razvoj robustnega in praktičnega protokola za vzorčenje vode, izolacijo in analizo eDNA za namen rutinske detekcije tujerodnih rakov s testom qPCR;
- razvoj multiplih (multipleks) testov qPCR za detekcijo več vrst rakov hkrati;
- preizkus univerzalnega panela za eDNA metabarkodiranje rakov deseteronožcev;
- določitev spodnje meje detekcije (LOD) testa qPCR za detekcijo posameznih tujerodnih vrst rakov (posamezne in multipleks reakcije);
- preizkus protokola v različnih tipih vodotokov, kjer je bila v preteklosti v Sloveniji potrjena prisotnost tujerodnih vrst rakov oz. je njihova prisotnost pričakovana;
- ocena sezonske dinamike zaznave tujerodnih rakov s pristopom na osnovi eDNA;
- ovrednotenje zaznavanja tujerodnih rakov z analizo eDNA.

<u>V prvem letu izvajanja raziskovalnega projekta so bile izvedene naslednje dejavnosti.</u>

DS3.1: MESTA VZORČENJA

Vsi vzorci eDNA iz DS1 so predvideni tudi za detekcijo tujerodnih vrst rakov v DS3.

DS3.3: RAZVOJ PROTOKOLA eDNA ZA TUJERODNE VRSTE RAKOV

Za vzorčenje in izolacijo eDNA uporabljamo enak protokol kot v DS1. Prisotnost tujerodnih potočnih rakov ugotavljamo z vrstno specifičnimi testi qPCR s fluorogenimi hidroliznimi sondami. Posamezen test vključuje dva začetna oligonukleotida in označeno sondo. Za močvirskega škarjarja uporabljamo panel Tréguierja in sod. (2020), za signalnega raka panel Harperja in sod. (2018), za rdečeškarjevca panel Baudryja in sod. (2021), za trnavca pa smo razvili lasten oligonukleotidni panel (preglednica 10). Predhodno uporabljeni panel za signalnega raka (Mauvisseau in sod., 2018) se je izkazal za nezanesljivega in nezadostno specifičnega.

Preglednica 10. Zaporedja uporabljenih oligonukleotidnih začetnikov in sond za detekcijo tujerodnih vrst rakov s pričakovano dolžino fragmenta, uporabljeno koncentracijo v reakciji qPCR, ter virom panela.

oligonukleotid	*Dolžina fragmenta*	*Zaporedje (5'-3')*	*Konc. qPCR [µM]*	*Vir*
močvirski škarjar (*Procambarus clarkii*)				
SPY_ProCla_F	65 bp	AACTAGGGGTATAGTTGAGAG	0,4	Tréguier in sod. (2014)
SPY_ProCla_R		CAGAAGCTAAAGGAGGATAA	0,4	
SPY_ProCla_p		FAM:AGGAGTTGGAACAGGATGGACT:MBGEQ	0,1	
trnavec (*Faxonius limosus*)				
Olim-2_F	85 bp	AGAAACCCCTGCTAAATGCAACG	0,05	neobjav.
Olim-2_R		GTATCCTCCTCTCGCTTCTGC	0,4	
Olim-2_p		FAM:TAAATCCACTGATGCCC:MGBEQ	0,4	
signalni rak (*Pacifastacus leniusculus*)				
qPICOIF	87 bp	ATAGTTGAAAGAGGAGTGGGTACT	0,4	Harper in sod. (2021)
qPICOIR		TAAATCAACAGAAGCCCCTGCA	0,4	
SigCrayP1		FAM:CCTCCTCTAGCAGCGGCTATTGCTCATGC:BHQ1	0,1	
Rdečeškarjevec (*Cherax quadricarinatus*)				
Cquad_F	109 bp	TGGAGGCTGGAATGAATGG	0,4	Baudry in sod. (2021)
Cquad_R		GGTCTTATCGTCCCTCTAA	0,4	
Cquad_p		FAM:TGGACGAGAAGGAAGCTGTC:MGBEQ		

DS3.4: TEST NAVZKRIŽNE REAKTIVNOSTI

Za preverjanje navzkrižne reaktivnosti smo uporabili genomsko DNA. Pri preizkušenih vzorcih genomske DNA nismo zaznali navzkrižne reaktivnosti. Posamezne teste smo izvedli v osmih ponovitvah.

DS3.5: RAZVOJ IN PREIZKUS MULTIPLEKS TESTOV qPCR

Oligonukleotidne panele za močvirskega škarjarja, trnavca in signalnega raka smo uspešno združili v kombinirani test qPCR za sočasno preverjanje prisotnosti vseh treh vrst. Ker so vse tri

sonde označene z istim fluorescenčnim barvilom, pozitivnega signala s tem testom ni mogoče pripisati posamezni vrsti; za njeno določitev so potrebne dodatne ločene reakcije.

3.4. DS4: Uporaba DNA in eDNA metodologije za monitoring tujerodnih rakov in povzročitelja račje kuge

Namen četrtega delovnega sklopa je uporaba metod, razvitih v DS1–DS3, pri spremljanju tujerodnih rakov in povzročitelja račje kuge ter vključevanje rezultatov analiz v praktične postopke monitoringa. Specifični cilji so:

- Presečni pregled prisotnosti in genotipizacija *A. astaci* v ključnih vodotokih na območju prisotnosti domorodnih rakov;
- priprava predloga sheme monitoringa račje kuge z opredelitvijo korakov za ukrepanje ob ugotovitvi prisotnosti različnih genotipov *A. astaci* na območju populacij domorodnih vrst rakov; in
- priprava in testiranje protokola na osnovi eDNA za iskanje novih žarišč tujerodnih rakov s poudarkom na območjih, kjer te prednostno pričakujemo.

V prvem letu izvajanja raziskovalnega projekta je bila izvedena naslednja dejavnost.

DS4.1: GENOTIPIZACIJA OBSTOJEČIH ARHIVSKIH VZORCEV DNK IZ PRETEKLIH LET

V prvem letu projekta smo pripravili popis in zbrali razpoložljive arhivske tkivne vzorce potočnih rakov, ki so bili v Sloveniji v preteklih letih analizirani za prisotnost *A. astaci* (preglednica 11). Uporabili jih bomo za presečni pregled razširjenosti genotipov *A. astaci* po Sloveniji.

Preglednica 11. Popis razpoložljivih arhivskih vzorcev. AT – koščak; AP – koščenec, AA – jelševec, PL – signalni rak; CQ – rdečeškarjevec; PC – močvirski škarjar.

2009-2011: 39 pozitivnih (32 AT, 2 AP, 2 AA, 2 PL, 1 CQ) od analiziranih **386** rakov
2019: 1 pozitiven (PC) od analiziranih 12 rakov
2022: 3 pozitivni (**PL**) od 41 analiziranih Rakov
2023: 11 pozitivnih (5× AT, 2× PL, 1× AA, za 3 ni podatka o vrsti)
2024-2026: 4 pozitivni (4× AT; Haloze) od 24 analiziranih

DS4.2: MESTA VZORČENJA

V DS1 smo že v prvem letu zbrali obsežen nabor vzorcev eDNA iz več kot 60 vzorčnih mest in iz skoraj vseh že izolirali eDNA. Ti vzorci bodo vključeni tudi v analize DS3.

4. ODSTOPI OD PREDVIDENEGA PROGRAMA DELA

V programu dela smo za prvo leto predvideli, da bomo za eDNA panele določili spodnje meje detekcije testa qPCR. Zaradi težav z dobavo sintetičnih DNA pozitivnih kontrol smo to dejavnost prestavili v drugo leto izvajanja projekta. Predvideni zamik bomo lahko nadoknadili v naslednjem letu, saj smo del vzorčenj v okviru DS4 opravili pred načrtovanim rokom.

5. DISEMINACIJA

V prvem letu izvajanja projekta smo tega predstavili na več domačih in tujih predavanjih oz znanstveno strokovnih srečanjih, in sicer 5. 12. 2025 na NIB dnevu, 17. 4. 2026 na predavanju študentom v Banja Luki, Bosna in Hercegovina, in 28. 9. 2026 na prvem srečanju COST akcije eDNA4Policy. Poleg tega pa načrtujem predsavitev na Naravovarstvenem simpoziju, ki bo 11. 11. 2026. Širši javnosti pa bomo projekt predstavili predvsem preko komplementarnega projekta izvajanja aktivnosti občanske znanost (Občanska eDNK: Uporaba občanske znanosti in okoljske DNK za iskanje tujerodnih vrst), kjer bomo občane znanstvenike vključili v vzorčenje okoljske DNA v vodnih telesih za iskanje tujerodnih vrst.

6. PRILOGE

Geokodirani podatki so priloženi kot GeopPackage dokumenti:

- eRAKI_vzorci_2025-26.gpkg: vključuje vzorce za obdelavo v projektu eRAKI,
- eRAKI_ZRSVN_2026.gpkg: vključuje zorce, ki smo jih bodelali v sklopu strokovne naloge za ZRSVN,
- eRAKI_KPLB_2026.gpkg: vključuje zorce, ki smo jih bodelali v sklopu strokovne naloge za KP LB.

7. LITERATURA

Baudry, T., Mauvisseau, Q., Goût, J.-P., Arqué, A., Delaunay, C., Smith-Ravin, J., Sweet, M., & Grandjean, F. (2021). Mapping a super-invader in a biodiversity hotspot, an eDNA-based success story. Ecol Indic, 126, 107637.

Blabolil P, Griffiths NP, Hänfling B in sod 2022 The true picture of environmental DNA, a case study in harvested fishponds. *Ecol Indic* 142: 109241

Blumberg DD 1987 Creating a ribonuclease-free environment. Methods in Enzymology, 152: 20-4

Champlot S, Berthelot C, Pruvost M, Bennett EA, Grange T, Geigl E-M 2010. An efficient multistrategy DNA decontamination procedure of PCR reagents for hypersensitive PCR applications. PLoS One, 5:e13042

Gingera TD 2018. Environmental DNA monitoring of invasive zebra mussels: Method design, monitoring tool comparisons, refinement of methods, and considerations for management. MSc thesis. Department of Biological Sciences, University of Manitoba. Manitoba, USA. 187 str.

Di Domenico M, Curini V, Caprioli R, Giansante C, Mrugała A, Mojžišová M, Cammà C and Petrusek A (2021) Real-Time PCR Assays for Rapid Identification of Common Aphanomyces astaci Genotypes. Front. Ecol. Evol. 9:597585.

Kušar, D., A. Vrezec, M. Ocepek & A. Jenčič, 2013. *Aphanomyces astaci* in wild crayfish populations in Slovenia: first report of persistent infection in a stone crayfish Austropotamobius torrentium population. Dis. Aquat. Org. 103: 157–169

Manfrin C, Zanetti M, Stanković D, Fattori U, Bertucci-Maresca V, Giulianini PG, Pallavicini A. Detection of the Endangered Stone Crayfish *Austropotamobius torrentium* (Schrank, 1803) and Its Congeneric *A. pallipes* in Its Last Italian Biotope by eDNA Analysis. Diversity. 2022; 14(3):205.

Mauvisseau Q, Coignet A, Delaunay C, in 2018 Environmental DNA as an efficient tool for detecting invasive crayfishes in freshwater ponds. *Hydorbiol*, 805: 163–175.

Rusch JC, Mojžišová M, Strand DA in sod 2020 Simultaneous detection of native and invasive crayfish and Aphanomyces astaci from environmental DNA samples in a wide range of habitats in Central Europe. NeoBiota 58: 1-32.

Strand DA, Jinnerot T, Aspán A, Viljamaa-Dirks S, Heinikainen S, Rolén E, Vrålstad T (2023) Molecular detection of *Aphanomyces astaci* – An improved species specific qPCR assay. J Inv Pathol 201: 108008.

Strand, D. A., Johnsen, S. I., Rusch, J. C., Agersnap, S., Larsen, W. B., Knudsen, S. W., Møller, P. R., & Vrålstad, T. (2019) Monitoring a Norwegian freshwater crayfish tragedy: eDNA snapshots of invasion, infection and extinction. J Appl Ecol, 56: 1661–1673.

Sylphium (2024) SYL002: Environmental DNA Isolation Kit. Manual. Sylphium Molecular Ecology The Netherlands. 21 p. Document date: 14 April 2025.

Tréguier A, Paillisson J-M, Dejean T in sod (2014), Environmental DNA surveillance for invertebrate species: advantages and technical limitations to detect invasive crayfish *Procambarus clarkii* in freshwater ponds. *J Appl Ecol*, 51: 871-879

Vrålstad T, Knutsen AK, Tengs T, Holst-Jensen A (2009) A quantitative TaqMan (R) MGB real-time polymerase chain reaction based assay for detection of the causative agent of crayfish plague *Aphanomyces astaci* Vet. Microbiol., 137 (2009), pp. 146-155