



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

**Spremljanje prisotnosti tujerodnih in domorodnih vrst  
potočnih rakov na območju Krajinskega parka  
Ljubljansko barje v letu 2025  
POROČILO**

Ljubljana  
4. november 2025  
št. 1679/2025



NALOGA:	<b>Spremljanje prisotnosti tujerodnih in domorodnih vrst potočnih rakov na območju Krajinskega parka Ljubljansko barje v letu 2025</b>
NAROČNIK:	<b>Javni zavod Krajinski park Ljubljansko barje Podpeška cesta 380 1357 Notranje Gorice</b>  <b>Kontaktna oseba: Barbara Vidmar</b>
IZVAJALEC:	<b>Nacionalni inštitut za biologijo (NIB) Oddelek za raziskave organizmov in ekosistemov Večna pot 111 SI-1000 Ljubljana</b>
PROJEKT:	<b>Pogodba KPLB št. 430-063/2025-7 Št. zadeve za MNVP 5440-1/2021-2550</b>
DELOVNA SKUPINA:	<b>dr. David Stanković, univ. dipl. biol.</b>  <b>Sara Strah, mag. var. nar.</b>
KONTAKT:	<b>T: 059 23 27 31 E: david.stankovic@nib.si</b>

**Datum:**  
**Ljubljana, 4.11.2025**

1.	POVZETEK.....	4
2.	UVOD .....	4
3.	METODE .....	5
3.1	Vzorčenje .....	5
3.2	Analiza okoljske DNK .....	8
3.3	Laboratorijska praksa in preprečevanje kontaminacij .....	10
4.	REZULTATI IN RAZPRAVA.....	11
4.1.	Rezultati analize okoljske DNK.....	11
5.	PREDLOG NADALJNIH UKREPOV .....	15

## 1. POVZETEK

Na območju Krajinskega parka Ljubljansko barje sta domorodna potočna raka koščak (*Austropotamobius torrentium*), ki je tudi kvalifikacijska vrsta za tamkajšnje Natura 2000 območje, in jelševec (*Astacus astacus*). Tujerodne vrste potočnih rakov imajo negativen vpliv na obe domorodni vrsti. Te vrste so prenašalci račje kuge, ki je za domorodne rake lahko usodna in lahko povzroči pogin celotne populacije. V Sloveniji je bilo do sedaj zabeleženih že več vrst tujerodnih potočnih rakov, a na območju Ljubljanskega barja nobena od teh tujerodnih vrst še ni bila nedvoumno potrjena. Ker je zgodnja zaznava tujerodnih vrst rakov bistvenega pomena za pravočasno ukrepanje ter njihovo odstranitev, je Javni zavod Krajinski park Ljubljansko barje pri NIB-u za leto 2025 naročil izvedbo strokovne naloge spremljanje prisotnosti tujerodnih in domorodnih vrst potočnih rakov na osnovi analiza okoljske DNK (eDNK). V sklopu naloge je bilo spremljanih dvajsetih vzorčnih mest. Vsa vzorčenja smo opravili v mesecu juniju, ko so pogoji primerni za vzorčenje eDNK potočnih rakov. Ponovno vzorčenje v jesenskem času ni bilo potrebno. **Tujerodnih vrst nismo zaznali na nobenem vzorčnem mestu, medtem ko smo domorodne vrste našli na desetih vzorčnih mestih. Koščaka smo zaznali na šestih mestih** – Borovniščica dolvodno in gorvodno od Borovnice, Bistra, Bevški jarek, Kanal Strajanov breg, Škofeljščica, – in **jelševca na štirih** – Draščica, Izica pri Igu in pred iztokom v Ljubljanico in Podlipščica. Na nobenem vzorčnem mestu nismo zaznali obeh vrst hkrati. Ker tujerodne vrste potočnih rakov predstavljajo veliko nevarnost za domorodne vrste, priporočamo redno, to je vsakoletno spremljanje prisotnosti tujerodnih vrst na osnovi analize eDNK.

## 2. UVOD

Vnos invazivnih tujerodnih vrst je grožnja, ki se je v zadnjih desetletjih zaradi globalizacije intenzivno povečala in danes predstavlja eno večjih groženj domorodnimi vrstam in posledično tudi biotski raznovrstnosti (Veenvliet Kus, 2009). V celinskih vodah Slovenije je bilo poleg treh domorodnih vrst potočnih rakov v naravi zabeleženih več tujerodnih vrst, in sicer signalni rak (*Pacifastacus leniusculus*), travec (*Orconectes limosus*), močvirski škarjar (*Procambarus clarkii*), ozkoškarjevec (*Pontastacus leptodactylus*), rdečeškarjevec (*Cherax quadricarinatus*) in morebiti tudi marmornati škarjar (*Procambarus virginalis*), verjetni pa so tudi novi vnosi in širjenje iz sosednjih držav, kakor tudi vnosi novih vrst zaradi odprte trgovine z živimi živalmi (Jaklič in Vrezec, 2011).

V preteklih letih se je za zgodnjo zaznavo tujerodnih vrst rakov in ugotavljanje prisotnosti domorodnih vrst rakov uveljavila metoda določanja DNK v okolju (eDNK; Stanković in Strah 2025). Pri tej metodi namesto, da spremljamo vrste z neposrednim vzorčenjem organizmov, vzorčimo sam genetski material, ki ga vrste izgubljajo v okolje, večinoma v obliki menjanja integumenta, zaradi poškodb, preko iztrebljanja, s sluzjo, s spolnimi celicami itd. Prednosti eDNK pred konvencionalnimi metodami, sta večja ponovljivost in višja občutljivost, kar je ključno pri zgodnji zaznavi tujerodnih vrst (Venes in sod., 2016; Gorički in sod., 2017; Banchi in sod., 2020; La Torre in sod., 2024).

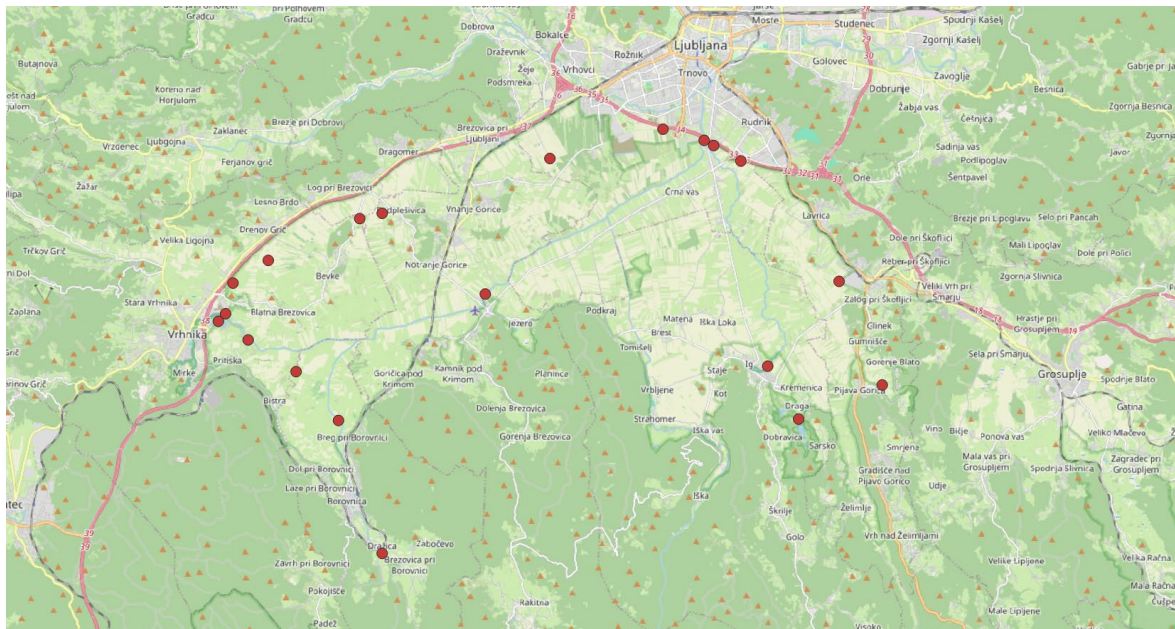
Zaradi bližine Ljubljane in pomembnih tranzitnih poti je na Ljubljanskem barju grožnja vnosa tujerodnih rakov visoka. Na območju Ljubljanskega barja nobena od tujerodnih vrst potočnih rakov še ni bila nedvoumno potrjena. Analiza eDNK iz leta 2019 je odkrila morebitno prisotnost močvirskega škarjarja v zelo nizkih koncentracijah v štirih vzorcih, a lažno pozitivnega signala (1 ponovitev od 8) ne moremo izključiti.

V sklopu strokovne naloge »Spremljanje prisotnosti tujerodnih in domorodnih vrst potočnih rakov na območju Krajinskega parka Ljubljansko barje v letu 2025« smo vrednotili stanje domorodnih – koščak in jelševca – in tujerodnih potočnih rakov – signalni rak, trnavec in močvirski škarjar – na dvajsetih vzorčnih mestih, ki smo jih določili skupaj z naročnikom. Za ugotavljanje razširjenosti koščaka in jelševca in za zgodnjo zaznavo morebitne prisotnosti tujerodnih potočnih rakov smo uporabili pristop z eDNK.

### 3. METODE

#### 3.1 Vzorčenje

Stanje izbranih domorodnih in tujerodnih potočnih rakov smo vrednotili na 20 vzorčnih mestih, ki smo jih na usklajevalnem sestanku določili skupaj z naročnikom (Slika 1, Tabela 1)



**Slika 1.** Zemljevid z vzorčnimi mesti za spremljanje izbranih domorodnih in tujerodnih potočnih rakov na Ljubljanskem barju.

Glede na pretekle izkušnje in literaturo smo vzorčenje izvedli v mesecu juniju, ko so pogoji primerni za vzorčenje eDNK. Pri eDNK analizah je namreč ključen čas vzorčenja, ki je najprimernejši pozno spomladi ali zgodaj jeseni, za vzorčenje predvsem nista primerna zima, ko živali mirujejo in vrhunec poletja, ko je življenjski cikel eDNK molekul zaradi visokih temperatur in povečane (mikro)biološke aktivnosti zelo kratek – takrat je v tem obdobju v okolju prisotnih tudi mnogo več organskih snovi, ki delujejo inhibitorno za PCR reakcijo (npr. huminske kisline, tanini; Blaboil in so. 2022).

Vzorčenje je vključevalo odvzem 3 do 10 litrov vode (odvisno od turbidnosti; Slika 2) v dekontaminirane plastične posode, ki smo jih pred vzorčenjem na mestu vzorčenja dobro (trikrat) splaknili z lokalno vodo). Vzorcili smo iz obale tako, da vode med zajemanjem nismo skalili in da smo zajeli čim manj sedimenta. Plastenke smo shranili v temen prostor in jih po zaključku vzorčenja odnesli v prostore Nacionalnega inštituta za biologijo. Vsi vzorci so bili filtrirani isti delovni dan, kot so bili odvzeti. Vodo smo filtrirali z uporabo peristaltične črpalke – filtrirali smo do sedem vzorcev



hkrati (Slika 3). Vse vzorce smo filtrirali v dveh tehničnih ponovitvah. Obakrat smo uporabili celulozni nitrati filter (mešani celulozni ester) – za prvo filtracijo smo uporabili filter s premerom por 1,2  $\mu\text{m}$  in za drugo s premerom por 3  $\mu\text{m}$ . Z enim filtrom smo filtrirali od 0,5 do 4 litrov vode (Tabela 1). K vsaki seriji filtriranja smo dodali slepo kontrolo za detekcijo morebitne kontaminacije. Za slepo kontrolo smo vzporedno filtrirali 0,5L deionizirane vode. Po filtracije smo filtre posušili na silikagelu in jih do ekstrakcije hranili na  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ .



**Slika 2.** Izbor vzorčnih mest, ki so bila vključena v vrednotenje stanja domorodnih in tujerodnih rakov na območju Ljubljanskega barja.



**Slika 3.** Prikaz filtriranja vzorcev. Analiza eDNK je sledila enosmernemu delovnemu toku skozi ločene prostore – filtriranje poteka v prvem prostoru (glej 3.3 Laboratorijska praksa in preprečevanje kontaminacij).

**Tabela 1.** Vzorčna mesta s koordinatami, datumom vzorčenja in volumnom prefiltriranega vzorca.

Oznaka vzorčnega mesta	Ime vzorčnega mesta	Koordinate (XD96, YD96)	Datum vzorčenja	Prefiltriran volumen (1,2 µm; 3 µm)
Lok 1	Borovniščica gorvodno od Borovnice	451762, 85157	10.6.2025	3 L; 3 L
Lok 2	Borovniščica dolvodno od Borovnice	450377, 89359	10.6.2025	2,5 L; 2,5 L
Lok 3	Bistra	449033, 90902	10.6.2025	2,5 L; 2,5 L
Lok 4	Ljubljanica pod pritokom Ljubije	447516, 91905	10.6.2025	2 L; 2,5 L
Lok 5	Ribniki pri stari vrhniški opekarni	446572, 92494	10.6.2025	3 L; 4 L
Lok 6	Tojnica pred iztokom v Ljubljanico	446801, 92733	10.6.2025	1 L; 1,5 L
Lok 7	Draščica	447034, 93701	18.6.2025	1 L; 3 L
Lok 8	Zrnica	448153, 94418	18.6.2025	0,5 L; 2 L
Lok 9	Bevški jarek	451051, 95740	16.6.2025	2 L, 2,5 L
Lok 10	Veliki graben	451762, 95908	16.6.2025	4 L; 4 L
Lok 11	Ljubljanica pod pritokom Velikega grabna	455029, 93357	18.6.2025	3 L; 3,5 L
Lok 12	Curnovec pri Zavetišču Gmajnice	457076, 97640	12.6.2025	0,5 L; 1 L
Lok 13	Curnovec pri Poti med jelšami	460658, 98566	12.6.2025	1 L; 1,5 L
Lok 14	Ižica pred iztokom v Ljubljanico	461964, 98214	12.6.2025	2 L; 3 L
Lok 15	Kanal Prošce 1	462265, 98048	12.6.2025	0,5 L ; 1L
Lok 16	Kanal Prošce 2	463126, 97558	12.6.2025	0,5 L; 0,75 L
Lok 17	Kanal Strajanov Breg	466239, 93756	17.6.2025	1 L; 3 L
Lok 18	Škofeljščica	467605, 90481	17.6.2025	1,5 L; 2 L
Lok 19	Ižica pri Igu	464956, 89403	17.6.2025	3 L; 5 L
Lok 20	Podlipščica	463978, 91076	17.6.2025	2,5 L; 3 L

### 3.2 Analiza okoljske DNK

DNK smo izolirali z aparatom za avtomatsko ekstrakcijo nukleinskih kislin Maxwell RSC 48 (Promega) z uporabo kita »Maxwell® RSC PureFood GMO and Authentication Kit« po protokolu za »Automated Purification of Fish eDNK from Pond Water (Promega)«. V vsak vzorec smo dali polovico filtra s 1,2 in polovico filtra s 3 µm porami. Za homogenizacijo filtrov smo uporabili mehanski homogenizator Bead Mill MAX (VWR) – v vsak vzorec smo dodali (dekontaminirano) kroglico iz nerjavečega jekla (4,5 mm) in dekontaminirano keramično kroglico (1,2 mm) ter vzorec stresali dvakrat po pol minute pri hitrosti 4,5 m/s. Po mehanski homogenizaciji smo v vsak vzorec dodali še proteinazo K in ga inkubirali. V vsako izolacijo smo vključili še negativno kontrolo filtracije. Koncentracijo izolirane eDNK smo pomerili spektrofotometrično z mikrovolumskim spektrofotometrom (Nanodrop 8, Thermo Scientific). Izolirano eDNK smo do analize s qPCR shranili na -20°C.

Prisotnost eDNK tarčnih vrst potočnih rakov smo v vzorcih ugotavljali s qPCR testom na osnovi fluorogene oligonukletoridne sode. Za vsako tarčno vrsto smo uporabili svoj eDNK panel, ki ga sestavlja po dva specifična oligonukleotidna začetnika (smer 3'-5' in 5'-3') in fluorogena oligonukleotidna sonda (Tabela 2). Prvotno izbran panel za signalnega raka, ki smo ga prevzeli iz Mauvisseau in sod. (2018), se je izkazal kot nezanesljiv in nespecifičen, zato smo ga zamenjali s panelom, ki so ga razvili Harper in sod. (2018) – za validacijo smo uporabili genomsko DNK domorodnih in tujerodnih rakov izolirano iz tkivnih vzorcev in eDNK iz referenčnih območij (vzorec odvzet iz Ormoških lagun).

**Tabela 2.** Zaporedja uporabljenih oligonukleotidnih začetnikov in sond s pričakovano dolžino fragmenta, uporabljeno koncentracijo v reakciji qPCR, ter virom panela. eDNK panel za koščaka in trnavca smo razvili na NIB v predhodnih študijah.

Oligonukleotid	Dolžina fragmenta	Zaporedje (5'-3')	Konc. qPCR [µM]	Vir
<b>koščak (<i>Austropotamobius torrentium</i>)</b>				
Ator-2_F		CGCYCCTAAAATTGAAGAAACCC	0,2	
Ator-2_R	108 bp	TGAACTGTCTAYCCCCCTTAG	0,2	neobjav.
Ator-2_p		FAM:TCCCTAAATCTACAGAGGC:MGBEQ	0,125	
<b>jelševec (<i>Astacus astacus</i>)</b>				
Aast-1_F		CCCCTTTRGCATCAGCTATTG	0,5	
Aast-1_R	83 bp	CGAAGATACACCTGCCAAGTGT	0,5	Rusch in sod. (2020)
Aast-1_p		FAM:CTCATGCAGGCGCAT:MGBEQ	0,25	
<b>močvirski škarjar</b>				
SPY_ProCla_F		AACTAGGGGTATAGTTGAGAG	0,4	
SPY_ProCla_R	65 bp	CAGAAGCTAAAGGAGGATAA	0,4	Tréguier in sod. (2014)
SPY_ProCla_p		FAM:AGGAGTTGGAACAGGATGGA CT:MBGEQ	0,1	

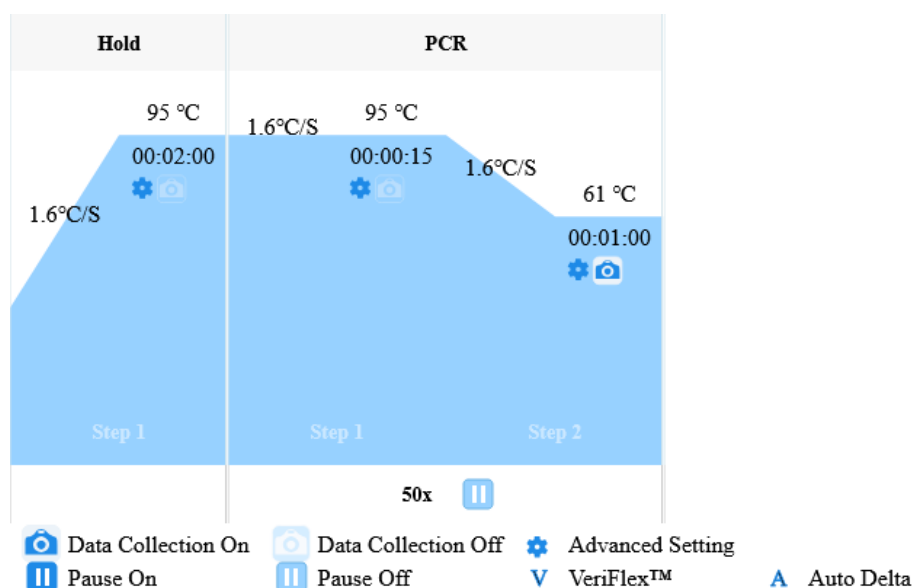
Tabela se nadaljuje



Nadaljevanje tabele

Oligonukleotid	Dolžina fragmenta	Zaporedje (5'-3')	Konc. qPCR [μM]	Vir
<b>trnavec (<i>Orconectes limosus</i>)</b>				
Olim-2_F	85 bp	AGAAACCCCTGCTAAATGCAACG	0,05	neobjav.
Olim-2_R		GTATCCTCCTCTCGCTTCTGC	0,4	
Olim-2_p		FAM:TAAATCCACTGATGCCC:MGBE Q	0,4	
<b>signalni rak (<i>Pacifastacus leniusculus</i>)</b>				
Plen-1_F	104 bp	TGAGCTGGTATAGTGGGAACT	0,4	Mauvisseau in sod. (2018)
Plen-1_R		AGCATGTGCCGTGACTACAA	0,4	
Plen-1_p		FAM:CGGGTTGAATTAGGTCAACCT GGAAG:BHQ1	0,1	
qPICOIF	87 bp	ATAGTTGAAAGAGGAGTGGGTACT	0,4	Harper in sod. (2018)
qPICOIR		TAAATCAACAGAAGCCCCTGCA	0,4	
SigCrayP1		FAM:CCTCCTCTAGCAGCGGCTATTG CTCATGC:BHQ1	0,1	

Za vsak eDNK panel smo vsak vzorec najprej analizirali v štirih ponovitvah. Vsak set testiranj je poleg vzorcev iz območja Barja vključeval še po dve negativni kontroli za PCR reakcije, dve negativni kontroli filtracije, in genomsko pozitivno kontrolo (tkivni vzorec) v obliki standardne redčitve – desetkrat redčen vzorec smo štirikrat zapored dvakrat redčili (Tabela 3). Kjer je bil qPCR negativen v vseh štirih replikatih smo ga ponovili, tako je bil vsak, vsak negativen vzorec analiziran v osmih replikatih. Replikate in kontrole smo pomnoževali v qPCR reakciji s končnim volumnom 12 μl, ki je vsebovala je 6 μl reakcijske mešanice 2x PerfeCTa qPCR ToughMix (Quantus) in ustrezno koncentracijo oligonukleotidnih začetnikov in sond (Tabela 2) ter 3 μl eDNK izolata ter naslednje temperaturne pogoje: 2 min pri 95°C, in 50-krat 15 s pri 95°C in 1 min pri 61°C oz 60°C (za signalnega raka po Harper in sod., 2018). Fluorescenco je qPCR aparat zaznaval ob ekstenzijskem koraku (Slika 4).



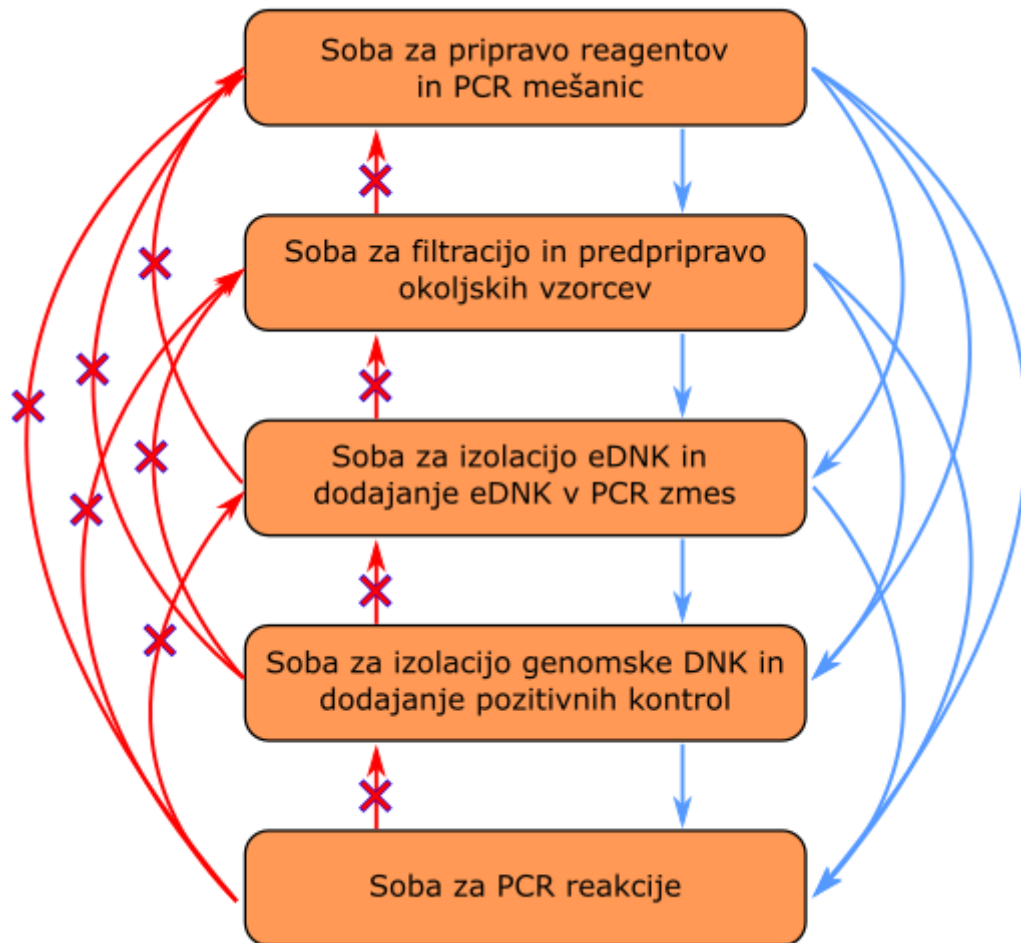
Slika 4. Shema temperaturnih pogojev za analizo eDNK vzorcev s qPCR testom.

**Tabela 3.** Primer sheme za pripravo reakcijske plošče za zaznavo koščaka z analizo eDNK na osnovi qPCR testa. Takšna postavitev omogoča sočasno analizo vseh dvajsetih vzorčnih mest v štirih ponovitvah za en eDNK panel. Vsak vzorec je najprej analiziran v štirih replikatih, negativni rezultati so ponovljeni še v štirih replikatih. Shema vključuje še štiri negativne kontrole, kamor namesto vzorca dodamo le vodo za molekularne analize oz. kontrolo filtriranja, genomsko pozitivno kontrolo genomske DNK koščaka v obliki standardne krivulje redčenja – desetkratno redčino smo štirikrat zaporedno redčili za dvakrat; 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	X	poz 10x
B											X	
C											X	poz 20x
D											X	
E	Lok 1	Lok 3	Lok 5	Lok 7	Lok 9	Lok 11	Lok 13	Lok 15	Lok 17	Lok 19	neg filt	poz 40x
F											neg PCR	
G											neg PCR	poz 80x
H											neg PCR	

### 3.3 Laboratorijska praksa in preprečevanje kontaminacij

Pri izvajanju analiz z okoljsko DNK smo upoštevali priporočila dobre laboratorijske prakse (glej Gingera, 2018), ki preprečujejo kontaminacijo in poškodbo eDNK in tako zmanjšali možnost pojavljanja lažno pozitivnih in lažno negativnih rezultatov. Za naslednje faze obdelave vzorcev smo uporabil ločene laboratorije – filtracija eDNK, izolacija eDNK iz filtrov, izolacija DNK iz tkivnih vzorcev, priprava PCR reakcijskih mešanic, in post-PCR analiza (Slika 5). Za eDNK analize je bila vsa oprema namenjena izključno delu z eDNK in ni v uporabi za analize vzorcev z veliko molekularno maso, npr. izolacija tkivne DNK in analize PCR produktov. Vso opremo in delovne površine smo redno čistili in jih po vsaki uporabi dekontaminirali za odstranitev morebitnih ostankov nukleinske kisline. Za dekontaminacijo smo uporabili natrijev hipoklorit (varikina) v 10-20 % sveže pripravljene raztopini (Champlot et al. 2010). Kovine in steklovino smo dodatno še suho sterilizirali - najmanj 4 ure na 185°C (Blumberg 1987). V vseh postopkih smo za preprečevanje kontaminacije z aerosoli uporabljal konice pipet s filtri. Rokavice smo menjali med vzorci. Za zmanjšanje navzkrižne kontaminacije smo imeli pri vsakem koraku analize istočasno odprto le eno mikro epruveto z vzorcem. Za prepoznavanje morebitnih lažno pozitivnih vzorcev, ki so posledica kontaminacije eDNK, smo v vseh korakih (filtriranje, izolaciji eDNK, qPCR testi) uporabljali slepo oz. negativno kontrolo. Na morebitno kontaminacijo bi sklepali v primeru pozitivnega signala v negativni kontroli. Za prepoznavo lažno negativnih vzorcev pa smo v analize vključili pozitivne kontrole.



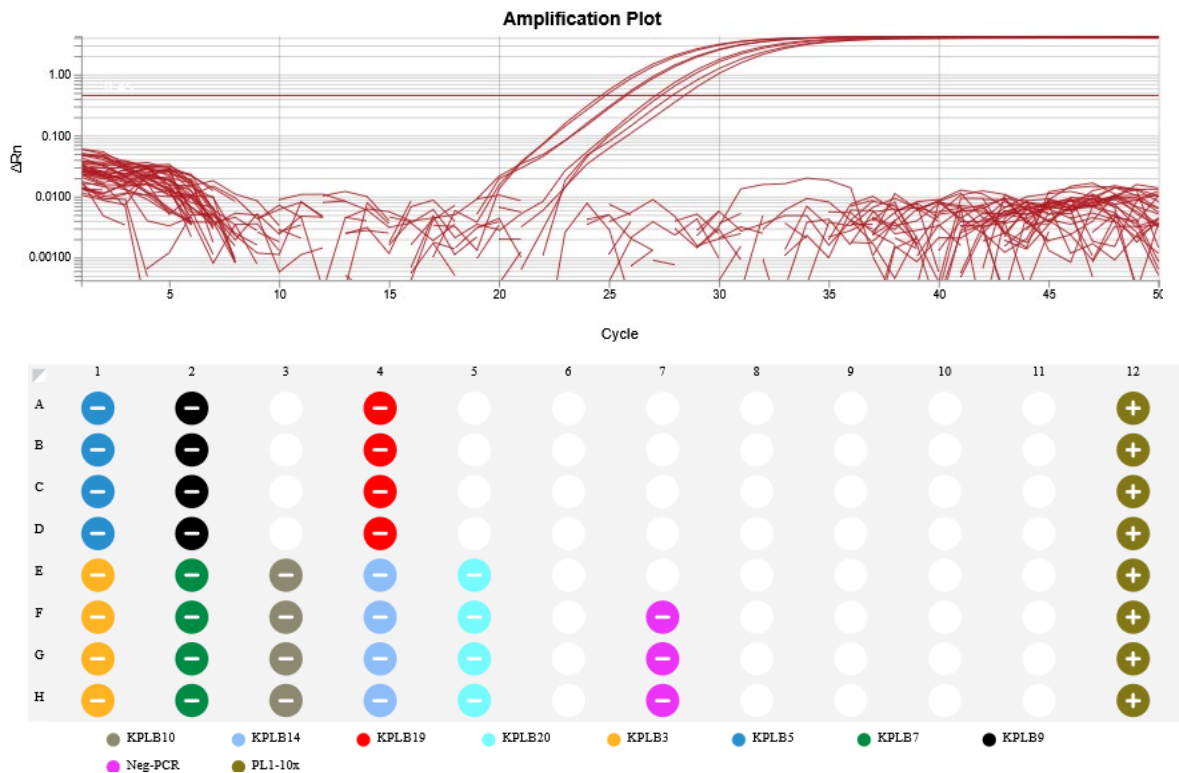
**Slika 5.** Shema razporeditve laboratorijskih prostorov, ki smo jo uporabljali analizo eDNK. Taka shema razporeditve prostorov možnost kontaminacij povezanih s PCR reakcijami. Transport je mogoč samo v smeri modrih puščic, transport v smeri rdečih puščic lahko vodi do kontaminacij s tarčno DNK.

## 4. REZULTATI IN RAZPRAVA

### 4.1. Rezultati analize okoljske DNK

V negativnih kontrolah nismo nikjer zaznali pozitivnega signala. V vseh pozitivnih kontrolah smo vedno dobili specifičen pozitiven signal in standardna redčitvena serija je bila znotraj parametrov za ocenjevanje učinkovitosti qPCR reakcije (90-110% učinkovitost). **Tujerodnih vrst nismo zaznali na nobenem vzorčnem mestu** (Tabela 4). Vsi vzorci so bili v vseh replikatih negativni za eDNK panel za detekcijo trnavca in močvirskega škarjarja. Prvotno izbran panel za signalnega raka, ki smo ga prevzeli od Mauvisseau in sod. (2018), se je izkazal kot nezanesljiv in nespecifičen, v večini vzorcev je bil qPCR test namreč pozitiven v eni do dveh ponovitvah. Ker je tako široka prisotnost te invazivne vrste na Barju malo verjetna, je v tem primeru najverjetneje šlo za lažno pozitivne rezultate zaradi navkrižnih reakcij. Da gre za lažno pozitivne rezultate smo potrdili tako, da smo omenjeni panel zamenjali za drug specifičen eDNK panel, ki so ga razvili Harper in sod. (2018) – za validacijo smo uporabili genomsko DNK domorodnih in tujerodnih rakov izolirano iz tkivnih vzorcev in eDNK iz referentnih območij (vzorec odvzet iz Ormoških lagun). Ob uporabi panela od

Harper in sod. (2018) so bili vsi vzorci negativni tudi za prisotnost signalnega raka (Slika 6). **Domorodni vrsti smo našli na desetih vzorčnih mestih** (Tabela 4). **Koščaka smo zaznali na šestih mestih, na štirih mestih je bil signal prisoten v 4/4 ponovitvah – Borovniščica dolvodno in gorvodno od Borovnice, Kanal Strajanov breg, Škofeljščica – na dveh mestih pa le v 2/8 ponovitvah – Bistra, Bevški jarek** (Slika 7). Koncentracija eDNK koščaka je v prvih štirih vzorcih visoka in nakazuje, da se populacija koščaka nahaja v neposredni bližini vzorčenja, medtem ko je koncentracija eDNK koščaka v zadnjih dveh mestih veliko nižja, iz česar sklepamo, da se populacija ne nahajajo v neposredni bližini vzorčnega mesta, ampak gorvodno od vzorčenega mesta in/ali so gostote nizke. Naše vzorčenje je zajelo njihovo močno razredčeno eDNK. V predhodnih raziskavah smo ugotovili, da z uporabljenim eDNK panelom za koščaka, to vrsto lahko zaznamo tudi kilometer do dva dolvodno od samih populacij (Bedjanič in sod., 2025). **Jelševca smo zaznali na štirih vzorčnih mestih – Draščica, Ižica pri Igu in pred iztokom v Ljubljano in Podlipščica** (Tabela 4, Slika 8). **Na nobenem vzorčnem mestu nismo zaznali obeh vrst hkrati.**

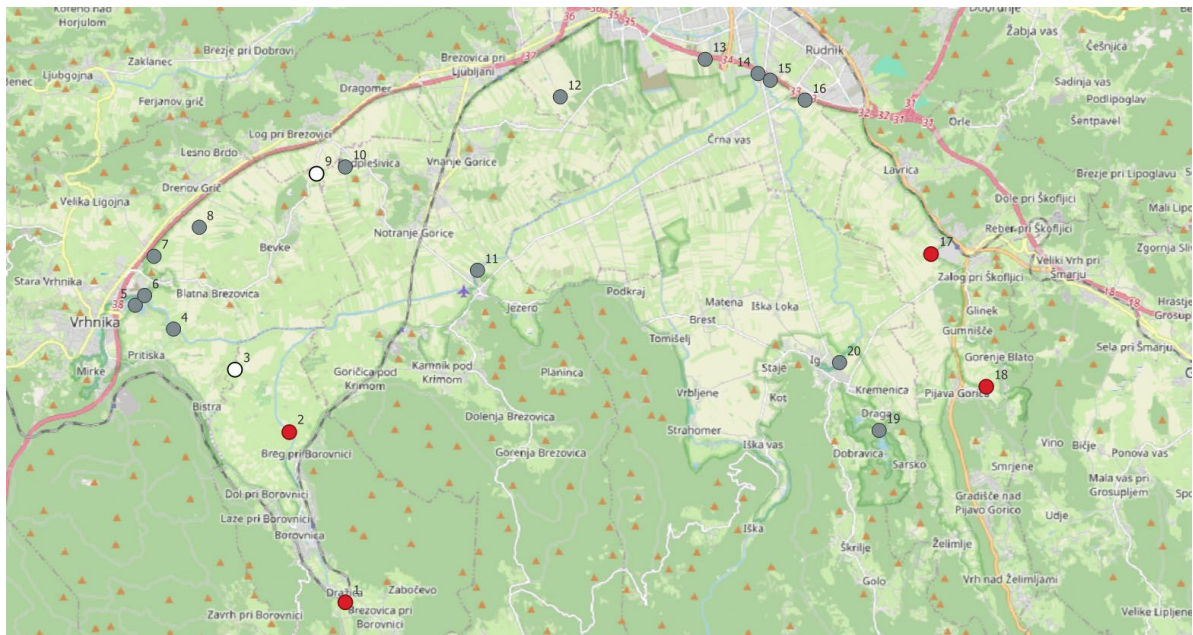


**Slika 6.** Prikaz zajema signala pri testu qPCR za eDNK panel za selekcijo signalnega raka po Harper in sod. (2018). Spodaj so označene tehnične ponovitve s pozitivnimi in negativnimi kontrolami. Zgoraj je prikaz krivulj fluorescence – pozitivni signali (krivulje nad vodoravno črto) pripadajo pozitivnim kontrolam.

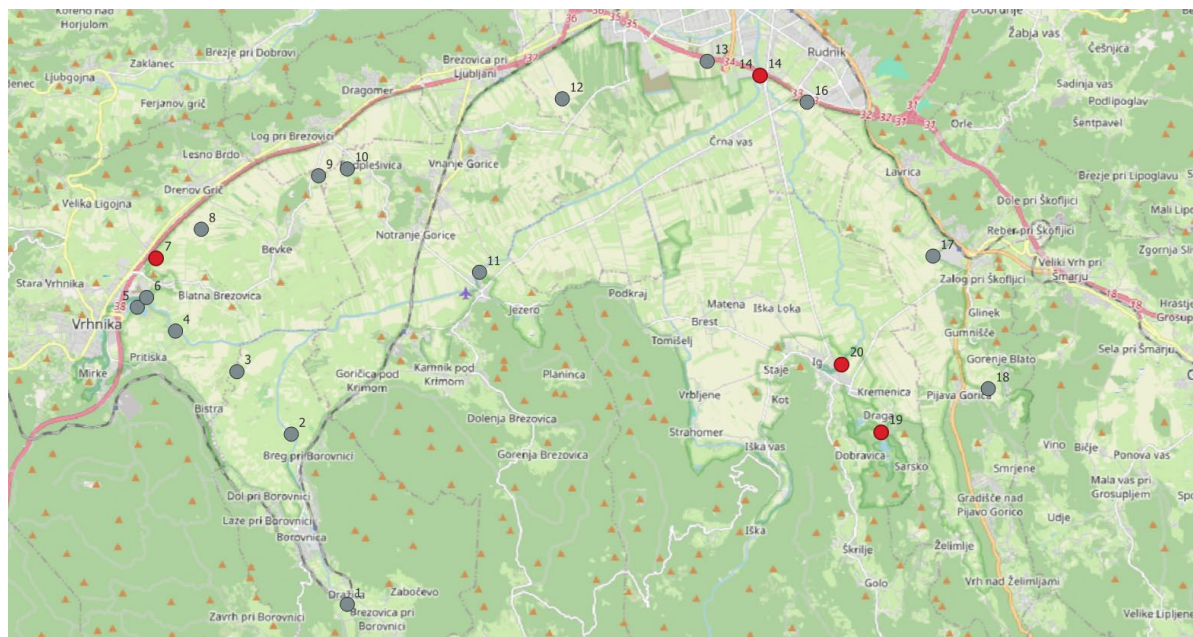
**Tabela 4.** Rezultati vrednotenja stanja domorodnih in tujerodnih rakov z eDNK analizo na območju Ljubljanskega barja za leto 2025. AT – koščak; Astacus – jelševец; Pcla – močvirski škarjar; Olim – trnavec; Plen (II) signalni rak; ++ zaznan močan pozitiven signal, ki pomeni da je tarčna vrsta najverjetneje prisotna v neposredni bližini mesta vzorčenja; + zaznan šibek pozitiven signal, ki pomeni da se tarčne vrste najverjetneje ne nahaja v neposredni bližini mesta vzorčenja, ampak gorvodno in/ali v nizkih gostotah; - pozitiven signal ni bil zaznan; (') število pozitivnih replikatov glede na vse replikate. Za signalnega raka poročamo le rezultate eDNK panela po Harperju in sod. (2018).

Lok	AT	Astacus	Pcla	Olim	Plen (II)
1	++ (4/4)	- (0/8)	- (0/8)	- (0/8)	- (0/8)
2	++ (4/4)	- (0/8)	- (0/8)	- (0/8)	- (0/8)
3	+ (2/8)	- (0/8)	- (0/8)	- (0/8)	- (0/8)
4	- (0/8)	- (0/8)	- (0/8)	- (0/8)	- (0/8)
5	- (0/8)	- (0/8)	- (0/8)	- (0/8)	- (0/8)
6	- (0/8)	- (0/8)	- (0/8)	- (0/8)	- (0/8)
7	- (0/8)	++ (4/4)	- (0/8)	- (0/8)	- (0/8)
8	- (0/8)	- (0/8)	- (0/8)	- (0/8)	- (0/8)
9	+ (2/8)	- (0/8)	- (0/8)	- (0/8)	- (0/8)
10	- (0/8)	- (0/8)	- (0/8)	- (0/8)	- (0/8)
11	- (0/8)	- (0/8)	- (0/8)	- (0/8)	- (0/8)
12	- (0/8)	- (0/8)	- (0/8)	- (0/8)	- (0/8)
13	- (0/8)	- (0/8)	- (0/8)	- (0/8)	- (0/8)
14	- (0/8)	++ (2/4)	- (0/8)	- (0/8)	- (0/8)
15	- (0/8)	- (0/8)	- (0/8)	- (0/8)	- (0/8)
16	- (0/8)	- (0/8)	- (0/8)	- (0/8)	- (0/8)
17	++ (4/4)	- (0/8)	- (0/8)	- (0/8)	- (0/8)
18	++ (4/4)	- (0/8)	- (0/8)	- (0/8)	- (0/8)
19	- (0/8)	++ (4/4)	- (0/8)	- (0/8)	- (0/8)
20	- (0/8)	++ (4/4)	- (0/8)	- (0/8)	- (0/8)





**Slika 7.** Zemljevid z rezultati vrednotenja prisotnosti koščaka na osnovi analize eDNK. Rdeči krogi predstavljajo vzorčna mesta, kjer smo zaznali močan eDNK signal, ki pomeni da je tarčna vrsta najverjetneje prisotna v neposredni bližini mesta vzorčenja. Beli krogi predstavljajo vzorčna mesta, kjer smo zaznali šibek eDNK signal, ki pomeni da tarčna vrsta najverjetneje ni prisotna v neposredni bližini mesta vzorčenja ampak gorvodno in/ali v nizkih gostotah. Sivi krogi predstavljajo vzorčna mesta kjer nismo zaznali eDNK signala.



**Slika 8.** Zemljevid z rezultati vrednotenja prisotnosti jelševca na osnovi analize eDNK. Rdeči krogi predstavljajo vzorčna mesta, kjer smo zaznali eDNK signal in pomenijo, da je tarčna vrsta najverjetneje prisotna v neposredni bližini mesta vzorčenja. Sivi krogi predstavljajo vzorčna mesta, kjer nismo zaznali eDNK signala.

## 5. PREDLOG NADALJNIH UKREPOV

V strokovni nalogi na nobenem mestu v letu 2025 nismo zaznali tujerodnih rakov. Po naših preliminarnih ocenah lahko v malih do srednje velikih vodah zaznamo signal eDNK potočnih rakov tudi od enega do dveh kilometrov dolvodno (Bedjanič in sod., 2025). Širjenje invazivnih vrst je realno možno zaustaviti samo v najbolj zgodnjih fazah naselitve, zato **predlagamo, da se v letu 2026 nadaljuje vrednotenjem stanja tujerodnih rakov na osnovi eDNK v vsaj takšnem obsegu. Predlagamo še, da se v prihodnje nadaljuje tudi z vrednotenjem razširjenosti domorodnih rakov na osnovi eDNK, predvsem v kontekstu ugotavljanja razširjenosti koščaka gorvodno od vzorčnih mest na Bistri in Bevškem jarku.**

## 6. LITERATURA

Banchi E, Group AW, Ametrano CG in sod 2020. Environmental DNA assessment of airborne plant and fungal seasonal diversity. *Sci Total Environ* 738: 14024.

Bedjanič M, Vrezec A, Kapla A, Stanković D 2025. Vmesno poročilo o spremljanju morebitnega širjenja invazivne tujerodne vrste raka trnavca (*Orconectes limosus*) na vplivnem območju Dravinja s pritoki (SI3000306). NIB, Ljubljana.

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.

Gorički Š, Stanković D, Snoj A in sod 2017 Environmental DNA in subterranean biology: range extension and taxonomic implications for *Proteus*. *Sci Rep* 7: 45054.

Harper KJ, Anucha NP, Turnbull JF in sod 2018 Searching for a signal: Environmental DNA (eDNA) for the detection of invasive signal crayfish, *Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852). *Managm Biol Inv* 9: 137–148.

Jaklič T in Vrezec A 2011 The first tropical alien crayfish species in European waters: the Redclaw *Cherax quadricarinatus* (von Martens, 1868) (Decapoda, Parastacidae). *Crustaceana* 84: 651-65.

La Torre M, Cussigh A, Crobe V in sod 2024 Environmental DNA Metabarcoding of Cephalopod Diversity in the Tyrrhenian Deep Sea. *J Mar Sci Eng* 12: 1897.

Mauvisseau Q, Coignet A, Delaunay C, in 2018 Environmental DNA as an efficient tool for detecting invasive crayfishes in freshwater ponds. *Hydrobiol*, 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.

Stanković D, Strah S (2025) Ugotavljanja razširjenosti močvirskega škarjarja na osnovi analize okoljske DNK v okolici Lopate v letu 2025. Končno poročilo.

Vences M, Lyra ML, Perl RGB in sod 2016 Freshwater vertebrate metabarcoding on Illumina platforms using double-indexed primers of the mitochondrial 16S rRNA gene. *Conservation Genet Resour* 8: 323–327.

Stanković D, Strah S (2025) Spremljanje prisotnosti tujerodnih in domorodnih vrst potočnih rakov na območju Krajinskega parka Ljubljansko barje v letu 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