

eDNA: tutti lasciamo tracce. Il DNA ambientale per lo studio e la conservazione dell'ambiente.

Martedì 20 maggio 2025 ore 10:00

Valentina Torboli - ARPA FVG



REALIZZATO DA:



Scuola per l'Ambiente di ARPA FVG

eDNA: tutti lasciamo tracce.

Il DNA ambientale per lo studio e la conservazione dell'ambiente.

Martedì 20 maggio 2025

Valentina Torboli – ARPA FVG

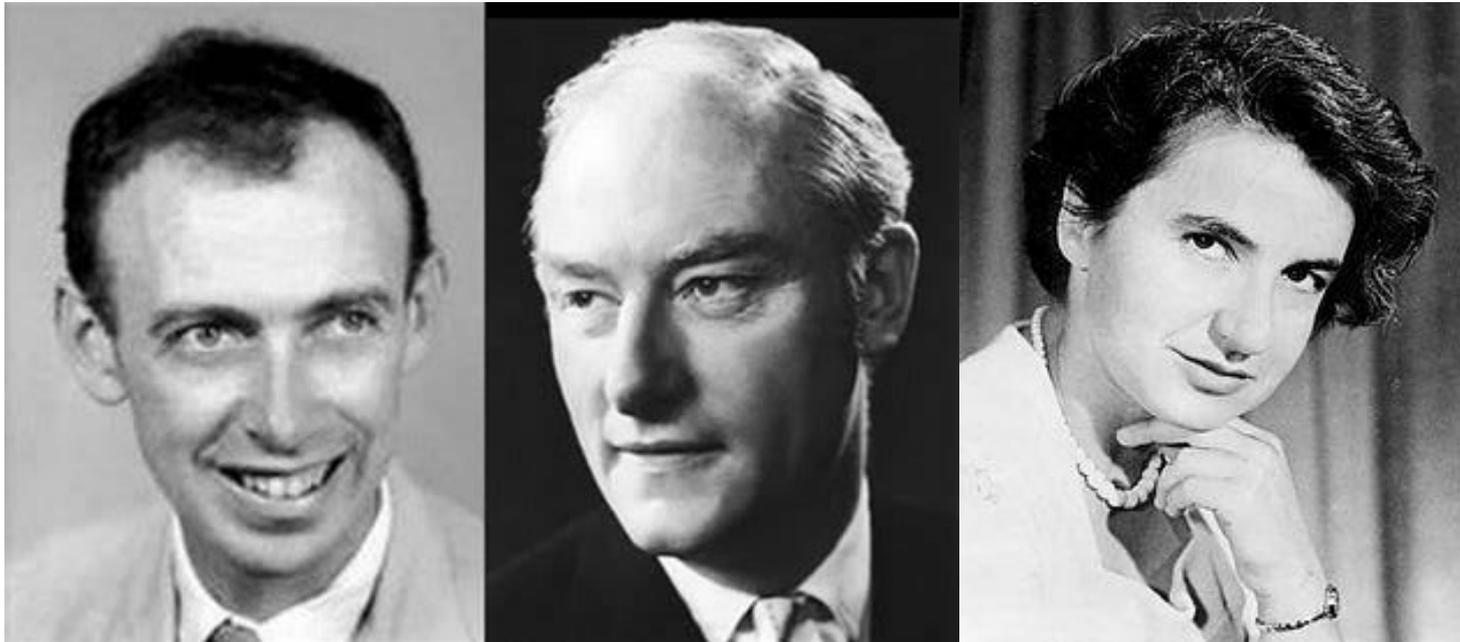
Scuola per l'Ambiente di ARPA FVG

eDNA: tutti lasciamo tracce.

Il DNA ambientale per lo studio e la conservazione dell'ambiente.

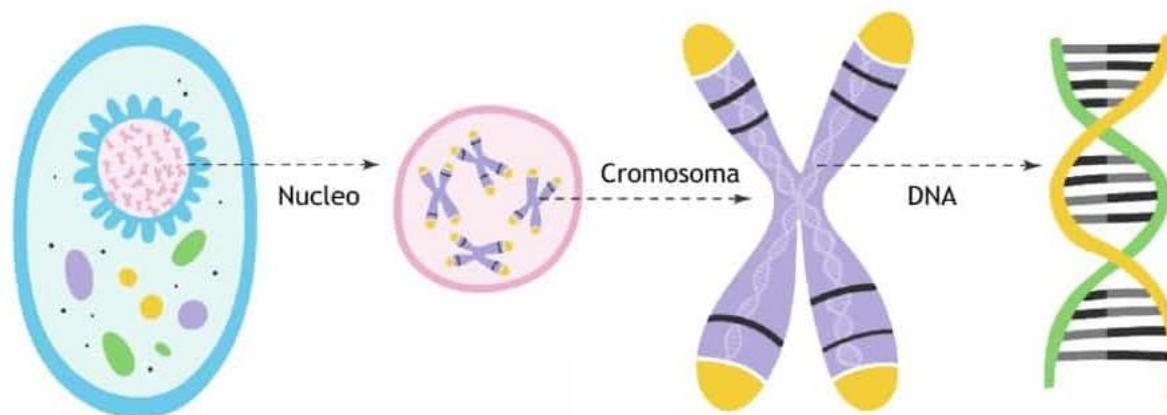
- La Genetica Ambientale
- Il DNA ambientale: cos'è e dove si trova
- Metodi e strumenti per l'analisi del DNA ambientale
- A cosa serve l'analisi del DNA ambientale
- Esempi di progetti che hanno previsto o prevedono l'analisi del DNA ambientale

L'acido desossiribonucleico



James Watson, Francis Crick...e **Rosalind Franklin!**

L'acido desossiribonucleico



- il DNA è una molecola che contiene le informazioni genetiche per lo sviluppo, il metabolismo e la riproduzione di tutti gli esseri viventi
- è contenuto nel **nucleo** delle cellule
- è formato da zuccheri e basi azotate che fanno coppia tra loro
- la sequenza delle basi azotate costituisce il **codice genetico**
- negli esseri umani è lungo **3,2 miliardi** di paia di basi: in ogni cellula vi è circa 1 metro di DNA!

La Genetica Ambientale

- Genetica di Popolazione
- Genetica della conservazione
- Genetica e DNA ambientale

La Genetica Ambientale

- Genetica di Popolazione

Perché spostare il focus dall'individuo alla **popolazione**?

Perché sono le popolazioni le unità su cui agisce l'**evoluzione**!

La variabilità della struttura genetica delle popolazioni viene misurata analizzando i **polimorfismi del DNA**.

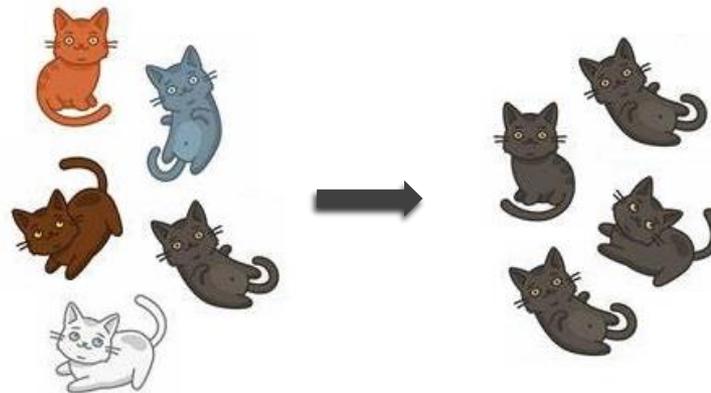


La Genetica Ambientale

- Genetica della Conservazione

Le caratteristiche genetiche locali vanno preservate perché sono il risultato dell'**adattamento** alle condizioni ambientali.

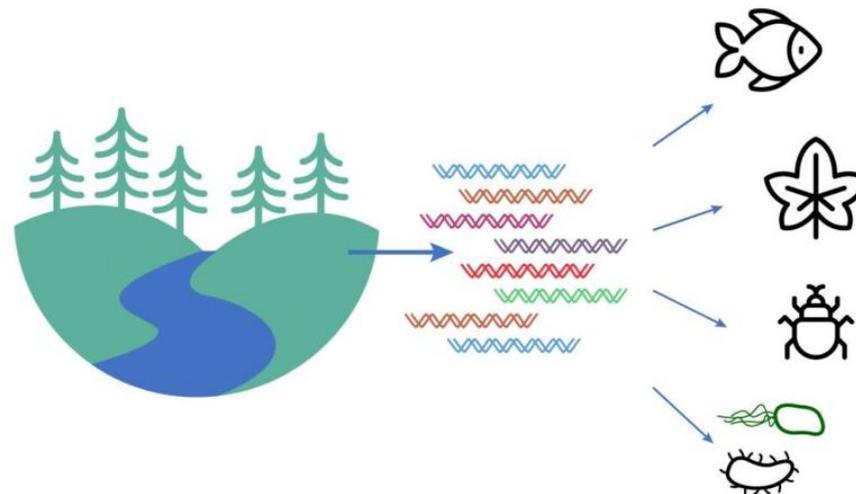
Se l'ambiente si modifica, la diversità dei singoli individui di una popolazione perde l'**equilibrio** genetico.



La Genetica Ambientale

- Genetica e DNA ambientale

Lo studio della diversità del **DNA** rilasciato dagli organismi nell'ambiente permette di determinare se l'**equilibrio** è rispettato e, quindi, lo stato di salute.



Il DNA ambientale - eDNA

environmental

L'**eDNA** è l'insieme di molecole di DNA presenti in matrici ambientali come acqua, sedimento e aria.

Principio: tutti gli organismi disperdono DNA nell'ambiente sotto forma di muco, feci, cellule della pelle e gameti.



Il DNA ambientale - eDNA

Le tecniche sono le stesse della Genetica Forense.



Il DNA barcode

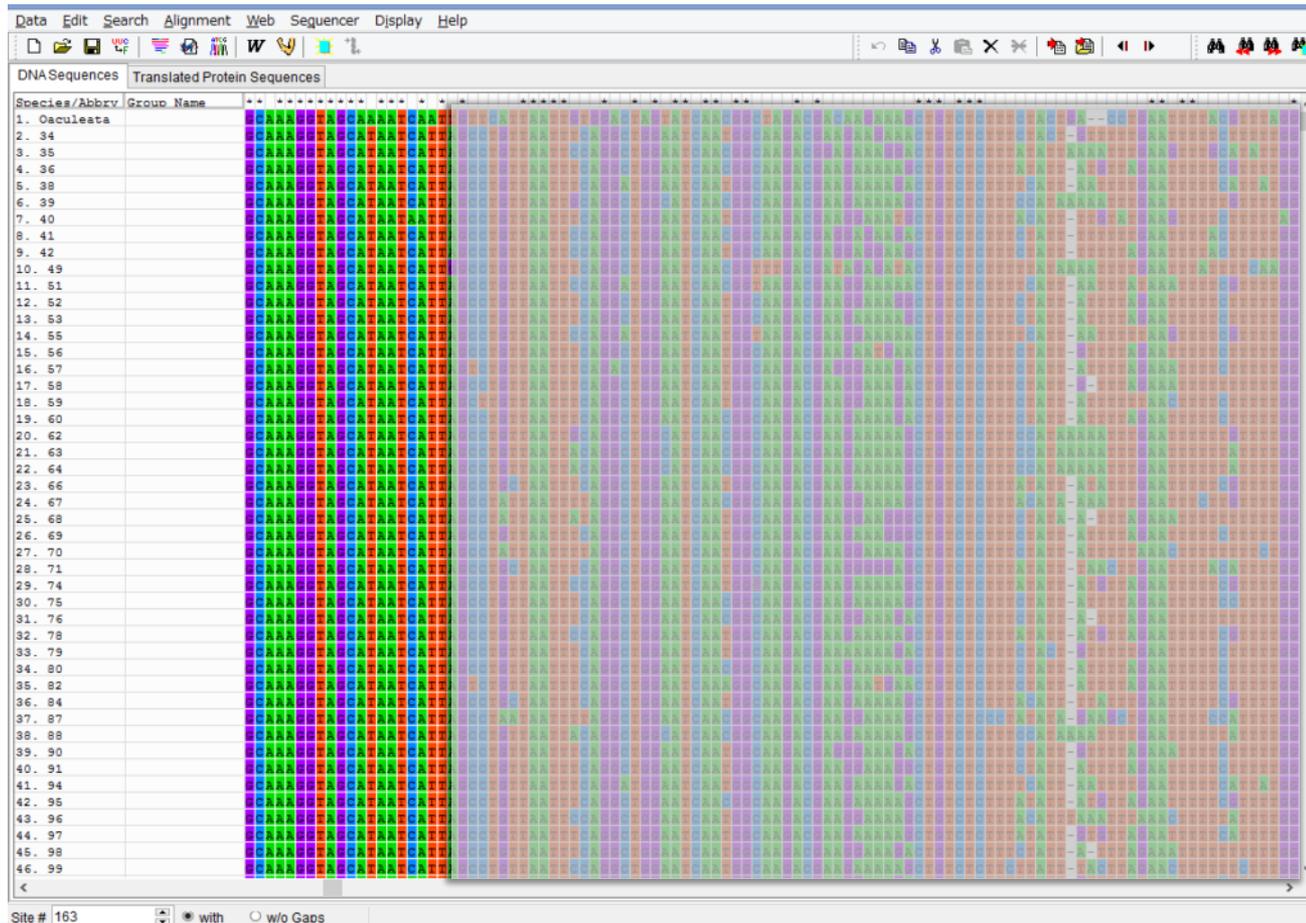
Su cosa si basa? Il DNA possiede regioni **conservate** e regioni **variabili**.



A
T
G
C

Il DNA barcode

Su cosa si basa? Il DNA possiede regioni **conservate** e regioni **variabili**.



A
T
G
C

Il DNA barcode

Su cosa si basa? Il DNA possiede regioni **conservate** e regioni **variabili**.

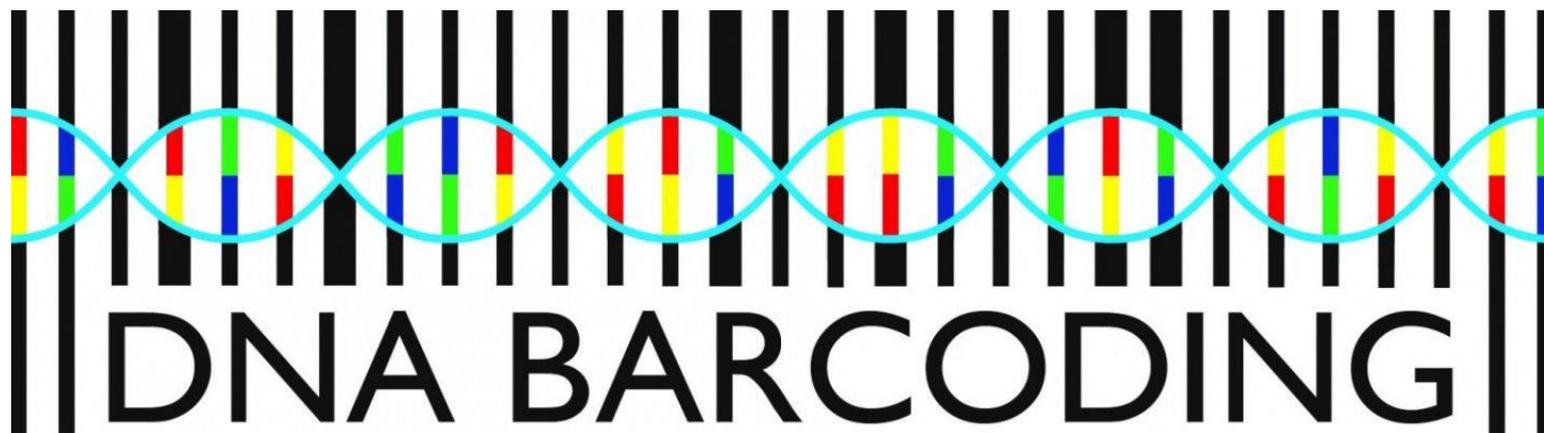


A
T
G
C

Il DNA barcode

Avere un codice a barre distintivo per ogni specie: il sogno dei tassonomi!

Oggi è realizzabile: esistono tratti del DNA che permettono di identificare in modo semplice e rapido specie differenti, *esattamente come lo scanner di un supermercato utilizza le strisce nere dei codici a barre per identificare un prodotto.*



Il DNA barcode

Avere un codice a barre distintivo per ogni specie: il sogno dei tassonomi!

Oggi è realizzabile: esistono tratti del DNA che permettono di identificare in modo semplice e rapido specie differenti, *esattamente come lo scanner di un supermercato utilizza le strisce nere dei codici a barre per identificare un prodotto.*

Valentina



Homo sapiens



Pan troglodytes



Felis catus



Canis lupus



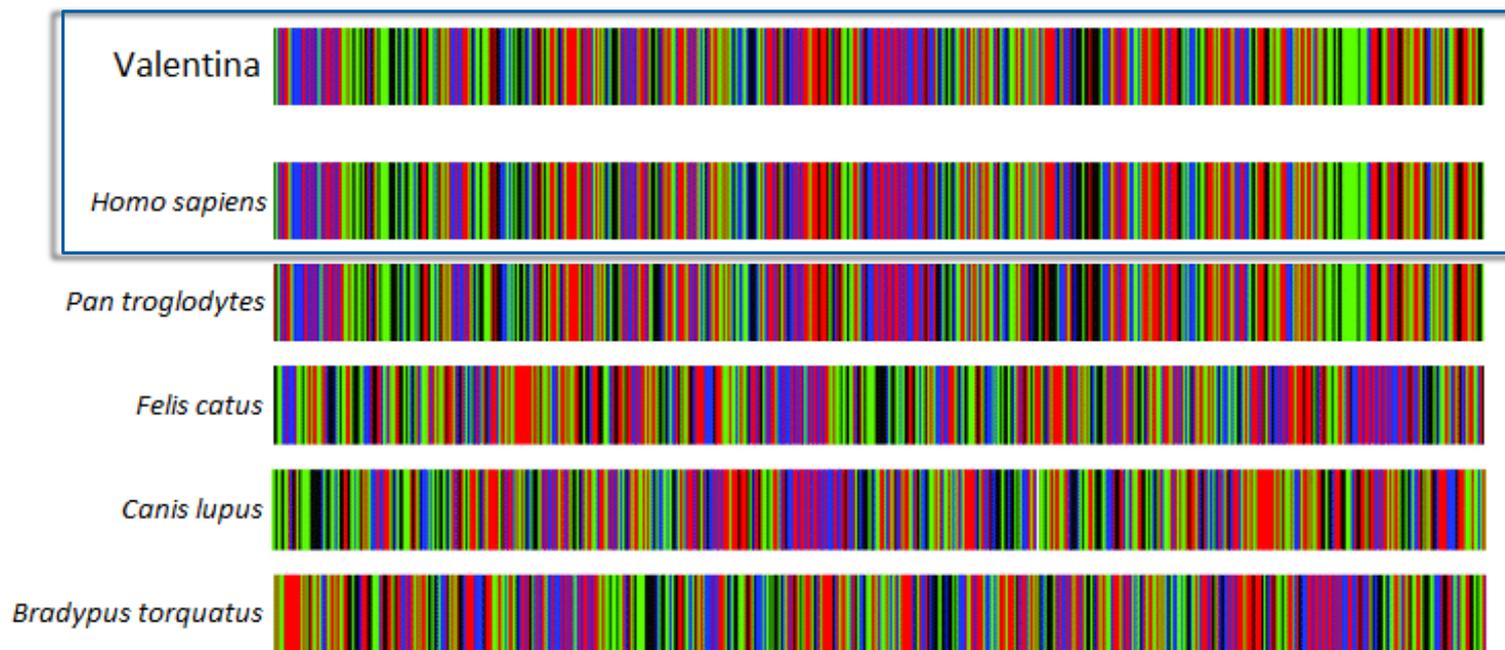
Bradypus torquatus



Il DNA barcode

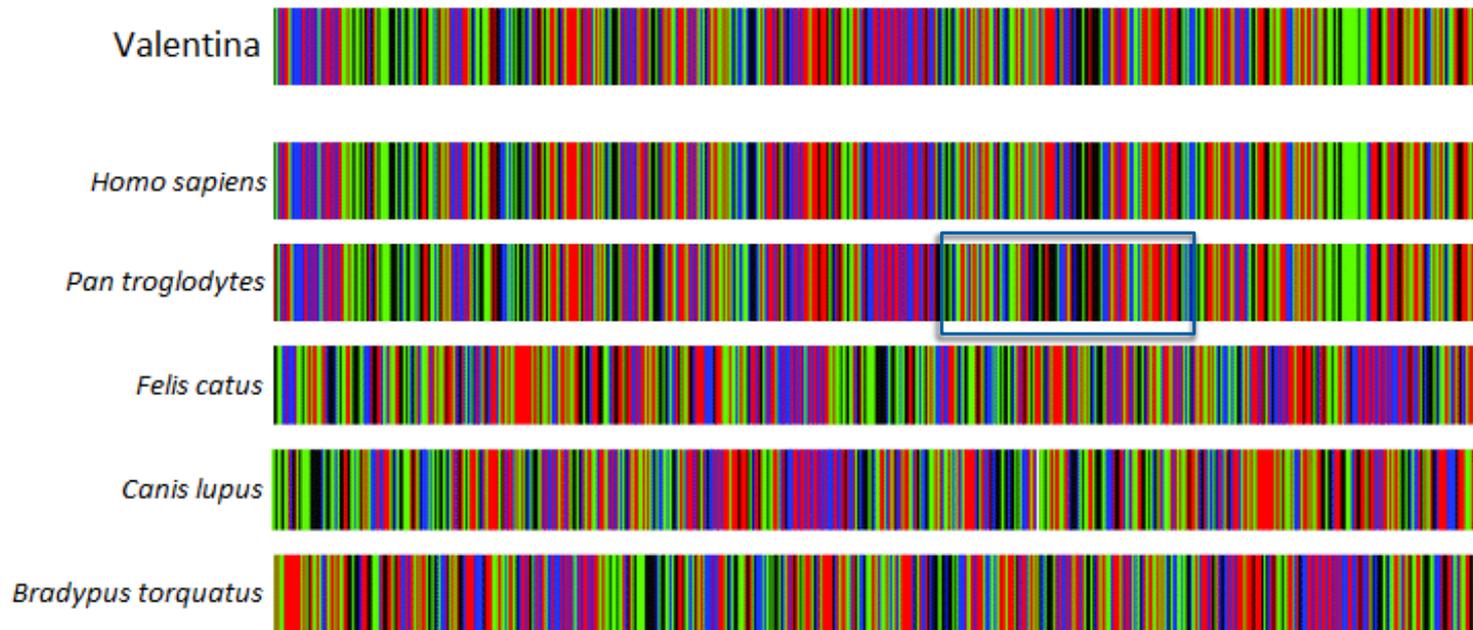
È possibile comparare tra loro sequenze di DNA, in modo da trovare quella più simile per determinare a quale specie appartiene l'organismo oggetto di studio.

Esempio: la mia sequenza barcode è identica a quella di *Homo sapiens*, quindi io appartengo a *Homo sapiens*.



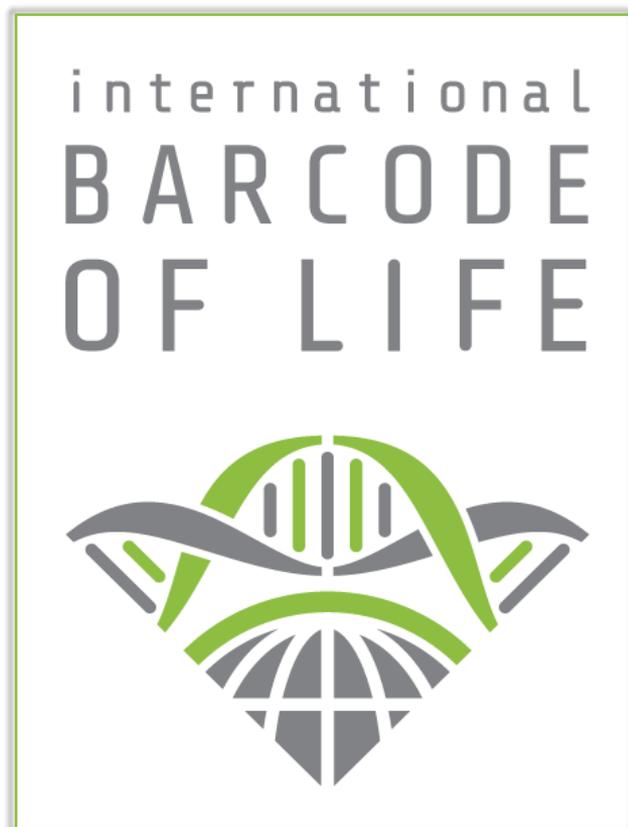
Il DNA barcode

Più le specie sono evolutivamente vicine, più i barcode si somigliano. Ciò nonostante, le moderne tecniche di sequenziamento del DNA sono in grado di rilevare anche **piccolissime differenze** di singoli nucleotidi ed è quindi, quasi sempre possibile associare una sequenza alla relativa specie.



Il DNA barcode

E com'è possibile associare una determinata sequenza alla relativa specie?



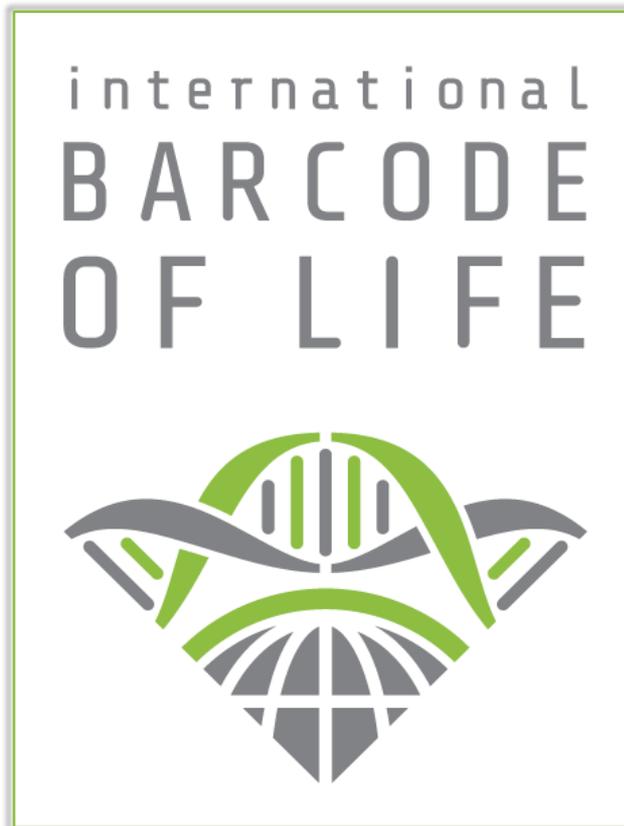
Il **Barcode of Life Data System (BOLD)** è un archivio di sequenze geniche dedicato alla codifica dei frammenti barcode di DNA.

BOLD mette a disposizione degli utenti una piattaforma online per l'analisi delle sequenze e per la ricerca delle **corrispondenze**.

Al 2025, BOLD contiene la codifica univoca delle sequenze di DNA riferibili a **1.261.489** specie.

Il DNA barcode

E com'è possibile associare una determinata sequenza alla relativa specie?



Exclusive!
A teaser for the
Fall 2019 feature article:
BIOSCAN
Observing Global Biodiversity with DNA

Current online featured articles:

Using DNA barcodes as a medical diagnostic tool in Mexico	Scientists and rangers biomonitoring National Parks in South Africa	Fighting illegal wildlife trade in the Philippines with DNA barcoding
---	---	---

Il DNA barcode

Ogni *taxon* ha il suo **barcode** d'elezione, quello che meglio riesce a ricondurre la sequenza di DNA alla specie d'appartenenza.

Batteri



16S
rpoB
dnaK

Funghi



ITS
LSU
18S

Piante



rbcl
matK
ITS

Animali



COI
ITS
18S

Alghe



ITS
rbcl
18s

Che sigle astruse!

Altro non sono che regioni specifiche del DNA in cui la specie-specificità è migliore per quel taxon!

Il DNA barcode

Ogni *taxon* ha il suo **barcode** d'elezione, quello che meglio riesce a ricondurre la sequenza di DNA alla specie d'appartenenza.

Batteri



16S
rpoB
dnaK

Funghi



ITS
LSU
18S

Piante



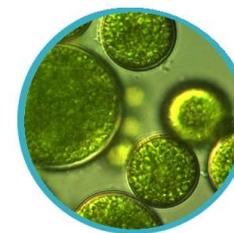
rbcl
matK
ITS

Animali



COI
ITS
18S

Alghe



ITS
rbcl
18s

Che sigle astruse!

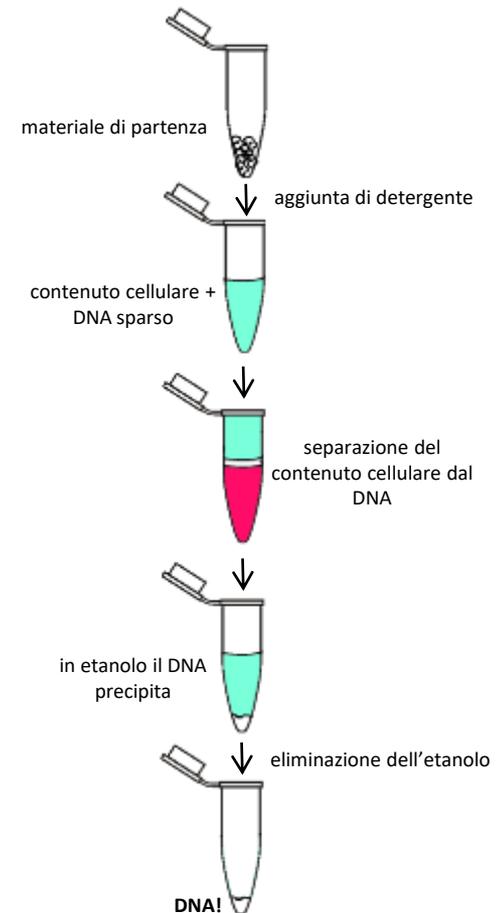
Altro non sono che regioni specifiche del DNA in cui la specie-specificità è migliore per quel taxon!

I metodi

L'estrazione del DNA

Passaggi fondamentali:

- **preparazione** del campione
- **lisi** delle membrane cellulari e nucleari e rilascio del contenuto: le membrane sono costituite da fosfolipidi, molecole ricche di grassi: si utilizzano quindi detergenti
- **digestione** delle proteine: eliminazione delle proteine su cui il DNA è avvolto (gli istoni) con l'aggiunta di sali
- **separazione del DNA dal contenuto cellulare:** il DNA è insolubile in etanolo e precipita quando viene aggiunto alcol, separandosi dal resto
- **recupero** e concentrazione del DNA estratto



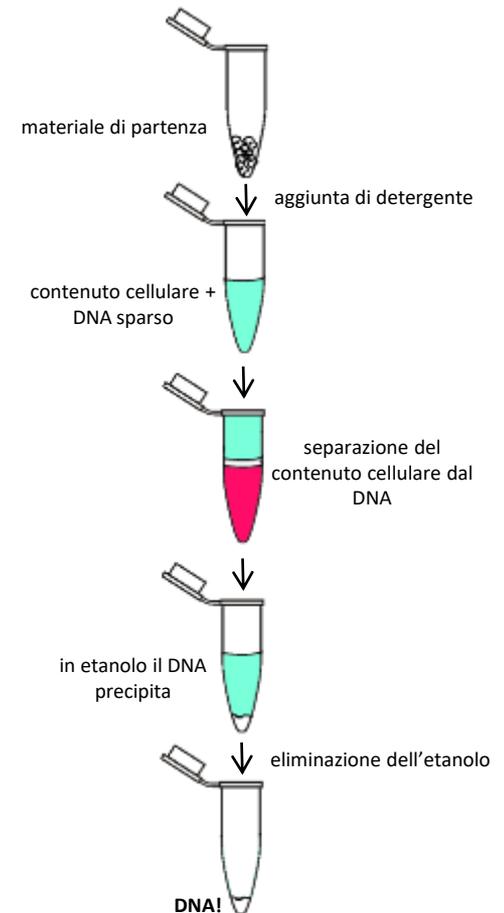
I metodi

L'estrazione del DNA

In laboratorio si possono utilizzare metodi più avanzati per una migliore riuscita dell'estrazione:

- Reagenti di nuova generazione
- Kit già preparati
- Giochi di temperature
- Sonicazione
- Biglie paramagnetiche
- Colonnine in cellulosa

...ma...



I metodi

L'estrazione del DNA

...non è così difficile estrarre il DNA anche a casa!

1. Mordete e grattate le guance con i denti. Tenete in bocca la saliva che si forma senza inghiottirla.
2. Nel frattempo versate circa 5 ml di acqua in una provetta (vanno bene quelle strette per le urine) portatela in bocca senza inghiottirla e sciacquate la bocca come quando ci si finisce di lavarsi i denti.
3. Sputate acqua e saliva nella stessa provetta.
4. Aggiungete un cucchiaino di sale da cucina e uno di detersivo per i piatti.
5. Agitate la provetta.
6. Versate circa 3 ml della soluzione in un'altra provetta e aggiungete con delicatezza circa 8 ml di alcol.
7. Non agitate la provetta e attendete qualche minuto.
8. Il fiocco bianco che si stacca dalla fase sottostante e che finisce nell'alcol è il vostro DNA. Osservate come, in effetti, sia una sostanza filamentosa.



I metodi

L'estrazione del DNA ambientale

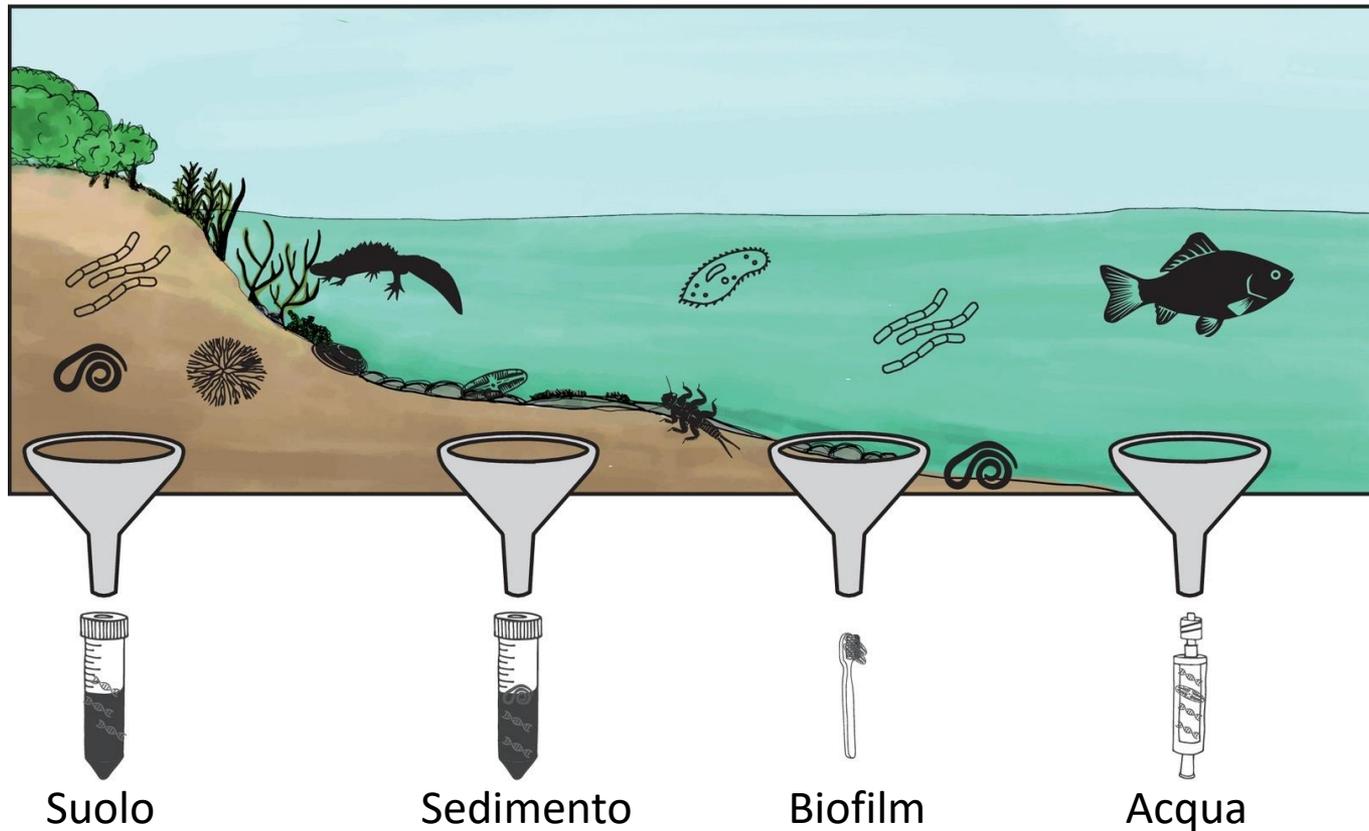


Si parte da molto più materiale!

Esempio: per estrarre il DNA contenuto in un campione di acqua di mare, è assolutamente necessario filtrarla per concentrarne il contenuto.

I metodi

L'estrazione del DNA ambientale

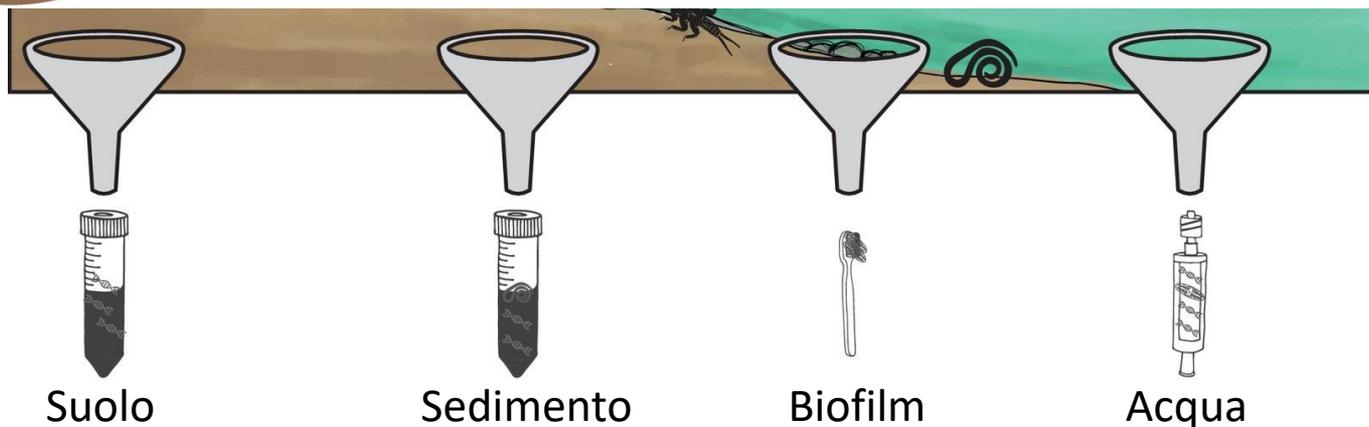


I metodi

L'estrazione del DNA ambientale



Open Science for Life in Space



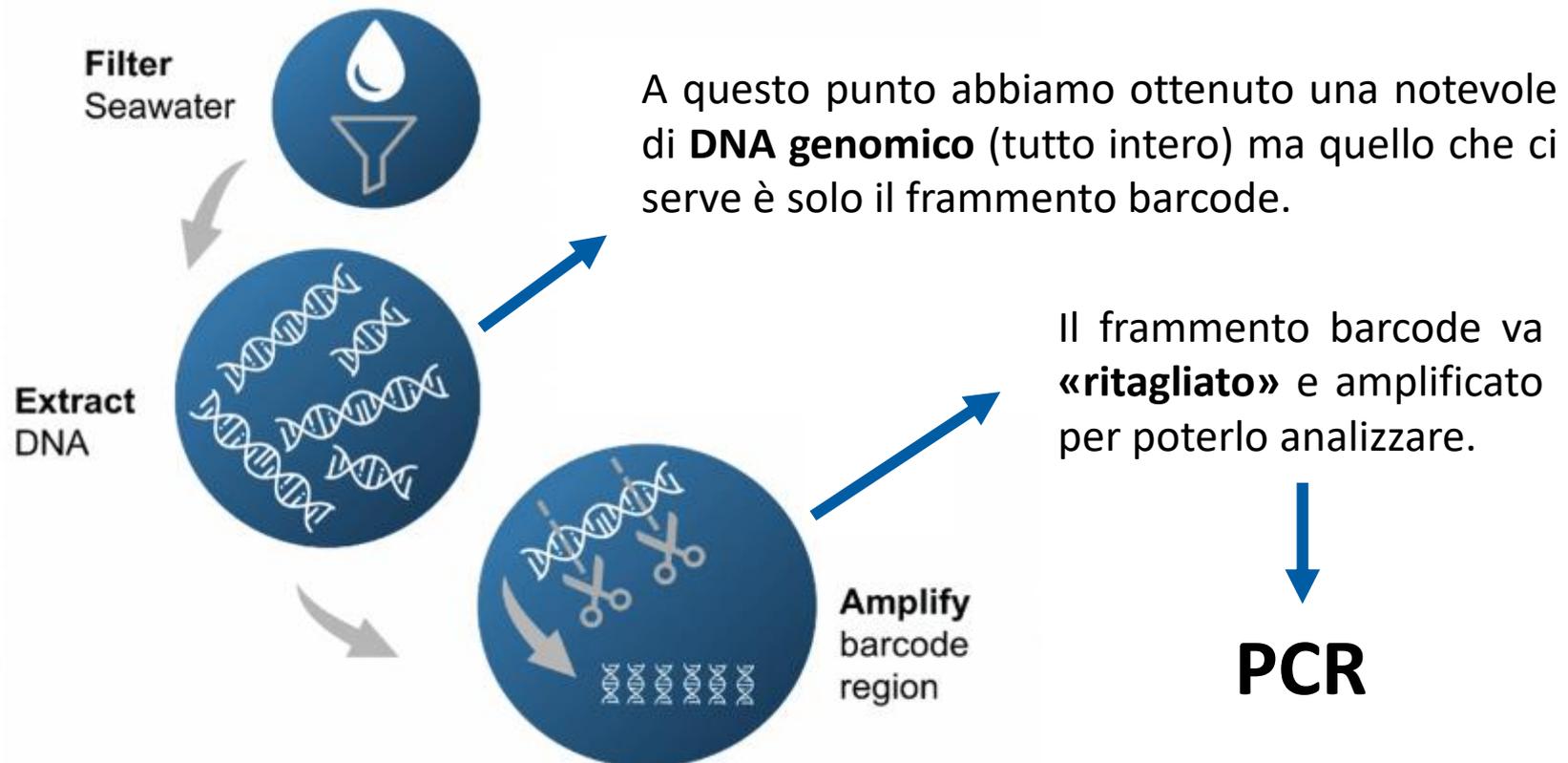
I metodi

L'estrazione del DNA ambientale



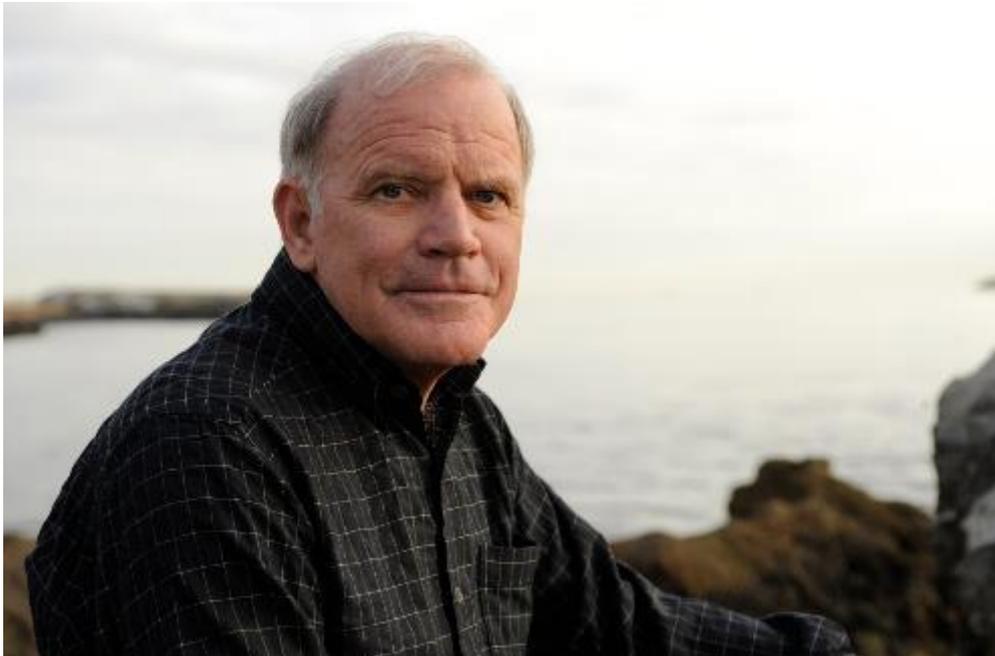
I metodi

L'amplificazione del DNA



I metodi

La reazione a catena della polimerasi



Consiglio non richiesto:



Con la PCR **Kary Mullis** ha rivoluzionato la biologia molecolare e la medicina, semplicemente riproducendo quello che avviene naturalmente nelle cellule.

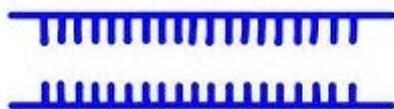
I metodi

La reazione a catena della polimerasi

1. Denaturazione



~95°C

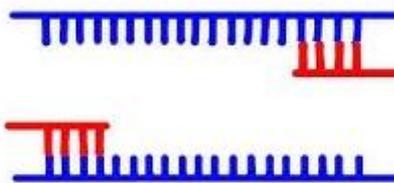


La doppia elica di DNA si separa

2. Allineamento



~55°C

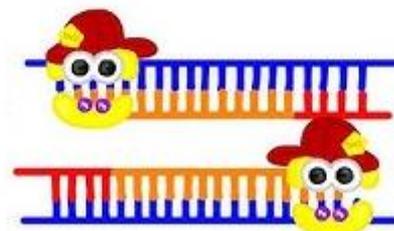


I «**primer**» (gli inneschi specifici per ritagliare la parte di DNA d'interesse) si appaiano con il DNA.

3. Estensione



~72°C

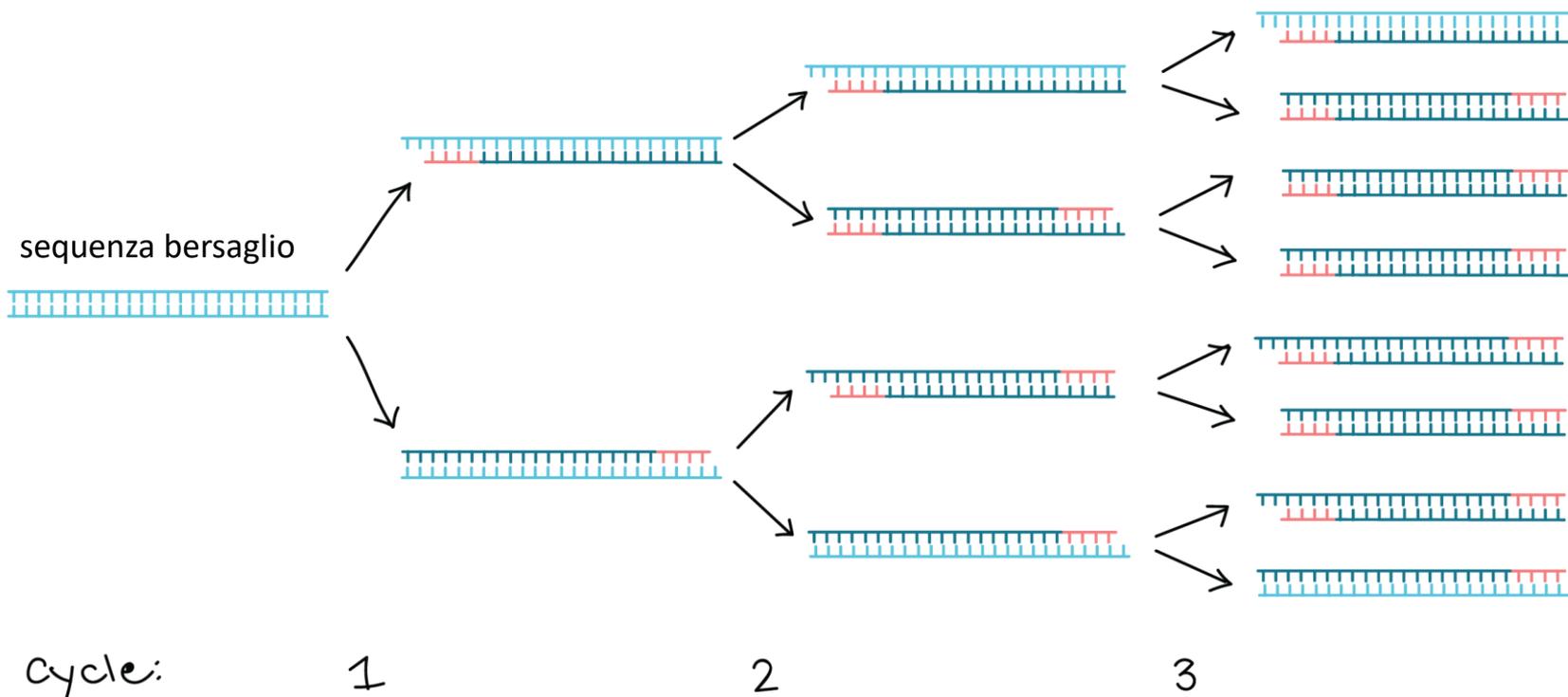


La **polimerasi** ricostruisce il frammento complementare a partire dai primer.



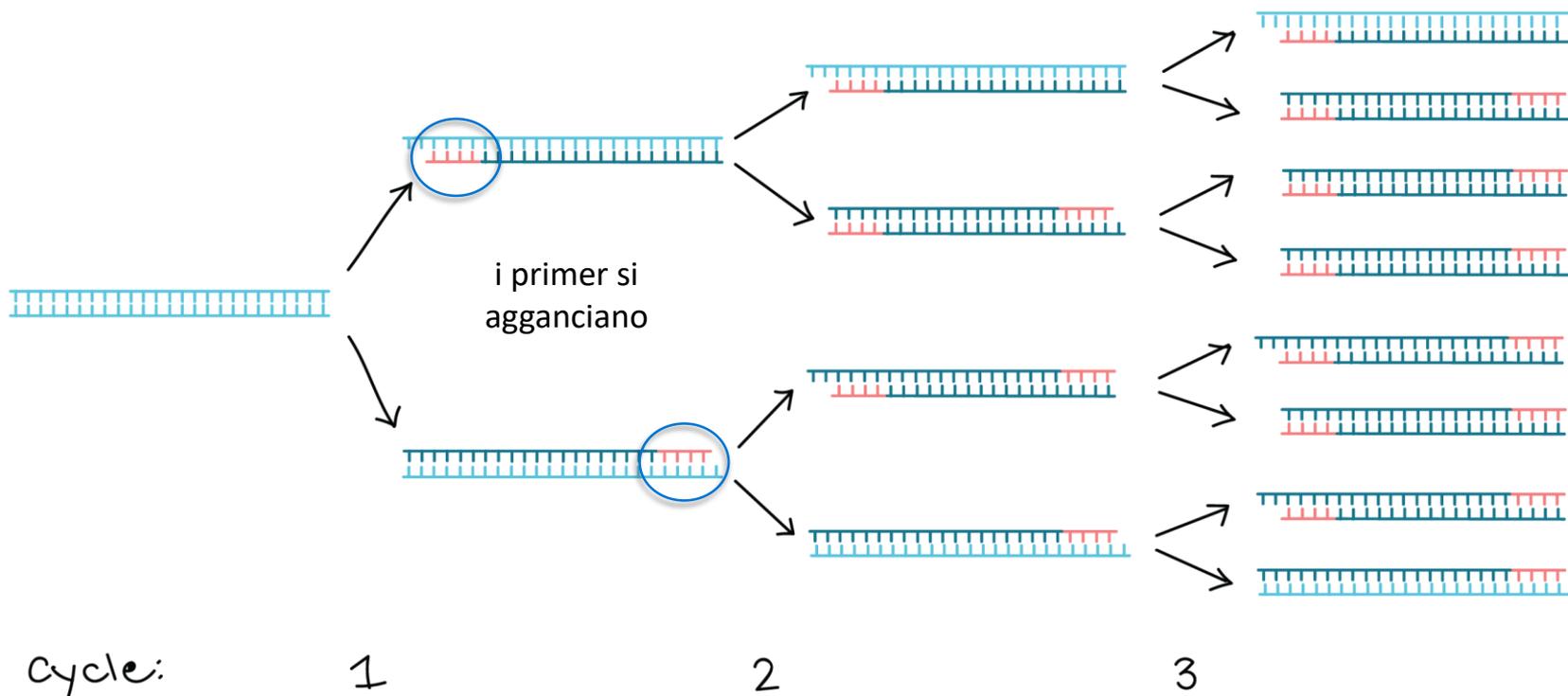
I metodi

La reazione a catena della polimerasi



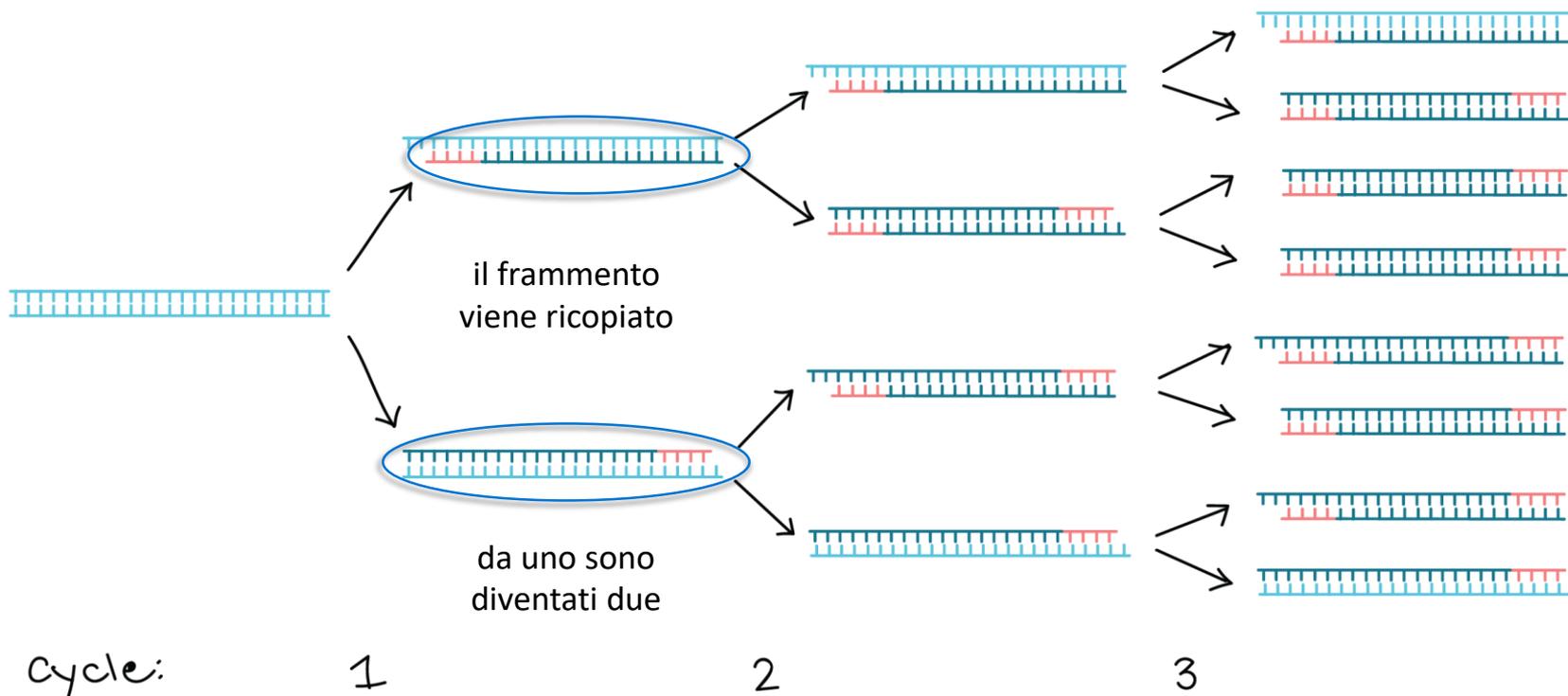
I metodi

La reazione a catena della polimerasi



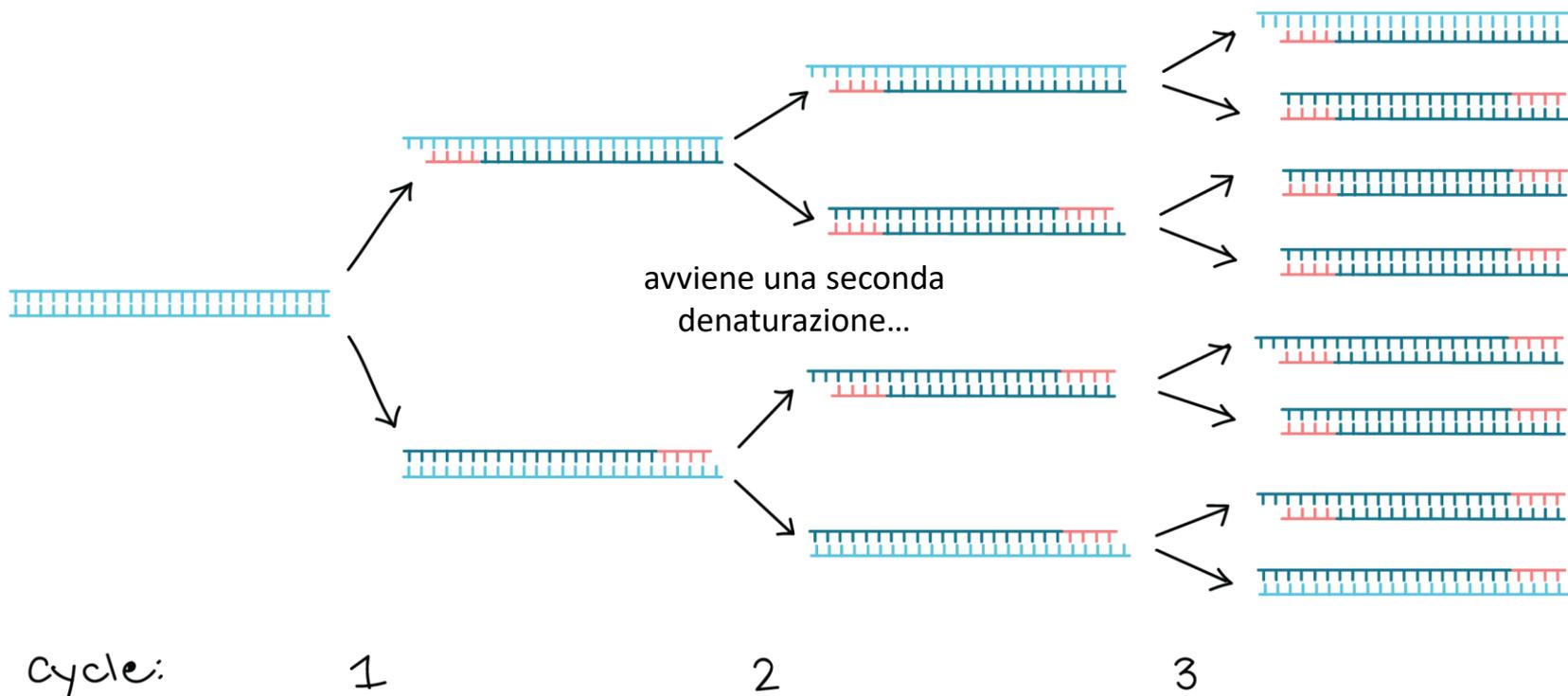
I metodi

La reazione a catena della polimerasi



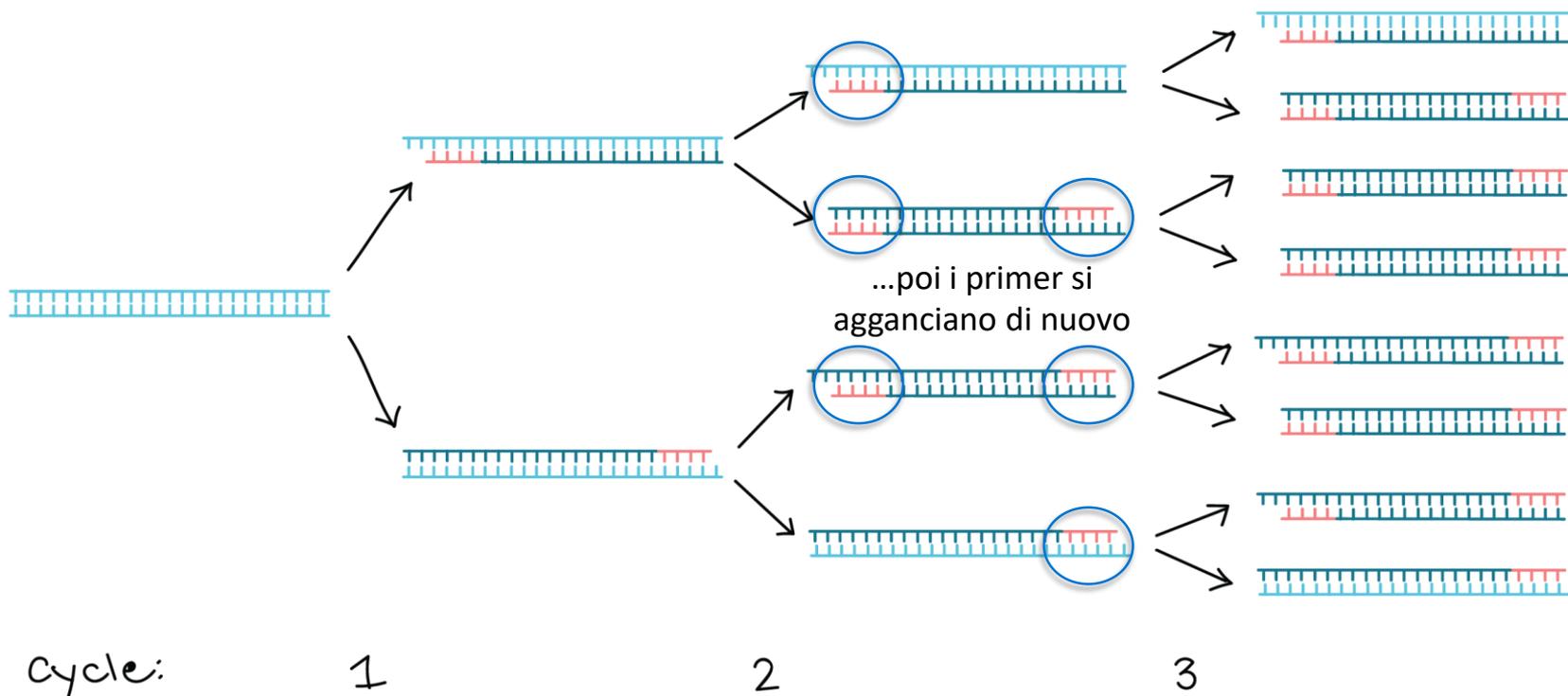
I metodi

La reazione a catena della polimerasi



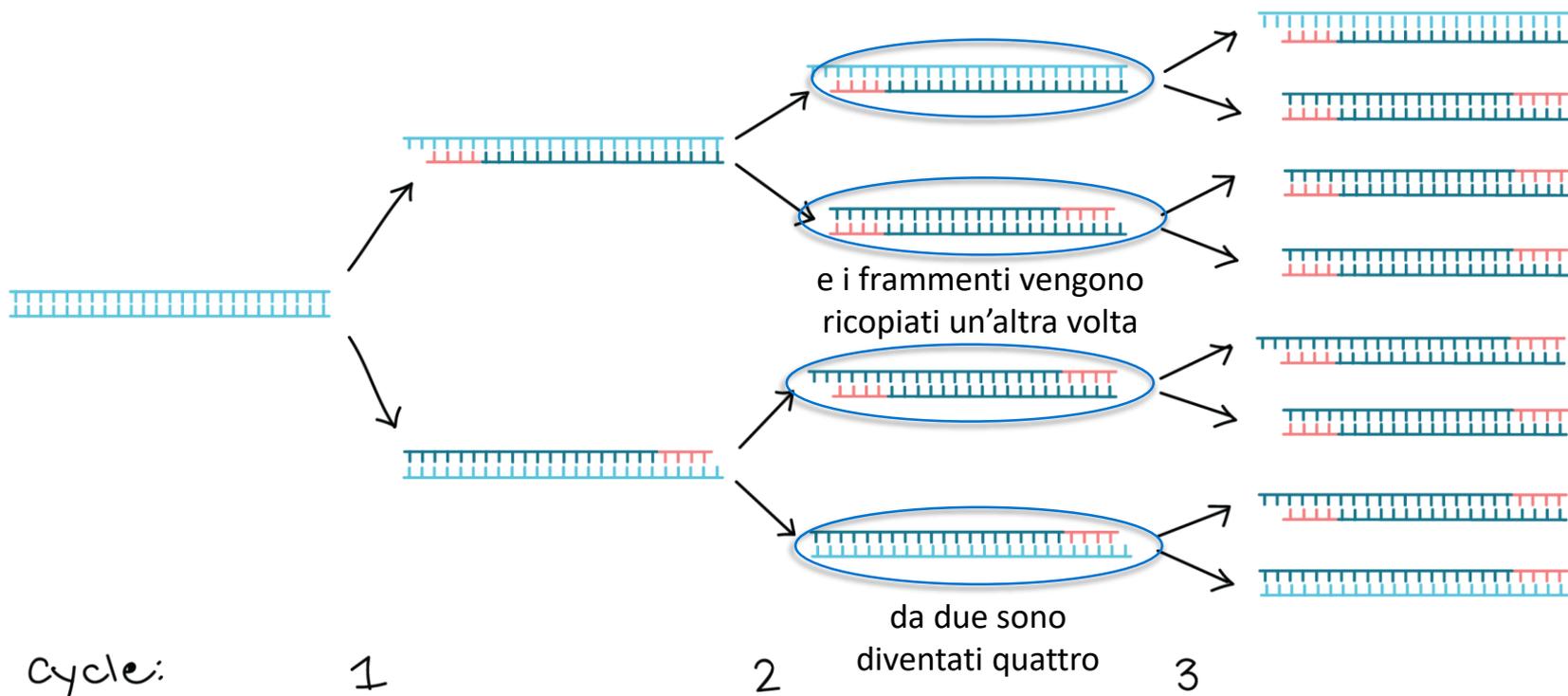
I metodi

La reazione a catena della polimerasi



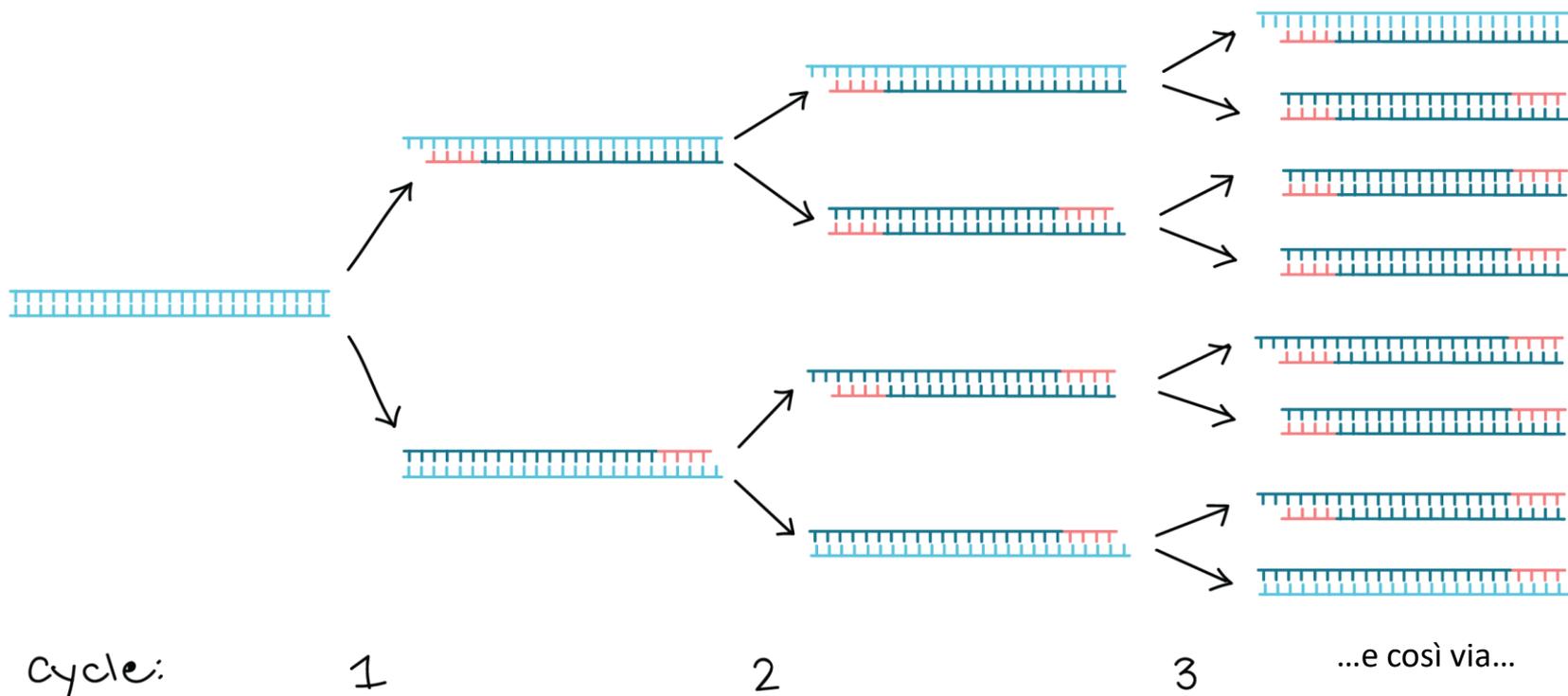
I metodi

La reazione a catena della polimerasi



I metodi

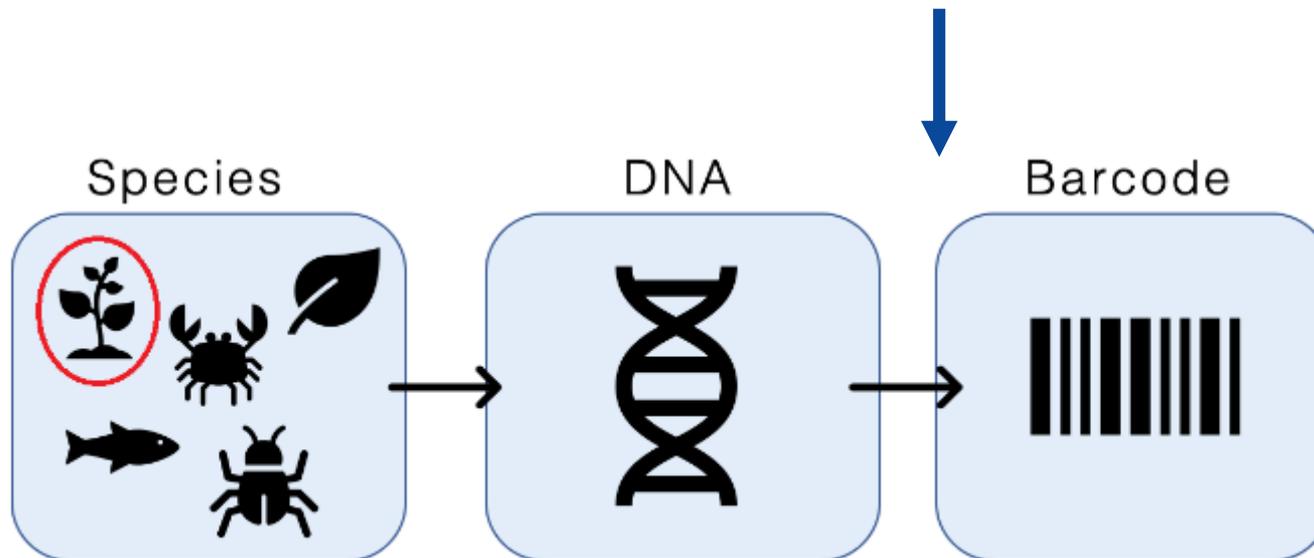
La reazione a catena della polimerasi



L'analisi del DNA ambientale

Cosa si può vedere?

Alla ricerca di una **singola** specie d'interesse

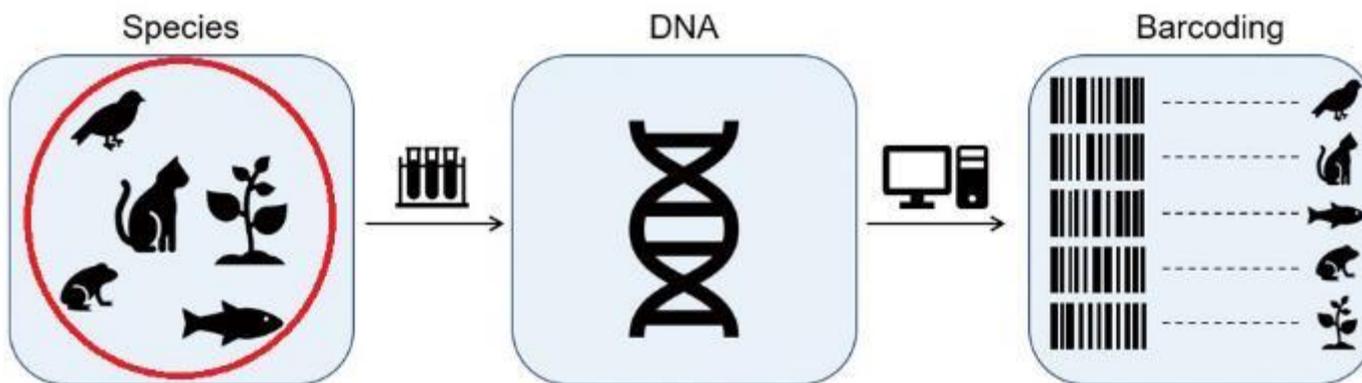


Esempio: cerco una piantina, quindi cerco di isolare (amplificandolo) un pezzetto di DNA utilizzando «primer» specifici solo per lei.

L'analisi del DNA ambientale

Cosa si può vedere?

Alla ricerca di **tutto** quello che c'è

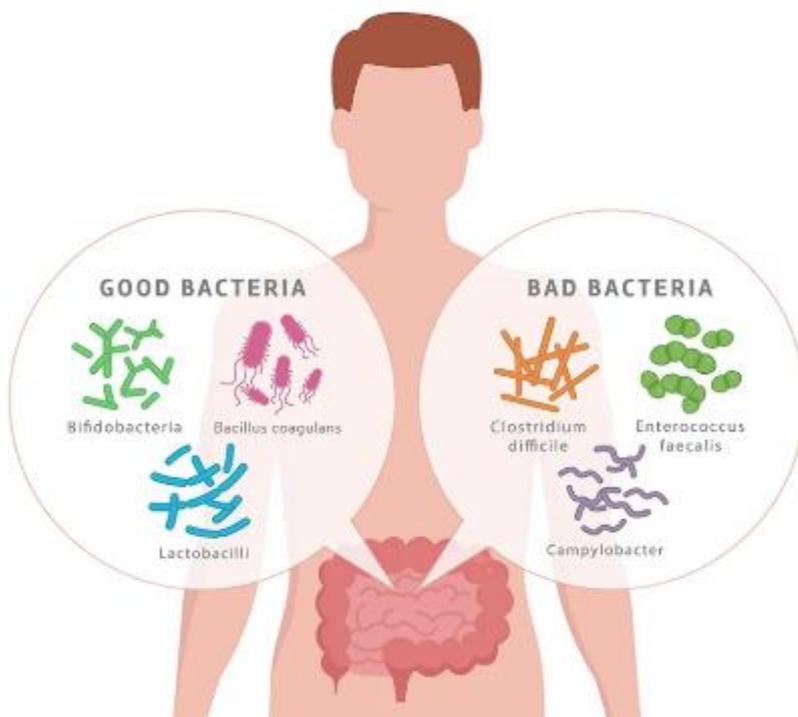


Esempio: voglio vedere tutte le specie viventi contenute in un campione di terra, tranne i batteri. Amplifico un barcode comune a tutti gli Eucarioti e analizzo tutte le sequenze ottenute, una per una.

L'analisi del DNA ambientale

Cosa si può vedere?

Alla ricerca di **tutto** quello che c'è e quanto ce n'è (più o meno)...



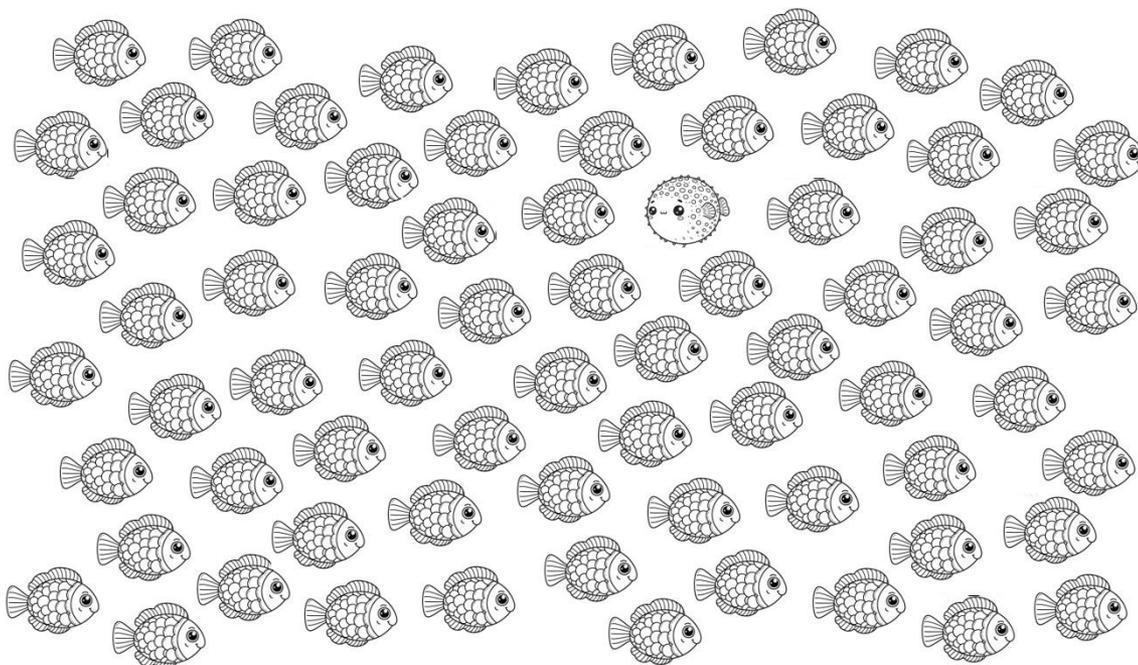
...in questo caso si parla di **metagenomica**.

Esempio: analisi del microbioma intestinale

L'analisi del DNA ambientale

Cosa si può vedere?

Alla ricerca di **tutto** quello che c'è e quanto ce n'è (più o meno)...
 ...ma soprattutto di quello che c'è in **piccolissime concentrazioni!**

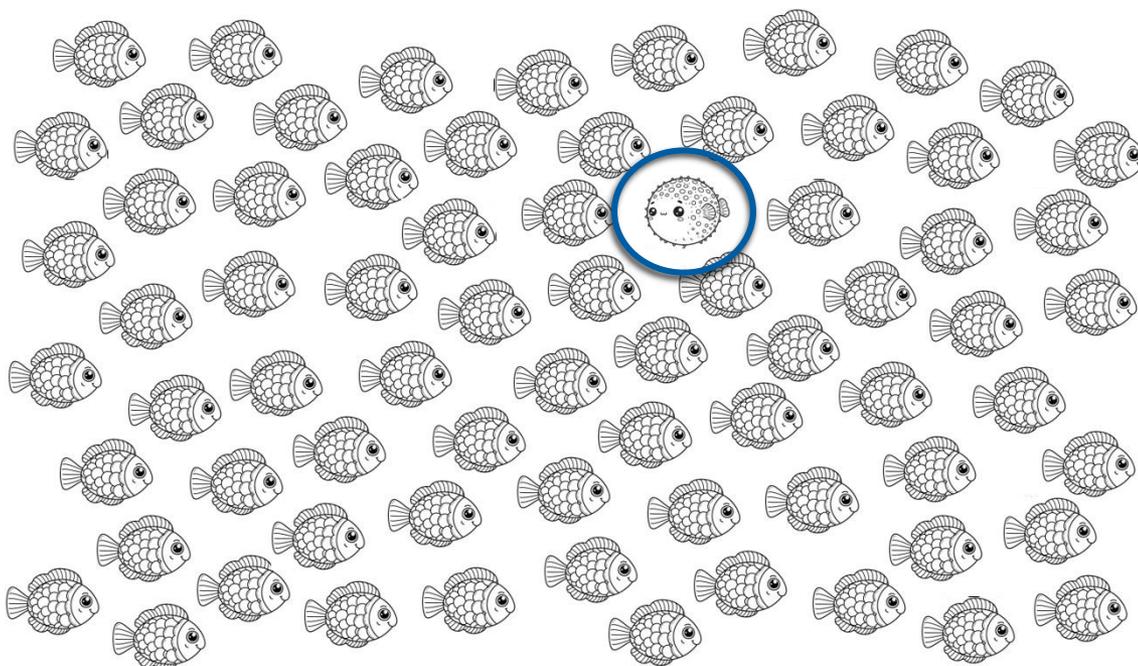


Esempio: ricerca delle tracce di specie alloctone in un campione ambientale

L'analisi del DNA ambientale

Cosa si può vedere?

Alla ricerca di **tutto** quello che c'è e quanto ce n'è (più o meno)...
 ...ma soprattutto di quello che c'è in **piccolissime concentrazioni!**

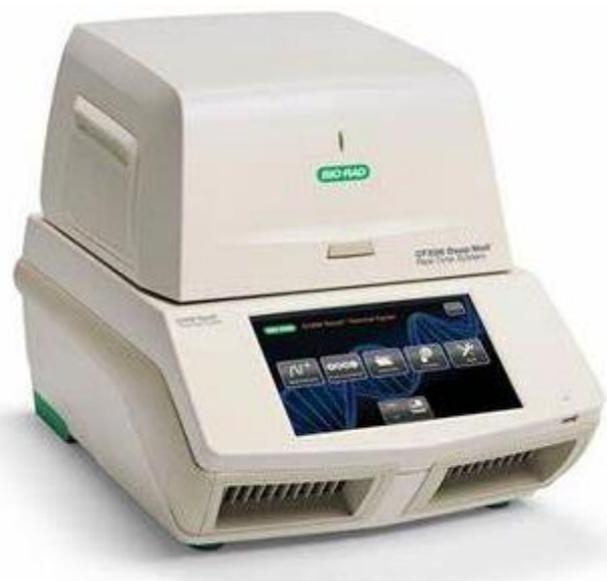


Esempio: ricerca delle tracce di specie alloctone in un campione ambientale

L'analisi del DNA ambientale

Gli strumenti

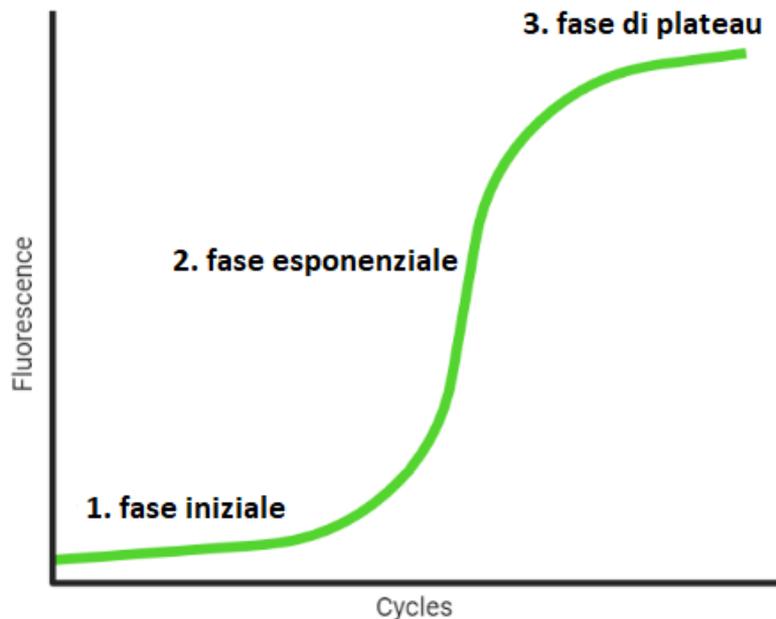
La **PCR quantitativa** o *real time PCR* è un metodo che simultaneamente amplifica e quantifica il DNA di partenza.



L'analisi del DNA ambientale

Gli strumenti

La **PCR quantitativa** o *real time PCR* è un metodo simultaneamente amplifica e quantifica il DNA di partenza. Prevede l'utilizzo di un reagente fluorescente.



1. nella **fase iniziale** i primer «cercano» la sequenza bersaglio.

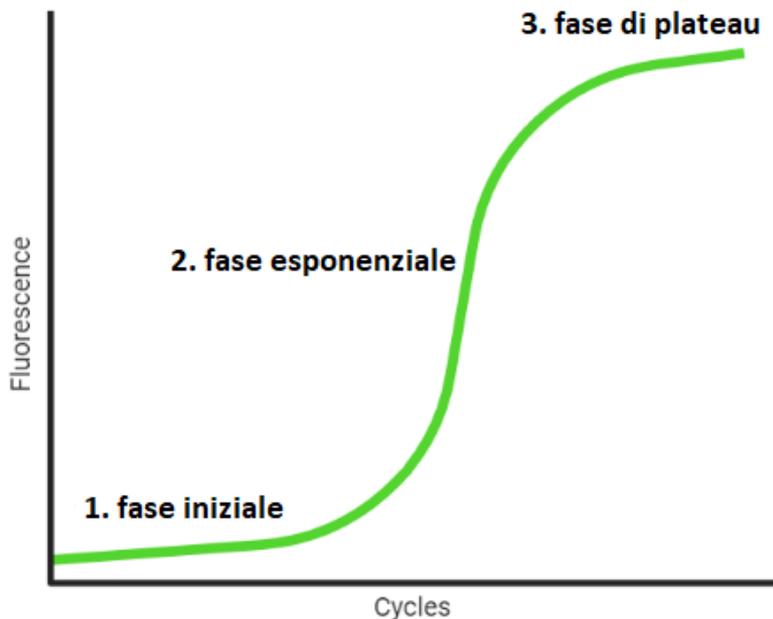
2. nella **fase esponenziale** comincia a formarsi amplificato e ad «inglobare» il reagente fluorescente (fluoroforo). La macchina inizia a rilevare il segnale.

3. nella **fase di plateau** si è formato tantissimo DNA bersaglio e i reagenti cominciano a diventare limitati.

L'analisi del DNA ambientale

Alla ricerca di una singola specie

La **PCR quantitativa** o *real time PCR* è un metodo simultaneamente amplifica e quantifica il DNA di partenza. Prevede l'utilizzo di un reagente fluorescente.



Questa tecnica è utile già di per sé a determinare la **presenza/assenza** di un DNA target.



Quindi per andare alla ricerca di una **singola specie!**

L'analisi del DNA ambientale

Alla ricerca di tutto quello che c'è

Per l'analisi di tutto il DNA contenuto in un campione, la **real time PCR** va associata alle tecnologie per il **sequenziamento massivo**.



Real time PCR

+



Second generation sequencing (ex NGS)

L'analisi del DNA ambientale

Alla ricerca di tutto quello che c'è

Per l'analisi di tutto il DNA contenuto in un campione, la **real time PCR** va associata alle tecnologie per il **sequenziamento massivo**.

A differenza dei metodi più vecchi (come il Sanger), le NGS permettono di **sequenziare milioni di frammenti di DNA contemporaneamente**, rendendo il processo molto più veloce ed economico.



Second generation sequencing (ex NGS)

L'analisi del DNA ambientale

Alla ricerca di tutto quello che c'è

Per l'analisi di tutto il DNA contenuto in un campione, la **real time PCR** va associata alle tecnologie per il **sequenziamento massivo**.

A differenza dei metodi più vecchi (come il Sanger), le NGS permettono di **sequenziare milioni di frammenti di DNA contemporaneamente**, rendendo il processo molto più veloce ed economico.



20-25 milioni di sequenze!



Second generation sequencing (ex NGS)

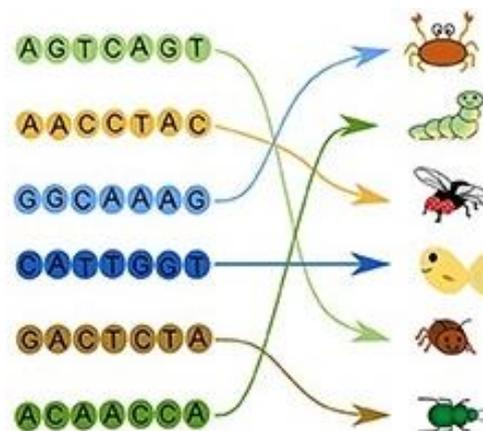
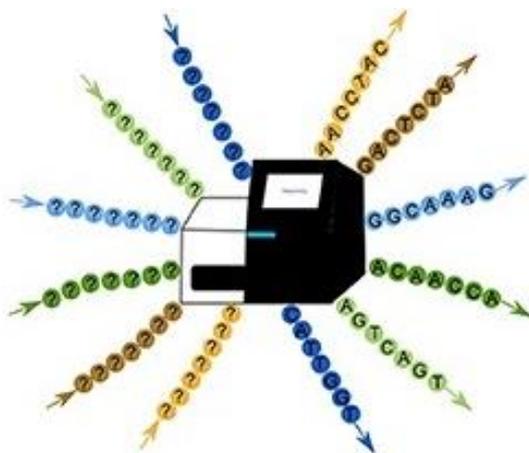
L'analisi del DNA ambientale

Alla ricerca di tutto quello che c'è

Per l'analisi di tutto il DNA contenuto in un campione, la **real time PCR** va associata alle tecnologie per il **sequenziamento massivo**.

...e all'analisi bioinformatica!

Dal sequenziatore «escono» milioni di sequenze.



Ad ogni sequenza bisogna associare il suo organismo.

L'analisi del DNA ambientale

Alla ricerca di tutto quello che c'è

Per l'analisi di tutto il DNA contenuto in un campione, la **real time PCR** va associata alle tecnologie per il **sequenziamento massivo**.

...e all'analisi bioinformatica!



Dal sequenziatore «escono» milioni di sequenze.

Ad ogni sequenza bisogna associare il suo organismo.

Non esistono interfaccia per le analisi ambientali.

L'analisi del DNA ambientale

I PRO

- strumento ottimale per lo **studio della biodiversità**
- elevata **risoluzione**: si arriva a determinare la specie
- enorme **set di dati** con un piccolo campione e una sola reazione
- rilevazione della presenza di specie tossiche o invasive **difficili da individuare** con l'osservazione diretta
- rilevazione di piccole tracce laddove l'organismo non sia più presente ma sia stato anche solo di **passaggio**
- **non invasività, non distruttività**

L'analisi del DNA ambientale

I CONTRO

- non tutte le **sequenze sono depositate**
- **costi** che si stanno via via riducendo, soprattutto per quanto riguarda le analisi singola-specie
- assenza di **protocolli standardizzati** per le analisi ambientali
- analisi **bioinformatica**: assenza di interfaccia, server con grande memoria, bioinformatici...

L'analisi del DNA ambientale

Esempi di come applicarla allo studio e alla conservazione dell'ambiente

Il progetto ALIENA

Cos'è una specie aliena?

Qualsiasi specie animale o vegetale che, a causa dell'azione dell'uomo - intenzionale o accidentale - si trova ad abitare e colonizzare un territorio diverso dal suo areale storico di distribuzione.



Il progetto ALIENA

Cos'è una specie aliena?

Qualsiasi specie animale o vegetale che, a causa dell'azione dell'uomo - intenzionale o accidentale - si trova ad abitare e colonizzare un territorio diverso dal suo areale storico di distribuzione.



Può **non essere adatta** al nuovo ambiente e quindi estinguersi in un breve periodo di tempo
(**specie aliena**)

Il progetto ALIENA

Cos'è una specie aliena?

Qualsiasi specie animale o vegetale che, a causa dell'azione dell'uomo - intenzionale o accidentale - si trova ad abitare e colonizzare un territorio diverso dal suo areale storico di distribuzione.



Può **adattarsi** al nuovo habitat stabilendosi con successo e riuscendo a raggiungere valori di densità anche molto elevati (**specie aliena invasiva**)

Il progetto ALIENA

Cos'è una specie aliena?

Qualsiasi specie animale o vegetale che, a causa dell'azione dell'uomo - intenzionale o accidentale - si trova ad abitare e colonizzare un territorio diverso dal suo areale storico di distribuzione.



DANNI!



Può **adattarsi** al nuovo habitat stabilendosi con successo e riuscendo a raggiungere valori di densità anche molto elevati (**specie aliena invasiva**)

Il progetto ALIENA

Cos'è una specie aliena?

Ma quali DANNI?

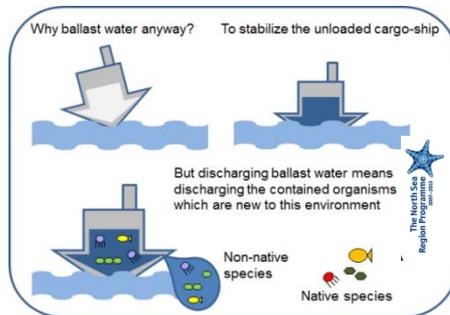
- predazione di specie autoctone
- riduzione della disponibilità di habitat per le specie autoctone
- concorrenza aggiuntiva
- arrivo di virus, batteri o parassiti da cui le specie autoctone non riescono a difendersi
- ibridazione genetica
- disturbo al turismo: chiazze di alghe, crescita eccessiva di meduse...
- interferenza con la pesca e la maricoltura: incrostazione o strappo delle reti...
- danni alle infrastrutture: incrostazioni di tubi, moli, boe, danni agli argini dei fiumi...
- costi di pulizia o controllo
- costi di trattamento o quarantena
- degrado di habitat e risorse culturalmente importanti come i corsi d'acqua

 **AMBIENTALI E ECONOMICI**

Il progetto ALIENA

Come arrivano le specie aliene?

- attraverso il **Canale di Suez** (specie lessepsiane)
- attraverso la **navigazione** all'interno delle acque di zavorra (**ballast water**) che le navi immagazzinano in speciali serbatoi per la stabilità, o attaccati alla superficie dello **scafo (hull fouling)** della nave
- introdotte **di proposito** per riprodurle in allevamento o agricoltura
- introdotte **accidentalmente** assieme a specie di interesse commerciale
- fuggite o deliberatamente rilasciate (come i pesci degli acquari)



Il progetto ALIENA

Qual è la situazione ad oggi?



In **Italia** sono state identificate circa **3800 specie aliene**, comprendenti piante, animali, funghi e altri organismi.

A livello **europeo**, il Regolamento 1143/2014 ha istituito la Lista delle specie aliene invasive di rilevanza unionale, che comprende 88 specie soggette a restrizioni e misure di gestione. Secondo il progetto finanziato dall'UE *Delivering Alien Invasive Species Inventories for Europe* (DAISIE), le specie aliene sarebbero oltre **10000**, di cui il 15% sono potenzialmente pericolose per la biodiversità europea.

Il **Mar Mediterraneo** è particolarmente vulnerabile alle invasioni biologiche. Attualmente, si stima la presenza di oltre **1000** specie aliene, rendendolo uno dei mari più invasi al mondo.

Nel **Mar Adriatico** sono oltre **200** (<https://www.italy-croatia.eu/web/aliena/library>).

Il progetto ALIENA



Cosa si può fare?

- attenta valutazione preventiva del rischio di invasività ogni qual volta venga introdotta una specie aliena per agricoltura o allevamento
- minimizzare il rischio di introduzioni involontarie (controllo delle acque di zavorra, dei prodotti di importazione...)
- applicare sanzioni gravi alle introduzioni volontarie
- rendere la comunità consapevole e partecipativa (segnalazioni)
- utilizzarle come risorsa alimentare
- **mettere in atto disposizioni per una diagnosi precoce e una rapida risposta in modo tale che una specie introdotta possa essere eradicata prima della sua diffusione (monitoraggi e piani di emergenza)**

➔ progetto ALIENA

Il progetto ALIENA

Interreg



Co-funded by
the European Union

Italy – Croatia



Il progetto **ALIENA** ha lo scopo di creare un sistema di monitoraggio congiunto per migliorare la tutela della biodiversità nei confronti delle specie non indigene (**NIS**).

Il progetto ALIENA

Interreg



Co-funded by
the European Union

Italy – Croatia



Le ricerche per mezzo del **eDNA** nelle acque marine permetteranno di approfondire le conoscenze e creare un sistema di monitoraggio per migliorare la **tutela della biodiversità** nei confronti delle **specie non indigene (NIS)**, che possono rappresentare una **minaccia per gli ecosistemi marini** locali, per la salute pubblica ed incidere sulle attività socioeconomiche.



MODELLI PREVISIONALI

Il progetto ALIENA

Interreg  Co-funded by
the European Union

Italy – Croatia

 ALIENA

...un nuovo laboratorio...



Il progetto ALIENA

Le specie target



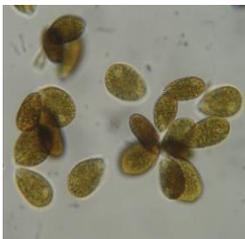
Mnemiopsis leidyi, ctenoforo.

Monitoraggio: censimento visivo.



Rugulopteryx okamurae, alga bruna.

Monitoraggio: sequenziamenti massivi del eDNA al fine di individuarne, eventualmente, una bassissima concentrazione.

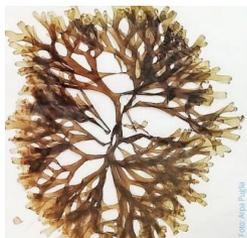


Ostreopsis ovata, microalga.

Monitoraggio: oltre ai classici metodi di conteggio al microscopio, ricerca specifica e quantitativa della presenza con i metodi di eDNA.

Il progetto ALIENA

I primi risultati del eDNA



Rugulopteryx okamurae

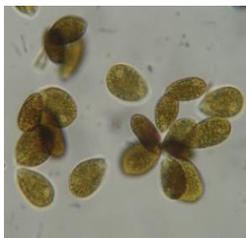


Per il momento non sembra essere presente nell'area di studio...

ID	Taxonomy	Colonna	Superficie
Tetraselmis marina; KT023599.1.1636	Eukaryota; Chlorodendrophyceae; Chlorodendrales; Tetraselmis; Tetraselmis marina	16622	8384
Spiniferites ramosus; LC222307.1.1739	Eukaryota; Dinoflagellata; Dinophyceae; Gonyaulacales; Gonyaulax; Spiniferites ramosus	2535	0
Protodinium simplex; U41086.1.1797	Eukaryota; Dinoflagellata; Dinophyceae; Gymnodiniophycidae; Suessiaceae; Protodinium; Protodinium simplex	1647	1376
Uncultured marine eukaryote; DQ314810.1.1782	Eukaryota; Cercozoa; Thecofilosea; ; ; Uncultured; Uncultured marine eukaryote	1483	116
Pleurosigma planktonicum; AY485514.1.1745	Eukaryota; Diatomea; Bacillariophyceae; ; Pleurosigma; Pleurosigma planktonicum	668	867
Protaspis obliqua; FJ824122.1.1826	Eukaryota; Cercozoa; Thecofilosea; ; ; Protaspis obliqua	600	50
Pelagodinium beii; U37365.1.1796	Eukaryota; Dinoflagellata; Dinophyceae; Gymnodiniophycidae; Suessiaceae; Pelagodinium; Pelagodinium beii	590	0
Uncultured eukaryote; KJ763267.1.1797	Eukaryota; Dinoflagellata; Dinophyceae; Gymnodiniophycidae; Suessiaceae; Pelagodinium; Uncultured eukaryote	464	0
Thysira sp. TH34; LC187036.1.1603	Eukaryota; Mollusca; Bivalvia; Mytiloidea; ; Thysira sp. TH34	328	0
Scrippsiella trochoidea; KR535601.1.1799	Eukaryota; Dinoflagellata; Dinophyceae; ; Thoracosphaeraeaceae; Scrippsiella; Scrippsiella trochoidea	326	0
Gonyaulax cochlea; AF274258.1.1737	Eukaryota; Dinoflagellata; Dinophyceae; Gonyaulacales; Gonyaulax; Gonyaulax cochlea	309	0
Posoniella tricarinelloides; KC511789.1.1790	Eukaryota; Dinoflagellata; Dinophyceae; Gonyaulacales; Posoniella; Posoniella tricarinelloides	237	9
Chlamydomonas sp. MBIC10592; AB058371.1.1748	Eukaryota; Chlorophyceae; Chlamydomonadales; ; Chlamydomonas; Chlamydomonas sp. MBIC10592	231	566
Uncultured Syndiniales; EU793918.1.1662	Eukaryota; Protalveolata; Syndiniales; ; Syndiniales Group 1; Uncultured Syndiniales	230	0
Uncultured eukaryote; EF100254.1.1366	Eukaryota; Labyrinthulomycetes; ; Labyrinthulaceae; Labyrinthula; Uncultured eukaryote	229	0
Heterocapsa rotundata; KY980397.1.1709	Eukaryota; Dinoflagellata; Dinophyceae; Gymnodiniophycidae; Ptychodiscus; Heterocapsa rotundata	206	0
Uncultured alveolate; FN690116.1.1707	Eukaryota; Dinoflagellata; Dinophyceae; Gymnodiniophycidae; Suessiaceae; Biecheleria; Uncultured alveolate	186	0
Barrufeta resplendens; KY688183.1.1743	Eukaryota; Dinoflagellata; Dinophyceae; Gymnodiniophycidae; Gymnodinium clade; Gymnodinium; Barrufeta resplendens	150	0
Alexandrium andersonii; JF521620.1.1736	Eukaryota; Dinoflagellata; Dinophyceae; Gonyaulacales; Alexandrium; Alexandrium andersonii	138	0
Pyramimonas sp. TU6; AB854037.1.1719	Eukaryota; ; Prasinophytae; Pyramimonadales; ; Pyramimonas; Pyramimonas sp. TU6	129	0
Uncultured eukaryote; KU743796.1.1791	Eukaryota; ; Eustigmatophyceae; Eustigmatales; ; Uncultured; Uncultured eukaryote	127	0
Dinophyta sp. NY013; LC054949.1.1767	Eukaryota; Dinoflagellata; Dinophyceae; Gymnodiniophycidae; Incertae Sedis; Akashiwo; Dinophyta sp. NY013	105	0
Uncultured eukaryote; AB252753.1.1720	Eukaryota; Cercozoa; Imbricates; Marimonadida; ; Uncultured eukaryote	102	28
Uncultured marine dinoflagellate; FJ914412.1.1524	Eukaryota; Dinoflagellata; Dinophyceae; Gymnodiniophycidae; ; Gyrodinium; Uncultured marine dinoflagellate	98	0
Dinophyceae sp. GD1590bp27; EU418970.1.1590	Eukaryota; Dinoflagellata; Dinophyceae; ; Thoracosphaeraeaceae; Scrippsiella; Dinophyceae sp. GD1590bp27	96	0
Ansaella natalensis; LC054923.1.1797	Eukaryota; Dinoflagellata; Dinophyceae; Gymnodiniophycidae; Suessiaceae; Ansaella; Ansaella natalensis	95	0
Fragilidium sp. CCMP1920; EF492489.1.1787	Eukaryota; Dinoflagellata; Dinophyceae; Gonyaulacales; ; Fragilidium; Fragilidium sp. CCMP1920	63	0
Uncultured marine eukaryote; FJ176220.1.1739	Eukaryota; ; Filasterea; Ministeriida; Capsasporidae; Marine Group; Uncultured marine eukaryote	63	0
Uncultured eukaryote; KJ760259.1.1792	Eukaryota; Protalveolata; Syndiniales; ; Syndiniales Group 1; Uncultured eukaryote	61	0
Uncultured marine dinoflagellate; FJ914483.1.1530	Eukaryota; Dinoflagellata; Dinophyceae; Gonyaulacales; ; Azadinium; Uncultured marine dinoflagellate	50	0
Uncultured Rhizaria; KC488567.1.1709	Eukaryota; Cercozoa; Thecofilosea; Cryomonadida; Protospidae; Cryothecomonas; Uncultured Rhizaria	47	0
Prasinophyte sp. Xmm3855; KU561213.1.1710	Eukaryota; ; Chlorodendrophyceae; Chlorodendrales; ; Tetraselmis; Prasinophyte sp. Xmm3855	46	0
Cylindrotheca closterium; GAPPN01002113.1.1308	Eukaryota; Diatomea; Bacillariophyceae; ; Cylindrotheca; Cylindrotheca closterium	45	562
Uncultured eukaryote; KT201567.1.1699	Eukaryota; Labyrinthulomycetes; ; Labyrinthulaceae; Labyrinthula; Uncultured eukaryote	43	0
Uncultured Chlorophyta; AB971070.1.1246	Eukaryota; ; Chlorodendrophyceae; ; ; Uncultured Chlorophyta	40	9
Polykrikos geminatum; JX967270.1.1555	Eukaryota; Dinoflagellata; Dinophyceae; Gymnodiniophycidae; Gymnodinium clade; Polykrikos; Polykrikos geminatum	40	0
Uebelmesseromyces harderi; KY980184.1.1693	Eukaryota; Chytridiomycota; Chytridiomycetes; Uncultured; ; Uebelmesseromyces harderi	39	0
Chaetoceros socialis; AY485446.1.1784	Eukaryota; Diatomea; Mediophyceae; ; Chaetoceros; Chaetoceros socialis	38	0
Uncultured eukaryote; KJ763104.1.1793	Eukaryota; Protalveolata; Syndiniales; ; Syndiniales Group 1; Uncultured eukaryote	37	0
Uncultured marine alveolate; JF826314.1.1615	Eukaryota; Protalveolata; Syndiniales; ; Syndiniales Group 1; Uncultured marine alveolate	37	0
Gonyaulax fragilis; MF494205.1.1210	Eukaryota; Dinoflagellata; Dinophyceae; Gonyaulacales; ; Gonyaulax; Gonyaulax fragilis	36	0
Pelagophyceae sp. KY979976.1.1705	Eukaryota; ; Pelagophyceae; Sarcinochrysidales; ; Pelagophyceae sp	35	0

Il progetto ALIENA

I primi risultati del eDNA



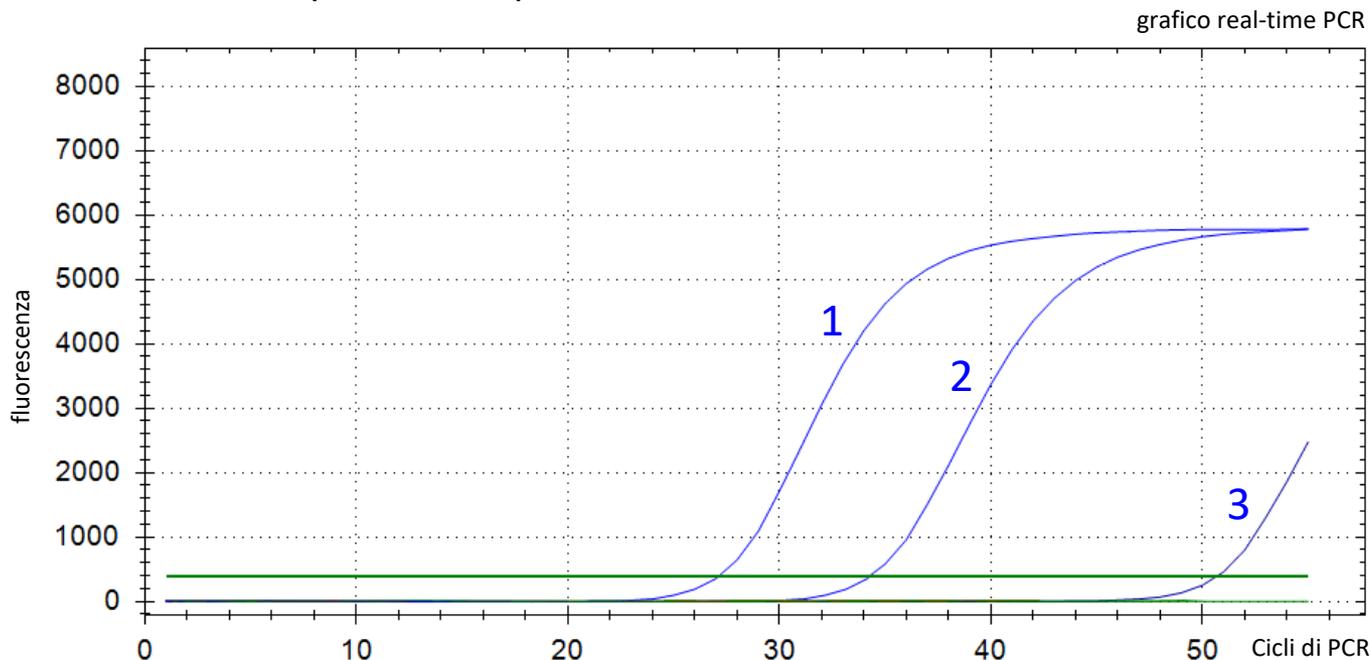
Ostreopsis ovata



Campioni:

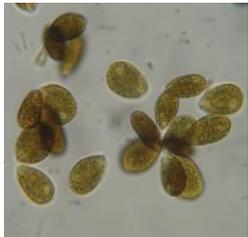
1. 4000 cell/L
2. 400 cell/L
3. 40 cell/L

Abbiamo costruito delle **sonde molecolari** in grado di «cercare» il **DNA specifico** di *O. ovata* tra tutto l'eDNA estratto da acqua di mare anche quando è in piccolissime concentrazioni.



Il progetto ALIENA

I primi risultati del eDNA



Ostreopsis ovata



Campioni:

1. 4000 cell/L
2. 400 cell/L
3. 40 cell/L

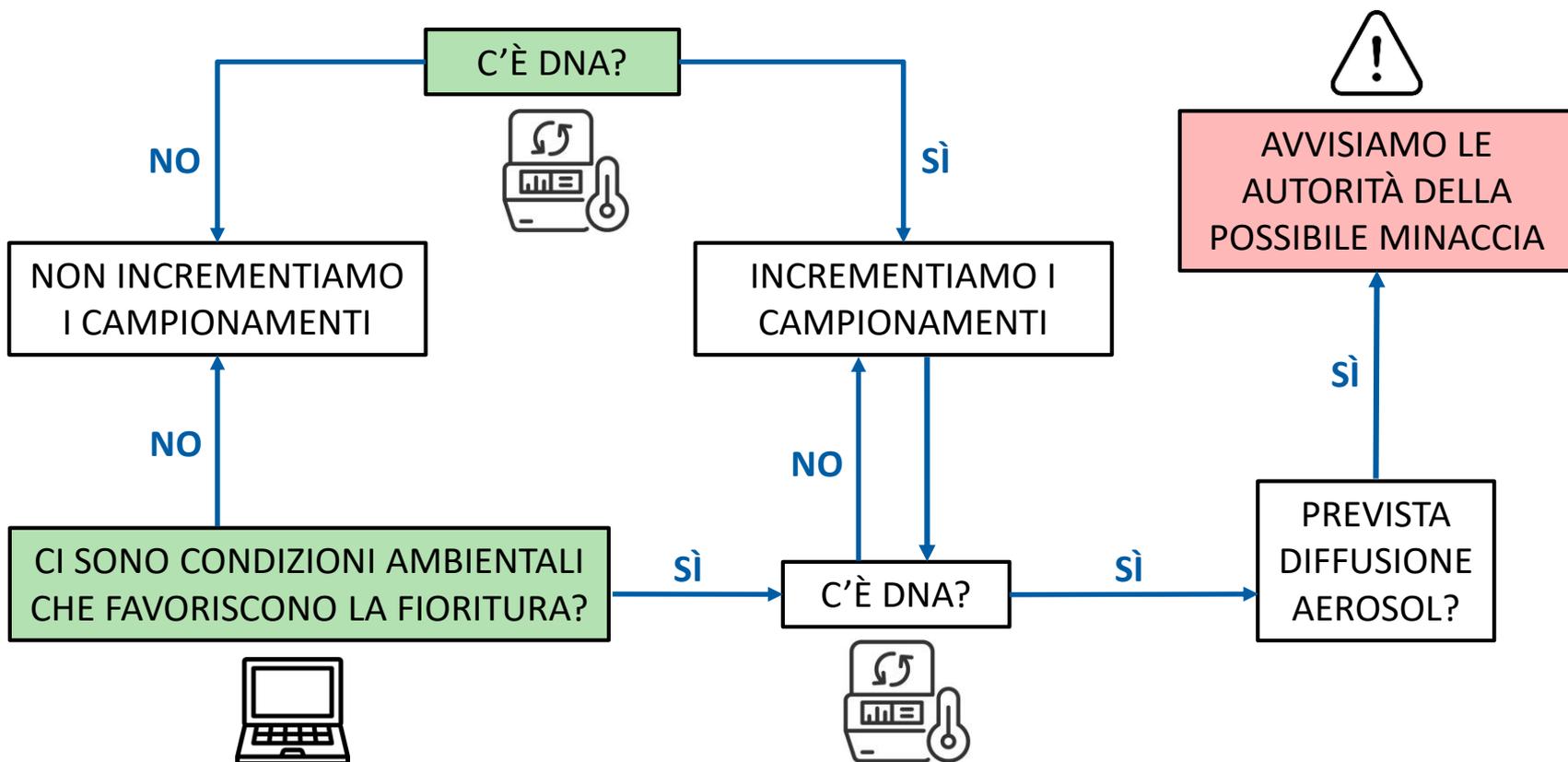


1 vetrino = 2,5 mL
1 litro = 400 vetrini

10 vetrini prima di vedere **una** cellula di *O. ovata*

Abbiamo costruito delle **sonde molecolari** in grado di «cercare» il **DNA specifico** di *O. ovata* tra tutto l'eDNA estratto da acqua di mare anche quando è in piccolissime concentrazioni.

Il progetto ALIENA



Fish diversity

Estuarine, Coastal and Shelf Science 304 (2024) 108824



Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

Estuarine, Coastal and Shelf Science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ecss



Environmental DNA enhances comprehension of the spatial and temporal dynamics of fish diversity in a coastal lagoon

Elisa Banchi ^{a,b,*}, Nicola Bettoso ^c, Diego Borme ^a, Sergio Stefanni ^d, Valentina Tirelli ^{a,b}

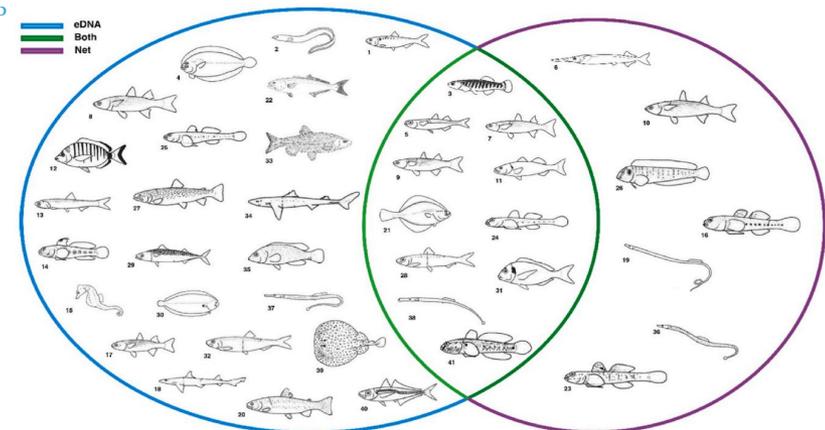
^a National Institute of Oceanography and Applied Geophysics—OGS, Via A. Piccard 54, 34151, Trieste, Italy

^b NBFC—National Biodiversity Future Center, Piazza Marina 61, 90133, Palermo, Italy

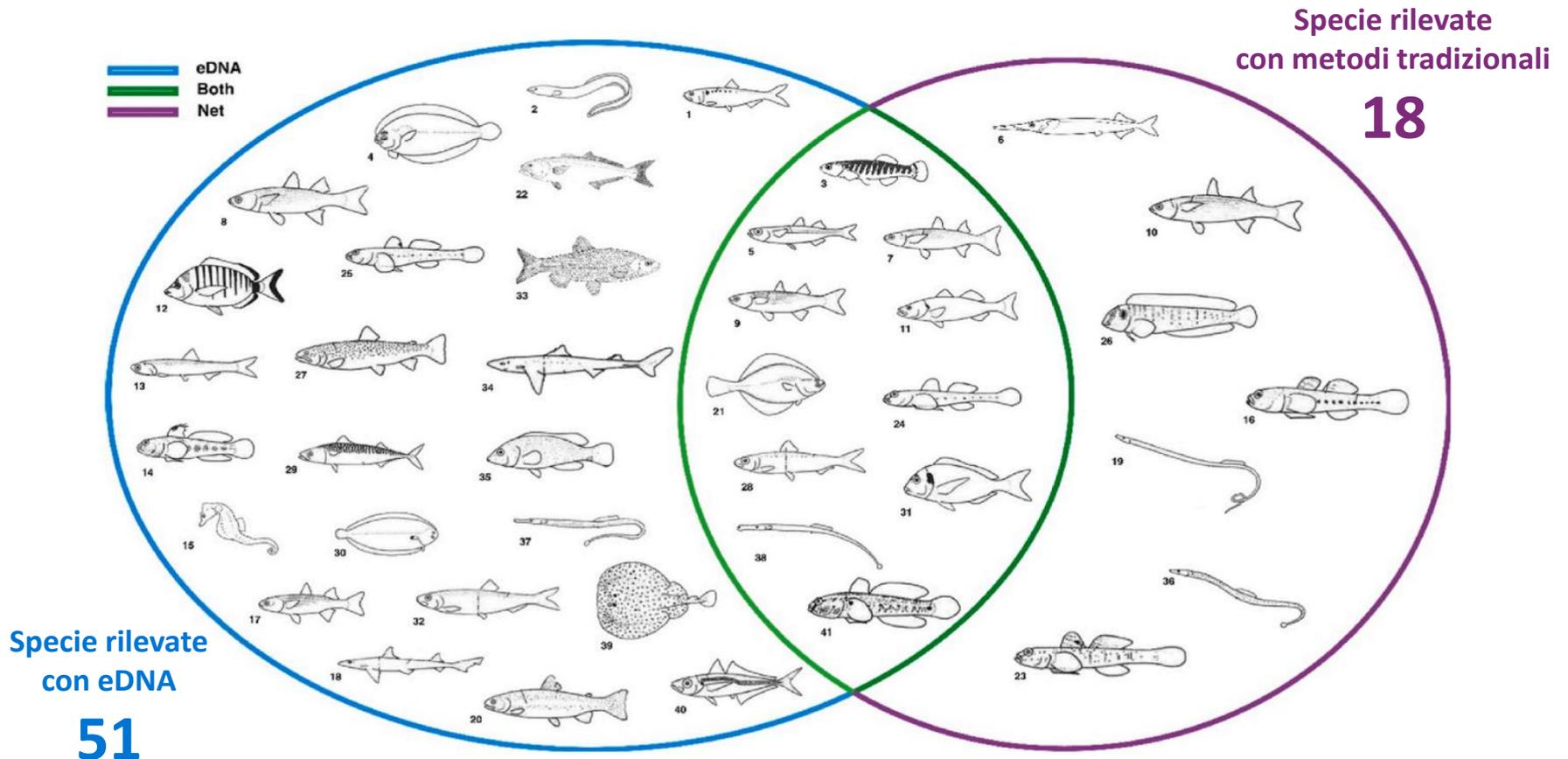
^c Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente (Arpa FVG), Via Cairoli 14, 33057, Palmanova, Italy

^d Stazione Zoologica Anton Dohrn, Via F. Caracciolo, 80122, Napoli, Italy

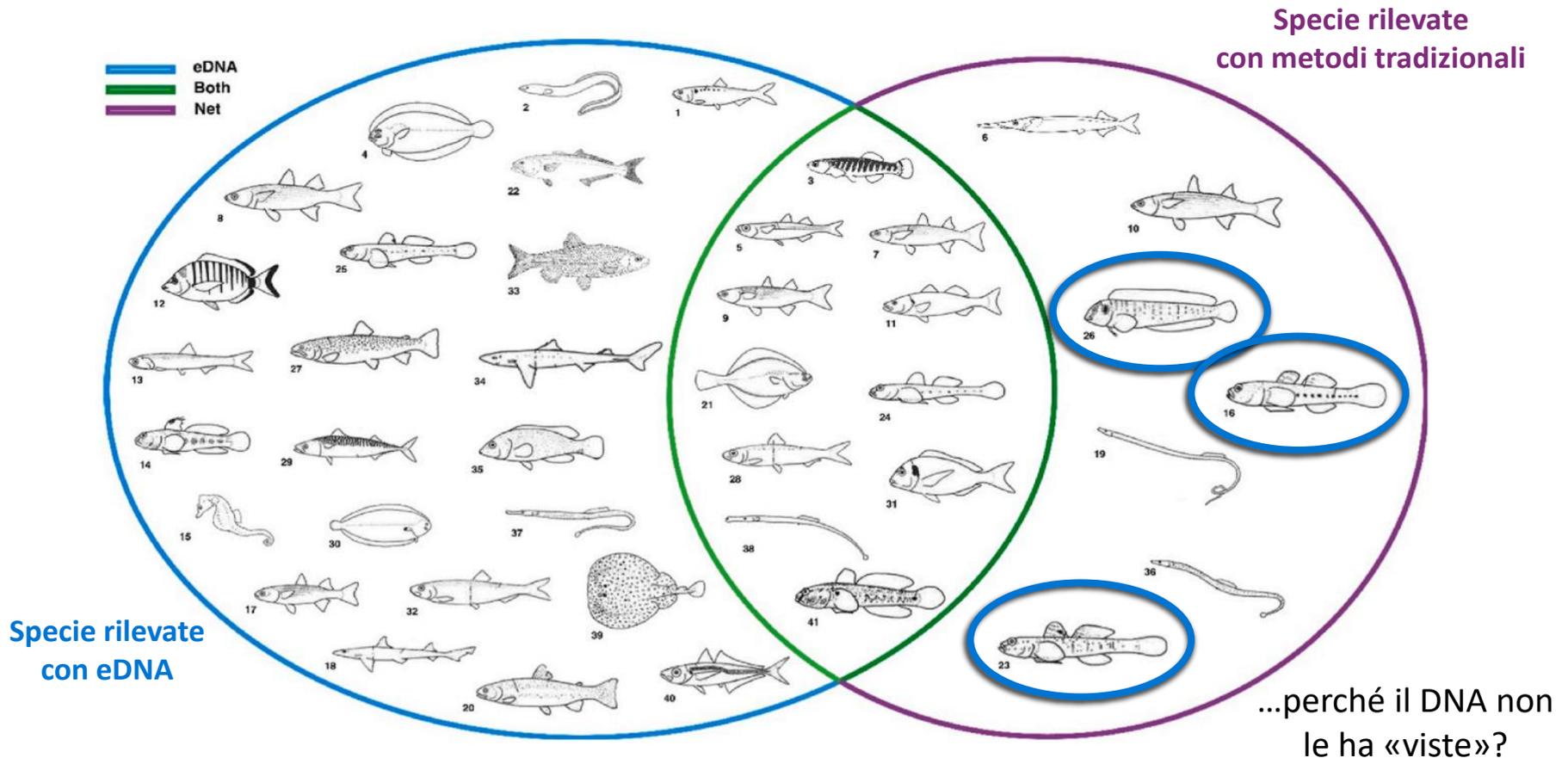
Confronto tra le metodiche tradizionali e le tecniche di eDNA per lo studio della biodiversità ittica.



Fish diversity

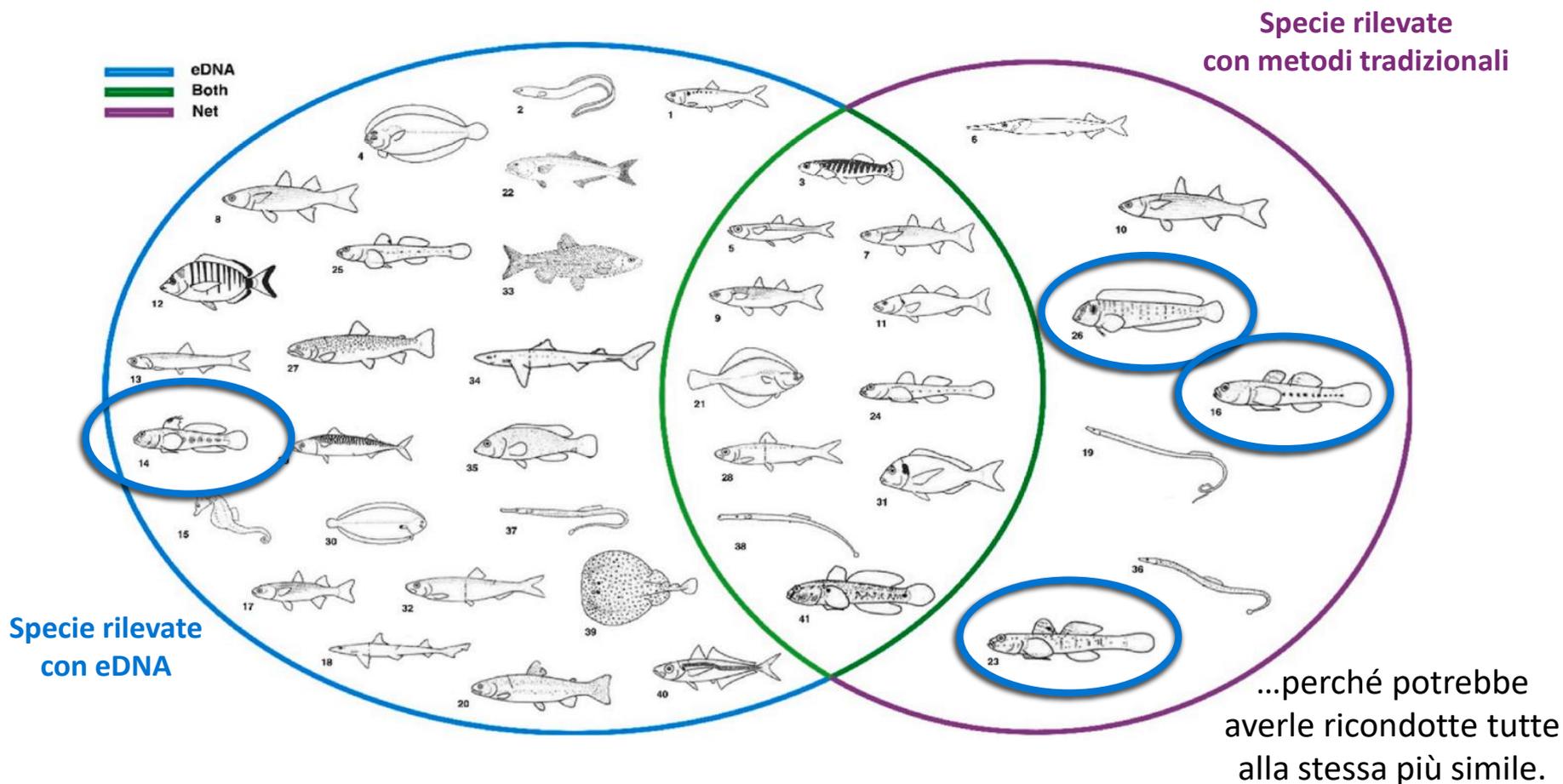


Fish diversity



...perché il DNA non le ha «viste»?

Fish diversity



...perché potrebbe averle ricondotte tutte alla stessa più simile.

La protezione del proteo

www.nature.com/scientificreports

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Environmental DNA in subterranean biology: range extension and taxonomic implications for *Proteus*

Received: 17 October 2016

Accepted: 20 February 2017

Published: 27 March 2017

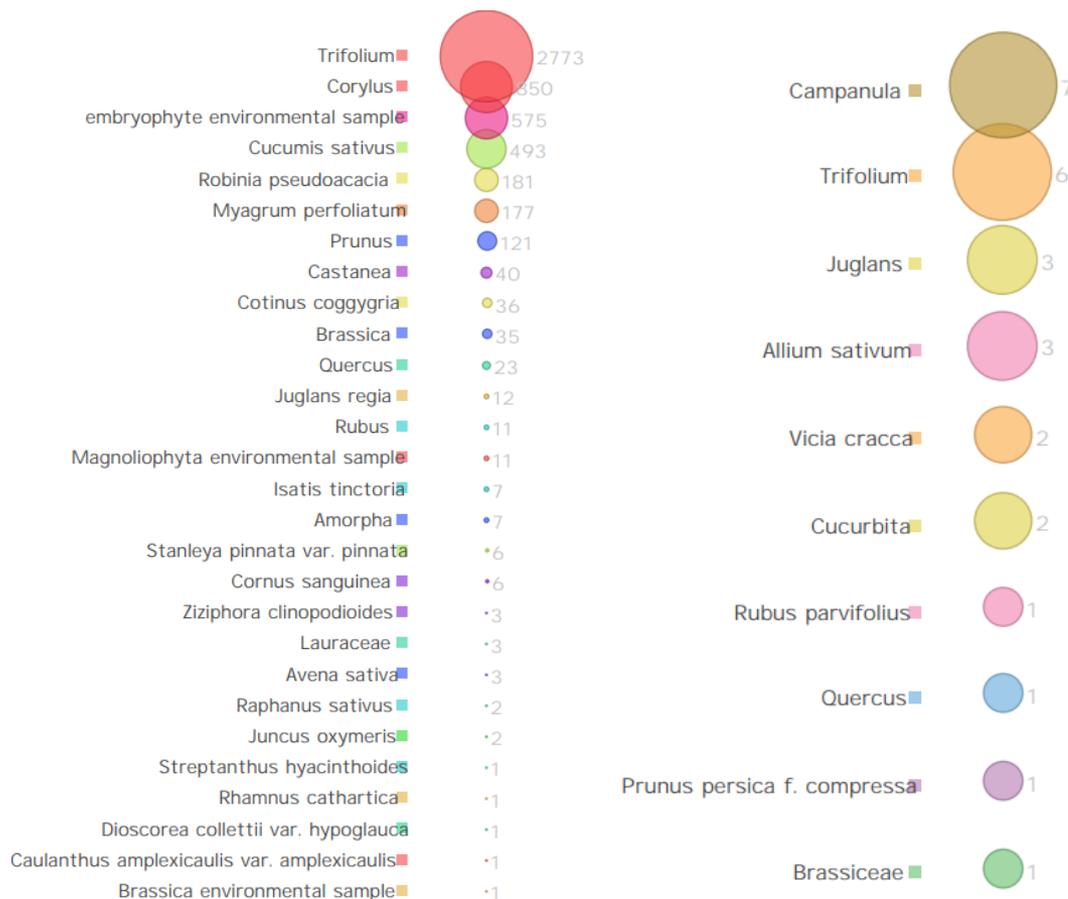
Špela Gorički^{1,*}, David Stankovič^{1,2,3,*}, Aleš Snoj², Matjaž Kuntner⁴, William R. Jeffery⁵, Peter Trontelj⁶, Miloš Pavičević⁷, Zlatko Grizelj⁸, Magdalena Năpăruș-Aljančič^{1,9} & Gregor Aljančič¹



I pollini nel miele

Con le tecniche di **eDNA** è possibile determinare la composizione floristica del miele.

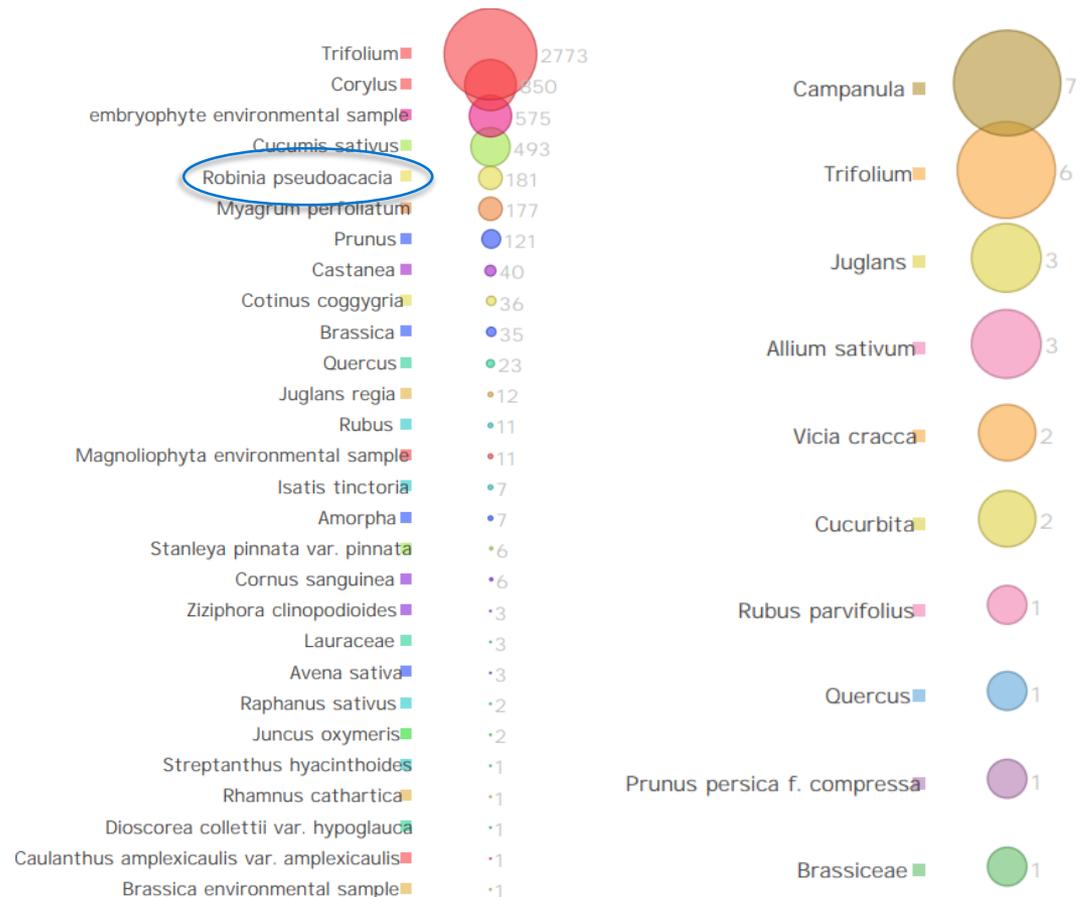
A lato, i pollini contenuti in due diversi barattoli di «miele d'acacia».



I pollini nel miele

Con le tecniche di **eDNA** è possibile determinare la composizione floristica del miele.

A lato, i pollini contenuti in due diversi barattoli di «miele d'acacia».



A supporto dei tassonomi...

Utilizzando le tecniche di DNA-barcoding è possibile, inoltre, supportare il lavoro dei **tassonomi**.



Flabellina affinis



Edmundsella pedata

o
?

A supporto dei tassonomi...

Utilizzando le tecniche di DNA-barcoding è possibile, inoltre, supportare il lavoro dei **tassonomi**.

Flabellina affinis

o

Edmunsella pedata

?

<i>Flabellina affinis</i>	GCGGGAACCGGTTTAAGGCTACTAATTCGATTTGAATTAGGAACAGCTGGAGCCCTTCTTGGCGATGACCATTATATAATGTTATTGTAACGCTCATGCTTTTGTGATAATTTCTTTATAGTAATGCCTCTTATAATTG
<i>Edmunsella pedata</i>	GCAGGAACGGCTTAAGCCTCTAATTCGATTTGAATTAGGAACAGCTGGAGCTCTTCTAGGTGATGATCACTTATATAATGTTATTGTTACAGCACATGCTTTTGAATAATTTTTTTATAGTTATACCTTTAATAATTG
<i>Flabellina affinis</i>	ATTGAATGGTGCCTCTTTTATTAGGGGCTCCTGATATAAGTTTTCTCGAATGAATAATATGAGATTTTGATTATTACCTCCTCTCTTTATTCTTTTAAATGCTTCAACTTTAAATGGAGGGAGGAGCAGGGACTGGATGGAC
<i>Edmunsella pedata</i>	ATTGAATAGTCCCTTATTATTAGGAGCTCCTGATATAAGTTTTCTCGTATAAATAATATGAGATTTGGTTACTTCTCCCTCTCTTTATTCTTCTTATGCTTCAACTTTAAATAGAAGGTGGAGCTGGGACTGGTTGAAC
<i>Flabellina affinis</i>	CTTTCGGGTTCTATTGGCCACGGGGTTGTTGTTAGTATAGTTAGCCATTTTTCTCTTCATTTAGCTGGGATGCTTTCATTATTGGGGCTATTAATTTTTATTACTACAATTTTTAACATACGTTCTCCTGAGATAACTATAG
<i>Edmunsella pedata</i>	CTTTCGGTGTCTATTGGACATGGGGTTGTTCTGTAGATTAGCTATTTTTCTCGTTCATTTAGCTGGTATATCTTCTTATTAGGGGCTATTAATTTTTATTACAACATTTTTAATATACGATCTCCAGAAATGGCTATAG
<i>Flabellina affinis</i>	TATTTGTTTGGTCAGTTTAGTAACGCTTTTTTGGTTGTTATTATCATTACCTGTATTAGCTGGGGCTATTACAATGTTGTTGACTGATCGAAATTTAATACTAGTTTTTTGATCCGGCAGGAGGTGGAGACCCAGTTTTT
<i>Edmunsella pedata</i>	TATTTGTTTGTAGTGTAGTAACAGCTGTTCTTTTACTTTTATCTCTCCAGTTTTAGCTGGGGCTATTACTATGTTACTAACAGATCGTAATTTAATACTAGATTTTTGATCCTGCTGGTGGAGGAGATCCTATTTTT

A supporto dei tassonomi...

Utilizzando le tecniche di DNA-barcoding è possibile, inoltre, supportare il lavoro dei **tassonomi**.

Flabellina affinis

o

Edmunsella pedata

?

<i>Flabellina affinis</i>	GCGGGAACCGGTTTAAGGCTACTAATTCGATTTGAATTAGGAACAGCTGGAGCCCTTCTTGGCGATGACCATTATATAATGTTATTGTAACGCTCATGCTTTTGTGATAATTTCTTTATAGTAATGCCTCTTATAATTG
<i>Edmunsella pedata</i>	GACAGAACTGGCTTAAGCCTCTTAATTCGATTTGAATTAGGAACAGCTGGAGCTCTCTAGGTGATGATCACTTATATAATGTTATTGTTACAGCACATGCTTTGTAATAATTTTTTTATAGTTATACCTTTAATAATTG
<i>Flabellina affinis</i>	ATTGAATGGTGCCTCTTTTATTAGGGCTCCTGATATAAGTTTTCTCGAATGAATAATATGAGATTTTGATTATTACCTCCTCTTTTATTCTTTTAAATGCTTCAACTTTAAATGGAGGAGGAGCAGGGACTGGATGGAC
<i>Edmunsella pedata</i>	ATTGAATAGTCCCTTATTATTAGGAGCTCCTGATATAAGTTTTCTCGTATAAATAATATGAGATTTGGTTACTTCTCCTCCTCTTTTATTCTTCTTATGCTTCAACTTTAAATAGAAGGTGGAGCTGGACTGGTTGAAC
<i>Flabellina affinis</i>	CTTTCGGGTTCTATTGGCCACGGGGTTGTTGAGTAGATTTAGCCATTTTTCTCTTCATTTAGCTGGGATGCTTCATTATTGGGGCTATTAATTTTTTACTACAATTTTTAACATACGTTCTCCTGAGATAACTATAG
<i>Edmunsella pedata</i>	CTTTCGGTGCATTGGACATGGGGTTGTTGAGTAGATTTAGCTATTTTTCTCGTTCATTTAGCTGGTATATCTTCTTATTAGGGCTATTAATTTTTTACTACAATTTTTTAAATACGATCTCCAGAAATGGCTATAG
<i>Flabellina affinis</i>	TATTTGTTTGGTCAGTTT TAGTAACGCTTTTTGTTGTTTATTATCATTACCTGATTAGCTGGGGCTATTACAATGTTGTTGACTGATCGAAATTTAATACTAGTTTTTTTGTATCCGGCAGGAGGTGGAGACCCAGTTTTT
<i>Edmunsella pedata</i>	TATTTGTTTGGTCAGTTT TAGTAACGCTGTTCTTTTACTTTTATCTCTCCAGTTTTAGCTGGGGCTATTACTATGTTACTAACAGATCGTAATTTAATACTAGATTTTTTGTATCCTGCTGGTGGAGGAGATCCTATTTT

A supporto dei tassonomi...

La questione dei *Pinnotheres spp.*



Pinnotheres bicristatus

Originariamente presenti in Adriatico *P. pisum* e *P. pinnotheres*, simbionti di *Pinna nobilis*. A seguito della moria di *P. nobilis* si registra la possibile presenza di un'altra specie, simbiote delle ostriche.

Recuperato qualche esemplare, difficile da distinguere alla vista dalle altre due specie, sono state effettuate le analisi genetiche presso il nuovo laboratorio di eDNA di ARPA FVG ...

...confermato primo avvistamento di *P. bicristatus* in Adriatico!

Articolo *under submission*

Conclusioni

Il **DNA ambientale**, le cui tecniche correlate sono in grado di rispondere in modo rapido e affidabile, ci offre una lente invisibile ma potentissima per osservare, proteggere e salvaguardare la biodiversità, e il suo impiego sarà sempre più fondamentale per affrontare le sfide ambientali di domani.



GRAZIE PER L'ATTENZIONE