

Il DNA ambientale: un nuovo strumento molecolare per il monitoraggio della biodiversità presente e passata

MAURO MANDRIOLI

Dipartimento di Scienze della Vita, Università di Modena e Reggio Emilia - Via Campi 213/D - 41125 Modena - E-mail: mauro.mandrioli@unimore.it

RIASSUNTO

Studiare la biodiversità di una località è un'operazione molto dispendiosa sia in termini di tempo che da un punto di vista economico. Può inoltre non essere semplice campionare tutte le specie presenti e da monitorare. Da alcuni anni è stato osservato che il DNA permane nell'ambiente sotto forma di frammenti brevi, ma di dimensioni comunque utili per studiare, attraverso metodiche molecolari, la biodiversità di un dato luogo, oltre che monitorare specie di interesse e evidenziarne in modo celere l'arrivo di nuove.

Parole chiave: DNA ambientale, campionamento, biodiversità, monitoraggio.

ABSTRACT

Environmental DNA: a new molecular tool for monitoring present and past biodiversity.

The study of biodiversity can be extremely costing considering both time and financial support of traveling and sampling. Furthermore, it is possible to lack some species, whose monitoring can be relevant since they are specific biomarkers. Since some years, several laboratories assessed that it is possible to collect sample of environmental DNA that can be used for the identification of the species that live (or lived) in a specific location.

Key words: environmental DNA, sampling, biodiversity, monitoring.

INTRODUZIONE

Nel corso dell'ultimo decennio un crescente numero di pubblicazioni ha monitorato e analizzato lo stato di salute della biodiversità sul nostro pianeta e i risultati che ne sono derivati sono decisamente poco rosei, tanto che alcuni ricercatori parlano di un "catastrofico declino" della biodiversità (CARDINALE *et al.*, 2012; VENTER *et al.*, 2016; SEDDON *et al.*, 2016; BETTS *et al.*, 2017).

VENTER e colleghi (2016), avvalendosi di set di dati relativi alle estensioni delle aree edificate o coperte da infrastrutture (ferrovie, strade,...), alla tipologia ed entità delle attività agricole e della pastorizia, alla presenza di illuminazione notturna e alla crescita della popolazione umana, hanno mostrato che nel periodo 1993-2009 l'impronta della nostra specie sull'ambiente è progressivamente aumentata. In particolare, una crescente pressione sull'ambiente è stata registrata in nazioni in cui il reddito pro capite è medio basso, mancano efficaci norme di tutela ambientale e sono presenti estese aree con alti livelli di biodiversità. Purtroppo quindi molte delle specie in via di estinzione si trovano in regioni in cui si registra un netto aumento della pressione antropica, suggerendo che per tali aree non si prospetti un futuro roseo.

In parallelo, altri gruppi di ricerca hanno invece analizzato su scala globale lo stato di conservazione delle aree "selvatiche" nel senso di sostanzialmente intatte e non danneggiate dalle atti-

vità umane più invasive, come l'agricoltura, l'allevamento e gli scavi minerari, evidenziando che nel corso degli ultimi 20 anni abbiamo perso oltre 3 milioni di chilometri quadrati di aree libere da attività umane (pari approssimativamente al 10%) con perdite particolarmente rilevanti in Sud America (30%) e nell'Africa centrale (14%) (WATSON *et al.*, 2016).

E' quindi opinione diffusa che servano piani di azioneceleri e condivisi a livello internazionale che partendo da questi monitoraggi definiscano piani di gestione e tutela della biodiversità (BERNAZZANI *et al.*, 2012; GILLSON *et al.*, 2013; SEDDON *et al.*, 2016; BELOTE *et al.*, 2017). Purtroppo però le campagne di raccolta di campioni sono spesso dispendiose sia da un punto di vista economico (spese di viaggio, raccolta e stoccaggio campioni, ...) che logistico, motivo per cui anche le strategie di campionamento sono in continua evoluzione (PAVOINE & BONSALL, 2011; PERMAN *et al.*, 2016; BOSCH *et al.*, 2017). Inoltre, un'incompleta raccolta di dati può compromettere la pianificazione di una corretta strategia di conservazione, per cui serve poter contare su strumenti affidabili e applicabili in ambienti differenti. Proprio per queste caratteristiche, oggi un crescente numero di gruppi di ricerca raccoglie campioni di DNA ambientale (anche definito *eDNA* dall'espressione inglese *environmental DNA*), prelevandoli dal suolo e dall'acqua, per determinare l'insieme di specie che popolano una certa area. Tutti gli organismi che vivono in un determinato *habitat*, infatti, lasciano delle tracce, attraverso le feci o i residui di

pelle, che permettono di ricostruire il complesso mosaico di specie che caratterizzano quell'ambiente. Il DNA ambientale si configura oggi come uno strumento consolidato per il monitoraggio della biodiversità presente e passata (FICETOLA *et al.*, 2008; BOHMANN *et al.*, 2014; GOLDBERG *et al.*, 2015).

Cos'è il DNA ambientale

Già da molti anni, numerosi gruppi di ricerca hanno cercato batteri in diverse tipologie di campioni (terriccio, acqua, ghiaccio, ...) ricostruendo la composizione delle comunità microbiche presenti ricorrendo al DNA estratto da tali campioni (OGRAM *et al.*, 1987). In questo caso il DNA derivava dai batteri vivi e presenti in tali campioni, ma questo approccio suggeriva che il DNA potesse essere estratto anche da matrici comunemente non utilizzate.

Alcuni Autori, partendo dal presupposto che tutti gli animali possono rilasciare DNA nell'ambiente in cui vivono (attraverso i liquidi biologici oltreché ovviamente con il loro corpo dopo la morte), si sono chiesti cosa accadesse al DNA (BIGGS *et al.*, 2015; THOMSEN & WILLERSLEV, 2015). La domanda nasceva da diverse evidenze, anche forensi, secondo cui il DNA andava indubbiamente incontro a fenomeni di degradazione, ma che potessero rimanere comunque presenti frammenti corti, ma sufficienti per dare informazioni (FISHER & TRIPLETT, 1999; VENTER *et al.*, 2004; FIERER & JACKSON, 2006). La permanenza di frammenti di DNA, abbinata alle moderne tecniche di amplificazione e sequenziamento del DNA (MANDRIOLI, 2016), poteva costituire una base da cui iniziare la ricerca di questi frammenti di DNA e con essi degli animali o piante che tali tracce avevano lasciato. Il DNA ambientale è quindi da intendersi come l'insieme delle molecole di DNA presenti in un campione prelevato da matrici non biologiche (ad esempio acqua, ghiaccio, terreno, ...), mentre non sono da considerarsi strettamente come DNA ambientali, quelli estratti da liquidi biologici e feci.

Il DNA ambientale è solitamente costituito da frammenti corti (nell'ordine di lunghezza di qualche decina di nucleotidi) (THOMSEN & WILLERSLEV, 2015), la cui stabilità e permanenza nell'ambiente possono dipendere da diversi fattori, tra cui in primo luogo la temperatura (Fig. 1). Si stima, infatti, che frammenti di DNA ambientale possano permanere in acqua a temperatura ambiente per alcune settimane, mentre la permanenza può arrivare anche ad anni (sino a centinaia di anni) all'abbassarsi della temperatura (DEAGLE *et al.*, 2006; WILLERSLEV & COOPER, 2005).

Il principio di base non è quindi molto diverso dal *DNA barcoding* (HEBERT *et al.*, 2003; CASIRAGHI *et al.*, 2010; GALIMBERTI *et al.*, 2014), perché applica la stessa idea, data dal riconoscere specie animali o vegetali sulla base della sequenza di geni mitocondriali o dei cloroplasti, applicandola però a molecole di DNA derivate da campioni ambientali e non estratti direttamente da animali e/o piante. A differenza del *DNA barcoding*, con il DNA ambientale si usano però sequenze più corte di quanto normalmente accade per adattare la metodica alla maggior degradazione del DNA ambientale rispetto a quello estratto da campioni freschi (TABERLET *et al.*, 2015; THOMSEN & WILLERSLEV, 2015).

L'ultimo tassello che ha reso possibile l'utilizzo del DNA ambientale è legato alle innovazioni nelle metodiche di sequenzia-

mento del DNA (GOODWIN *et al.*, 2016; LEVY & MYERS, 2016). Le metodiche di sequenziamento di seconda e terza generazione (anche definite NGS, dall'acronimo inglese *Next Generation Sequencing*) oggi in uso in numerosi laboratori, permettono di ottenere e analizzare contemporaneamente migliaia di sequenze diverse, in parallelo, in un solo esperimento (MANDRIOLI, 2016; GOODWIN *et al.*, 2016; LEVY & MYERS, 2016). Queste nuove tecnologie per il sequenziamento del DNA consentono di ottenere enormi quantità di sequenze, rendendo possibile il completamento in alcune settimane di analisi, che con i precedenti metodi di sequenziamento avrebbero impiegato anni. Le nuove tecnologie possono infatti consentire di ottenere più di 500 milioni di basi sequenziate da un solo strumento in una giornata con un aumento di produttività di circa 1000 volte rispetto a quella ottenuta con il primo strumento usato per il sequenziamento del genoma umano (GOODWIN *et al.*, 2016; LEVY & MYERS, 2016). Questo significa che partendo da un campione ambientale che contiene numerosi frammenti di DNA di diverse specie, è possibile studiare tali molecole simultaneamente arrivando ad avere una vera e propria lista delle specie che tali frammenti hanno lasciato nell'ambiente. Grazie al DNA ambientale è quindi possibile trasformare una lista di frammenti di DNA in una vera e propria *check list* faunistica o floristica in cui a ciascun frammento sequenziato può essere fatta corrispondere una specie (FICETOLA *et al.*, 2008; GOLDBERG *et al.*, 2015) (Fig. 2).

Da quanto descritto sinora emergono quindi anche i possibili limiti di questa metodica, perché la presenza del DNA di una data specie sarà influenzata dalla stagionalità con cui essa vive nell'ambiente da noi analizzato. Inoltre, la probabilità di trovare frammenti di DNA della specie (o delle specie) di nostro interesse deriverà dall'abbondanza di esemplari e/o dalle loro dimensioni e dalla possibilità che i frammenti di DNA hanno di diffondere nell'acqua o nel suolo (GOLDBERG *et al.*, 2015; DE SOUZA *et al.*, 2016). Come dimostrato da diversi Autori, il DNA in acqua tende a diffondere più velocemente rispetto a quanto accade nel suolo, aumentando la possibilità che i campioni di acqua prelevati contengano una reale approssimazione della biodiversità presente in quel corso di acqua (TAKAHARA *et al.*, 2012; PILLIOD *et al.*, 2013, 2014; TURNER *et al.*, 2015). I campioni di suolo e di sedimenti hanno però il vantaggio di poter stabilizzare meglio il DNA (in particolare in ambienti calcarei) e quindi di poter fornire dati anche sulla biodiversità passata (TURNER *et al.*, 2015).

Il DNA ambientale e le comunità acquisite

Le prime applicazioni del DNA ambientale a campioni costituiti da acqua risalgono al 2008, quando un gruppo di ricercatori dimostrò per la prima volta che estraendo DNA da acqua prelevata in fiumi era possibile verificare la presenza di pesci, anfibi ed invertebrati acquatici nei corsi d'acqua in fase di studio (FICETOLA *et al.*, 2008). Da allora questo metodo di indagine è divenuto di uso ricorrente non solo per determinare la presenza di specie che vivono in acqua (sia dolci che marine), ma anche per verificare la stagionalità di tale presenza (FICETOLA *et al.*, 2008; GOLBERG *et al.*, 2011; THOMSEN *et al.*, 2012a,b; JANE *et al.*, 2014; REESE *et al.*, 2014; DEINER *et al.*, 2016; DE SOUZA *et al.*, 2016).

Questo approccio ha permesso di rivoluzionare la raccolta di informazioni sui sistemi fluviali, utilizzando una metodologia di indagine molto simile a quella della chimica dell'acqua", perché anche in questo caso l'acqua viene prelevata in contenitori sterili e poi portata in laboratorio, dove al campione di acqua sono aggiunti alcuni reagenti che causano la precipitazione del DNA e permettono di conservare a basse temperature i campioni per mesi prima dell'analisi. Il DNA così ottenuto può essere purificato e analizzato (FICETOLA *et al.*, 2008; GOLBERG *et*

al., 2011; THOMSEN *et al.*, 2012a,b; JANE *et al.*, 2014; DEINER *et al.*, 2016). Grazie al DNA ambientale quindi l'acqua diventa una risorsa importante a disposizione degli scienziati, che potranno risalire ad ogni specie presente andando letteralmente a cercare le tracce genetiche lasciate dai diversi viventi.

L'acqua non è l'ambiente ideale per il DNA, che può subire velocemente processi di degradazione, ma questo non è necessariamente un limite, come ben dimostrato da un recente lavoro condotto monitorando la biodiversità dei fiumi East e Hudson

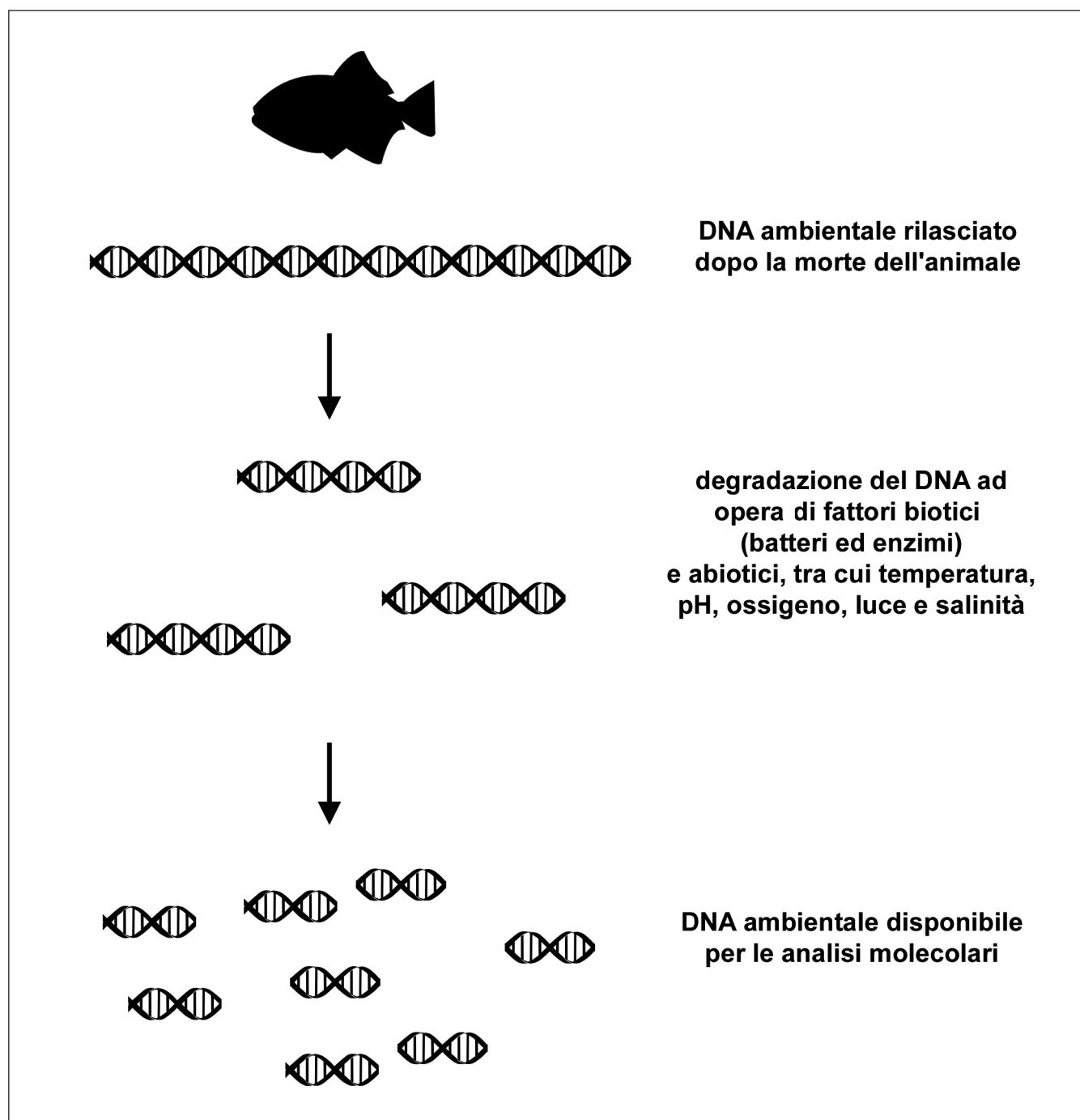


Fig. 1. Il DNA è rilasciato dopo la morte dell'animale e subisce processi di degradazione che variano in base alle caratteristiche dell'ambiente. Indipendentemente però dall'origine del campione (acqua, suolo, ghiaccio,...) il DNA ambientale che può essere recuperato è sempre costituito da frammenti di ridotte dimensioni.

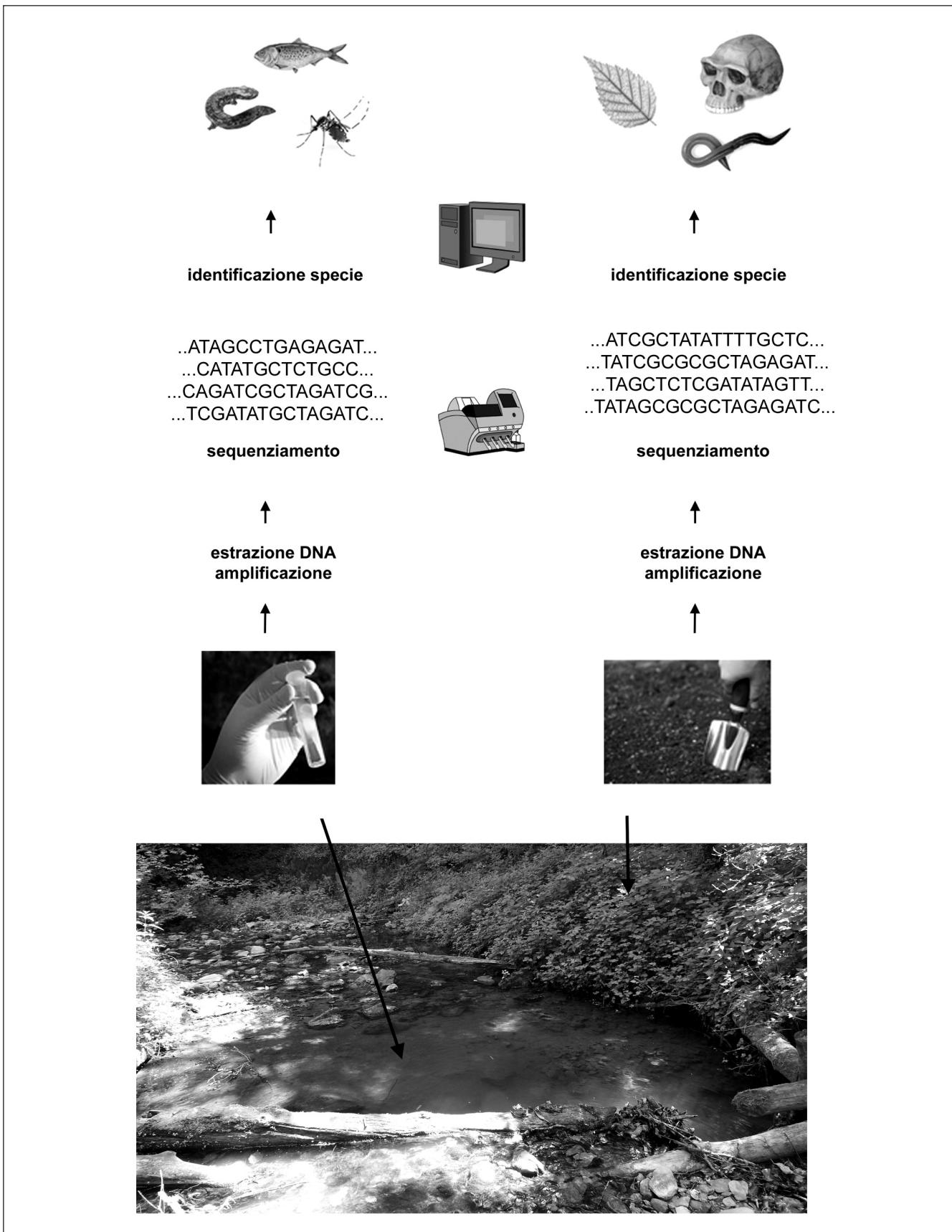


Fig. 2. I campioni ambientali sono generalmente prelevati in condizioni di sterilità per evitare contaminazioni e sono poi utilizzati per estrarre DNA e identificare, mediante *DNA barcoding*, le specie il cui DNA è presente nel campione. La gestione dei campioni ambientali differisce nelle prime fasi (campionamento ed estrazione DNA) in base alla matrice (acqua, suolo, ghiaccio, ...), mentre procede in modo analogo dalla fase di amplificazione all'analisi delle sequenze ottenute.

di New York (STOECKLE *et al.*, 2017). In questo caso, infatti, i ricercatori hanno raccolto campioni di acqua nelle stesse posizioni per sei mesi e ogni campione ha rivelato la presenza/assenza di varie specie in un particolare momento permettendo di studiare le migrazioni. Come suggerito dagli Autori di questa pubblicazione, i tempi di permanenza del DNA in acqua si sono rivelati ideali per lo studio delle migrazioni, perché hanno permesso di evidenziare l'alternanza delle specie. Se queste tracce molecolari durassero troppo poco i campioni non sarebbero informativi, mentre persistendo troppo a lungo, i campioni ambientali permetterebbero di capire l'arrivo di una specie, ma non la sua migrazione verso altro luogo (STOECKLE *et al.*, 2017).

Un ulteriore elemento di interesse del DNA ambientale è legato al fatto che si possono fornire anche dati di abbondanza, perché il numero di sequenze corrispondenti ad una data specie rispetto al numero totale delle sequenze ottenute può costituire un indice di abbondanza relativa. Immaginando che la sequenza di una data specie di pesce corrisponda al 10% di tutte le sequenze ittiche ottenute, si può stimare che questa specie rappresenti il 10% dei pesci presenti. Il dato interessante del lavoro di STOECKLE *et al.* (2017) è che le analisi molecolari hanno evidenziato 42 specie ittiche distinte in proporzioni che rispecchiano le attuali conoscenze sull'abbondanza dei pesci nei due fiumi oggetto di studio. Inoltre il 23% delle sequenze ottenute apparteneva a specie rare, di difficile monitoraggio con i tradizionali metodi di campionamento. Questo non rappresenta però un isolato caso di successo, poiché tutte le pubblicazioni disponibili a oggi sul DNA ambientale per lo studio delle comunità aquatiche confermano che il DNA ambientale è un "registro delle presenze" affidabile che può sostituire o affiancare le attuali pratiche di campionamento (FICETOLA *et al.*, 2008; GOLBERG *et al.*, 2011; THOMSEN *et al.*, 2012a,b; JANE *et al.*, 2014; SIGSGAARD *et al.*, 2015; DEINER *et al.*, 2016; DE SOUZA *et al.*, 2016; STOECKLE *et al.*, 2017).

Il DNA ambientale per la ricerca di specie aliene

Le specie aliene (o specie invasive) sono animali e piante introdotte accidentalmente o deliberatamente dall'uomo in territori in cui normalmente non si trovano (REGAN *et al.*, 2016). Nella maggior parte dei casi hanno un impatto negativo sulla biodiversità del nuovo ambiente, minacciando le piante e gli animali autoctoni e causando gravi danni economici. Le cause che portano alla loro diffusione e al loro successo risiedono nei meccanismi stessi dell'evoluzione biologica che vengono in un certo modo alterati dall'intervento dell'uomo (REGAN *et al.*, 2016).

Le specie tendono ad espandere naturalmente la loro area di distribuzione con la conseguente colonizzazione di nuovi territori, ma questa espansione è spesso ostacolata da barriere ambientali (es. montagne, mari, competitori, malattie). L'uomo con i suoi scambi commerciali determina, volontariamente o involontariamente, il superamento di tali barriere, offrendo alle specie nuovi territori che possono essere ricchi di cibo e privi di competitori e predatori, condizioni che facilitano la loro rapida espansione (REGAN *et al.*, 2016).

Tra gli esempi di invasione più recenti vi è indubbiamente quello della cimice esotica *Halyomorpha halys*, il cui primo

esemplare è stato catturato in un centro abitato in provincia di Modena (nel settembre 2012) da uno studente che stava allestando la propria scatola entomologica per un esame universitario (COSTI *et al.*, 2017). Originaria dell'Asia orientale (Cina, Corea, Giappone, Taiwan), *H. halys* è un vero e proprio flagello per molte coltivazioni, soprattutto frutteti. Questa cimice è, infatti, estremamente polifaga e si nutre su un'ampia varietà di specie coltivate e spontanee, in particolare Fabacee e Rosacee, con una predilezione per piante arboree e arbustive. (COSTI *et al.*, 2017). Grazie alla fortuita segnalazione, numerosi centri di ricerca si sono attivati immediatamente per capirne la biologia e definire eventuali strategie di contenimento (CESARI *et al.*, 2014).

Un altro esempio è dato dalla zanzara coreana *Aedes koreicus*, segnalata in Italia per la prima volta nel 2011, in modo del tutto casuale durante le attività di sorveglianza messe in atto per monitorare la zanzara tigre (CAPELLI *et al.*, 2011). La sua identificazione si deve a un'attenta analisi delle specie campionate e all'abilità dell'entomologo, ma anche al fatto fortuito che la trappola abbia attratto un numero elevato di specie, tra cui anche esemplari di zanzara coreana (CAPELLI *et al.*, 2011). A fronte del numero crescente di specie invasive, servirebbe poter attuare un monitoraggio frequente della biodiversità presente, ma le metodiche classiche di campionamento non sempre lo permettono. Al contrario, il DNA ambientale, abbinato alle metodiche di sequenziamento del DNA di nuova generazione, può permettere di identificare in modo celere eventuali tracce di specie invasive (HATZENBUHLER *et al.*, 2017).

Un esempio efficace di applicazione del DNA ambientale per monitorare il possibile arrivo di specie invasive è stato recentemente pubblicato da SCHNEIDER *et al.* (2016) in cui gli Autori dimostrano che il DNA ambientale permette di identificare le specie di zanzare in modo non ambiguo e con elevata sensibilità permettendo quindi di stabilire la presenza di nuove specie in un determinato specchio d'acqua oggetto di analisi.

In un momento storico in cui gli entomologi da campo sono sempre meno numerosi (più per mancanza di fondi, che per carenza di vocazioni), potersi avvalere di simili strumenti molecolari permette non solo di segnalare eventuali nuove specie di zanzare in tempi celeri (permettendo quindi di attivare precocemente eventuali monitoraggi specifici), ma anche di processare celermente un numero elevato di campioni anche in aree in cui non esistono specifici programmi di monitoraggio.

L'analisi del DNA ambientale può quindi rappresentare uno strumento da implementare in quel complesso processo di monitoraggio delle specie invasive che è oggi necessario per cercare di contenere i danni economici e i rischi per la salute umana connessi alla loro diffusione.

Il DNA ambientale in antropologia e paleontologia

Nel corso dell'ultimo decennio un apporto fondamentale agli studi antropologici è venuto dalla genetica che, grazie a innovative tecniche di indagine molecolare, ha permesso lo studio dei DNA antichi (KRINGS *et al.*, 1997; COOPER, 2000; CARAMELLI *et al.*, 2003; CARAMELLI & LARI, 2004; TUNIZ *et al.*, 2013). Grazie infatti allo studio dei DNA antichi è stato possibile suggerire che vi siano stati incroci tra i nostri progenitori e gli uomini di Neanderthal, oltre che identificare come appartenenti

a nuova specie del genere *Homo* i pochissimi resti trovati in una grotta siberiana (alcuni denti ed una falange) che sarebbero rimasti un piccolo mistero in assenza di dati molecolari (TUNIZ *et al.*, 2013). Ricorrendo quindi ai DNA antichi è possibile fare ricerche antropologiche anche in presenza di pochi (e piccoli) resti ossei.

Come mostrato da una recente pubblicazione (SLON *et al.*, 2017), ricorrendo al DNA ambientale è possibile svolgere ricerche antropologiche anche senza ossa. Il gruppo di Svante Pääbo, primo antropologo a mettere a punto ed utilizzare metodiche molecolari su reperti antichi su scala genomica, ha verificato la possibilità di usare DNA ambientale, derivante da sedimenti, per studiare non solo la presenza di nostri progenitori in alcune grotte, ma anche per verificare quali animali fossero vissuti in quelli stessi spazi (SLON *et al.*, 2017). In particolare, dopo aver estratto il DNA, il gruppo di Pääbo lo ha arricchito in DNA mitocondriale animale (e quindi compreso anche quello umano antico) mostrando che è possibile ottenere sequenze analizzabili (anche se molto brevi) e distinguerle dalle possibili contaminazioni derivanti da materiale biologico umano moderno (proveniente ad esempio dai ricercatori che hanno lavorato nelle aree di scavo).

I ricercatori coordinati da Pääbo hanno analizzato 85 campioni derivanti da 7 siti archeologici distribuiti tra Francia, Belgio, Spagna, Croazia e Russia e hanno ottenuto DNA antico riconducibile a diversi mammiferi (tra cui bovini, equini, canidi e cervidi), la cui presenza è coerente con precedenti analisi di carattere zoo-archeologico (SLON *et al.*, 2017).

Per quanto concerne invece il DNA di ominini, DNA antico neanderthaliano è stato rinvenuto in più campioni e in alcuni casi è stato possibile anche determinare che il DNA mitocondriale ottenuto derivava da più individui. DNA denisoviano è stato invece osservato, come atteso, nei sedimenti raccolti sui Monti Altai. Un aspetto interessante è che tra i campioni che hanno dato risultati positivi ve ne erano alcuni che non erano stati raccolti appositamente per queste analisi, ma che erano stati campionati negli anni precedenti e conservati senza particolari accorgimenti a temperatura ambiente. Per il sito di Trou Al'Wesse, il DNA neanderthaliano identificato è la prima evidenza diretta della presenza di Neanderthal riconducibile al pleistocene (le precedenti evidenze erano legate a manufatti) (SLON *et al.*, 2017).

Sebbene sia noto da tempo che alcuni minerali possono stabilizzare il DNA nei sedimenti, la quantità di DNA antico ottenuto è decisamente superiore all'attesa per cui, come suggerito anche da Pääbo, i sedimenti potrebbero rivelarsi campioni preziosi per studiare la presenza di ominini e di animali anche in completa assenza di reperti ossei (SLON *et al.*, 2017).

Il DNA ambientale e la *citizen science*

Nel corso dell'ultimo decennio un crescente numero di istituzioni di ricerca e musei ha sviluppato progetti di *citizen science* intesi come attività o progetti di ricerca scientifica condotti da scienziati affiancati da studenti e cittadini.

I progetti di *citizen science* si svolgono in un ambito educativo informale e sono rivolti a cittadini volontari e studenti che in collaborazione con ricercatori partecipano a progetti scientifici utilizzando diverse metodologie. Il primo antenato di quello

che possiamo considerare un progetto di *citizen science* dedicato alla biodiversità è il *Christmas Bird Count* (www.audubon.org/conservation/science/christmas-bird-count), conteggio degli uccelli fatto ogni anno, dal 1900 in avanti, il giorno di Natale e promosso dalla *National Audubon Society* negli Stati Uniti. Da questa prima iniziativa è nata una miriade di progetti (soprattutto nel nord dell'Europa e in America), da cui sono derivati non solo esperienze di *engagement* dei cittadini, ma anche veri e propri report scientifici e articoli *peer-reviewed* (SILVERTOWN *et al.*, 2011; ROY & BROWN, 2015).

Numerosi progetti legati alla tutela della biodiversità hanno sottolineato l'importanza dell'apporto di dati raccolti dai cittadini (GROVE-WHITE *et al.*, 2007). In particolare, la *citizen science* si dimostra una metodologia efficace nel caso dell'indagine della biodiversità in ambito urbano (COOPER *et al.*, 2007).

Sebbene il campionamento possa essere talvolta complesso, vi sono situazioni in cui anche la raccolta di DNA ambientale (in particolare da campioni di acqua) può essere abbinata a progetti di *citizen science*. Ne è un ottimo esempio il progetto di monitoraggio del tritone crestato *Triturus cristatus* condotto nel Regno Unito (BIGGS *et al.*, 2015).

Ricorrendo a volontari non professionisti (ma adeguatamente formati e attrezzati), il progetto di monitoraggio ha coperto il 75% dell'area di distribuzione del tritone crestato in UK (che ammonta ad oltre 217.000 km²), con una efficienza di segnalazione maggiore rispetto ai metodi classici e senza che siano stati rivelati falsi positivi (BIGGS *et al.*, 2015).

Analizzando i costi sostenuti, Biggs e colleghi riportano per ogni luogo di campionamento un costo di 140€ (inclusa le spedizioni dei campioni al laboratorio) per le analisi del DNA ambientale, a fronte di un costo di 1450€ per il monitoraggio classico.

Combinando quindi DNA ambientale e *citizen science* è possibile, in alcuni progetti in cui il campionamento può essere condotto con semplicità, fare monitoraggi di portata superiore a quanto fatto sinora, con il vantaggio aggiunto che il progetto di *citizen science* rappresenta anche un momento di sensibilizzazione, educazione e formazione utili per aumentare la consapevolezza dei partecipanti in merito alla conservazione della biodiversità.

Problemi da risolvere

Gli esempi mostrati nelle sezioni precedenti ben evidenziano le enormi potenzialità di questo nuovo approccio molecolare, ma restano ancora alcuni problemi da risolvere e, in particolare, procedure da standardizzare (THOMSEN & WILLERSLEV, 2015). I problemi più comuni in cui ci si può imbattere sono in primo luogo la possibilità di contaminazione dei campioni e la presenza di contaminanti che possano inibire le analisi molecolari (ed in particolare il funzionamento della DNA polimerasi necessaria per l'amplificazione del DNA). Per evitare il problema delle contaminazioni serve che i laboratori adottino precise metodiche di gestione del campione in tutte le fasi sperimentali. L'esperienza già maturata da numerosi laboratori nella gestione dei DNA antichi può però fornire preziosi elementi da cui partire per risolvere questi problemi (PÄÄBO, 2014; THOMSEN & WILLERSLEV, 2015).

Per risultare uno strumento efficace, il DNA ambientale deve

fare riferimento a database con sequenze di riferimento verificate e che coprano un ampio numero di specie (LINACRE *et al.*, 2006). Ad oggi, grazie ai numerosi progetti di *DNA barcoding* (ad esempio www.boldsystems.org, www.fishbol.org, www.mammaliabol.org, www.barcodingbirds.org), vi è un numero crescente di database pubblici in cui possono essere trovate le informazioni sulle “firme molecolari” utili per il riconoscimento delle singole specie, per cui anche il DNA ambientale può divenire uno strumento di uso sempre più comune (THOMSEN & WILLERSLEV, 2015).

Serve inoltre poter capire quali scale temporali e spaziali siano studiabili con il DNA ambientale, anche alla luce della differente persistenza dei campioni di DNA in diverse matrici. Capire come il DNA permane e diffonde nel suolo è infatti fondamentale per “dare una data” alle specie che quel DNA hanno lasciato e questo implica che anche i campionamenti devono essere condotti in modo accurato (THOMSEN & WILLERSLEV, 2015).

Serve infine vincere lo scetticismo che nasce da tante pubblicazioni che già in passato hanno suggerito la permanenza (successivamente non confermata) di tracce di DNA in campioni molto antichi, tra cui ossa di dinosauro (WOODWARD *et al.*, 1994) e insetti nell’ambra (CANO *et al.*, 1992). Il fatto che questi dati siano stati smentiti (motivo per cui *Jurassic Park* rimarrà sempre e solo una finzione cinematografica) può generare ancora oggi timori, ma i successi ottenuti ricorrendo al DNA antico possono permetterci di essere fiduciosi.

Sarà quindi sicuramente necessario definire metodiche standardizzate e sistemi di analisi precisi, ma nel complesso questa è una situazione che la comunità scientifica ha già affrontato con i DNA antichi. Come infatti scriveva SVANTE PÄÄBO nel suo libro *L'uomo di Neanderthal* (2014): “Come mi succede ogni volta che mi trovo di fronte un risultato entusiasmante o inatteso, vengo assillato dai dubbi. Pensai a tutti gli errori che potevamo avere commesso”, ma da allora tanti gruppi di ricerca hanno ripetuto con successo queste procedure indicando che il DNA antico e il DNA ambientale possono essere strumenti affidabili.

CONCLUSIONI

Il desiderio di chiunque voglia pianificare una campagna di tutela della biodiversità è poter disporre di strumenti economici, veloci e semplici per campionare e monitorare la biodiversità di un dato luogo. Il DNA ambientale si è dimostrato uno strumento efficace e affidabile per raccogliere, in modo economico, campioni da cui stimare la biodiversità di un dato ambiente. Sebbene permangano alcuni problemi tecnici, il DNA ambientale si presenta come uno strumento di diffusione crescente per studiare e monitorare la biodiversità presente e passata.

Accanto a questi aspetti non può essere tralasciata la semplicità con cui i campionamenti possono essere condotti aprendo anche la partecipazione a non specialisti, oltre che a specialisti di ambiti diversi. Questo può contribuire non solo ad aumentare le aree coperte dal campionamento, ma anche a raccogliere campioni da aree di difficile raggiungimento che sono oggetto di studio da parte di altri progetti (ad esempio geologici) arricchendo la conoscenza della biodiversità del nostro pianeta.

BIBLIOGRAFIA

- BELOTE R.T., DIETZ M.S., MCKINLEY P.S., CARLSON A.A., CARROLL C., JENKINS C.N., URBAN D.L., FULLMAN T.J., LEPP J.C. & APLET G.H., 2017 - Mapping conservation strategies under a changing climate. *Bioscience*, 67: 494-497.
- BERNAZZANI P., BRADLEY B.A. & OPPERMANN J.J., 2012 - Integrating climate change into habitat conservation plans under the U.S. endangered species act. *Environmental Management*, 49: 1103-14.
- BETTS M.G., WOLF C., RIPPLE W.J., PHALAN B., MILLERS K.A., DUARTE A., BUTCHART S.H.M. & LEVI T., 2017 - Global forest loss disproportionately erodes biodiversity in intact landscapes. *Nature*, 547: 441-444.
- BIGGS J., EWALD N., VALENTINI A., GRIFFITHS R., FOSTER J., ARNELL A., BROTHERTON P., WILLIAMS P. & DUNN F., 2015 - Using eDNA to develop a national citizen science-based monitoring programme for the great crested newt (*Triturus cristatus*). *Biological Conservation*, 183: 19-28.
- BOHMAN K., EVANS A., GILBERT M.T.P., CARVALHO G.R., CREER S. & KNAPP M. 2014 - Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring. *Trends in Ecology & Evolution*, 29: 358-367.
- BOSCH N.E., GONÇALVES J.M.S., ERZINI K. & TUJA F., 2017 - “How” and “what” matters: Sampling method affects biodiversity estimates of reef fishes. *Ecology and Evolution*, 7: 4891-4906.
- BUTCHART S.H.M., WALPOLE M., COLLEN B., VAN STRIEN A., SCHARLEMANN J.P.W., ALMOND R.E.A., BAILLIE MCRAE L., MINASYAN A., MORCILLO M.H., OLDFIELD T.E.E., PAULY D., QUADER S., REVENGA C., SAUER J.R., SKOLNIK B., SPEAR D., STANWELL-SMITH D., STUART S.N., SYMES A., TIERNEY M., TYRRELL T.D., VÍÉ J.C. & WATSON R., 2010 - Global biodiversity: indicators of recent declines. *Science*, 328: 1164-1168.
- CANO R.J., POINAR H.H. & POINAR G.O. Jr., 1992 - Isolation and partial characterisation of DNA from the bee *Proplebeia dominicana* (Apidae: Hymenoptera) in 25–40 million year old amber. *Medical Science Research*, 20: 249-251.
- CAPPELLI G., DRAGO A., MARTINI S., MONTARSI F., SOPPELSA M., DELAI N., RAVAGNAN S., MAZZON L., SCHAFFNER F., MATHIS A., DI LUCA M., ROMI R. & RUSSO F., 2011 - First report in Italy of the exotic mosquito species *Aedes* (Finlaya) *koreicus*, a potential vector of arboviruses and filariae”. *Parasites & Vectors*, 4: 188.
- CARDINALE B.J., DUFFY J.E., GONZALEZ A., HOOPER D.U., PERRINGS C., VENAIL P., NARWANI A., MACE G.M., TILMAN D., WARDLE D.A., KINZIG A.P., DAILY G.C., LOREAU M., GRACE J.B., LARIGAUDIERIE A., SRIVASTAVA D.S. & NAEEM S., 2012 – Biodiversity loss and its impact on humanity. *Nature*, 486: 59-67.
- CASIRAGHI M., LABRA M., FERRI E., GALIMBERTI A. & DE MATTIA F. 2010, - DNA barcoding: a six-question tour to improve users’ awareness about the method. *Briefings in Bioinformatics*, 11: 440-453.
- CESARI M., MAISTRELLO L., GANZERLI F., DIOLI P., REBECHI L. & GUIDETTI R., 2014 - A pest alien invasion in progress: potential pathways of origin of the brown marmorated stink bug *Halyomorpha halys* populations in Italy - *Journal of Pest Science*, 88: 1-7.
- COOPER C.B., DICKINSON J., PHILLIPS T., BONNEY R., - 2007 - Citizen science as a tool for conservation in residential ecosystems. *Ecology and Society*, 12: 11.
- COSTI E., HAYE T. & MAISTRELLO L., 2017 - Biological parameters of the invasive brown marmorated stink bug, *Halyomorpha halys*, in southern Europe. *Journal of Pest Science*, 90: 1059-1067.
- DE SOUZA L.S., GODWIN J.C., RENSHAW M.A. & LARSON E., 2016 - Environmental DNA (eDNA) detection probability is influenced by seasonal activity of organisms. *PLoS One*, 11: e0165273.
- DEAGLE B.E., EVESON J.P. & JARMAN S.N., 2006 - Quantification of damage in DNA recovered from highly degraded samples - a case

- study on DNA in faeces. *Frontiers in Zoology*, 3: 11.
- DEINER K., FRONHOFER E.A., MÄCHLER E., WALSER J.C. & ALTERMATT F., 2016 - Environmental DNA reveals that rivers are conveyor belts of biodiversity information. *Nature Communications*, 7: 12544.
- FICETOLA G.F., MIAUD C., POMPANON F. & TABERLET P., 2008 - Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters*, 4: 423-425.
- FIERER N. & JACKSON R.B., 2006 - The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceeding of the National Academy of Science USA*, 103: 626-631.
- FISHER M.M. & TRIPPLETT E.W., 1999 - Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 4630-4639.
- GALIMBERTI A., DE MATTIA F., BRUNI I., SCACCABAROZZI D., SANTIONIGI A., BARBUTO M., CASIRAGHI M. & LABRA M., 2014 - A DNA barcoding approach to characterize pollen collected by honeybees. *PLoS One*, 9: e109363.
- GILLSON L., DAWSON T.P., JACK S., McGEOCH M.A., 2013 - Accommodating climate change contingencies in conservation strategy. *Trends in Ecology and Evolution*, 28: 135-142.
- GOLDBERG C.S., PILLIOD D.S., ARKLE R.S. & WAITS L.P., 2011 - Molecular detection of vertebrates in stream water: a demonstration using Rocky Mountain tailed frogs and Idaho giant salamanders. *PLoS One*, 6: e22746.
- GOLDBERG C.S., STRICKLER K.M. & PILLIOD D.S., 2015 - Moving environmental DNA from concept to practice for monitoring aquatic macroorganisms. *Biological Conservation*, 183: 1-3.
- GOODWIN S., MCPHERSON J.D. & McCOMBIE R.W., 2016 - Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics* 17: 333-351.
- GROVE-WHITE R., WATERTON C. & ELLIS R., - 2007 - Amateurs as experts: harnessing new networks for biodiversity. Lancaster University, Lancaster, UK.
- HATZENBUHLER C., KELLY J.R., MARTINSON J., OKUM S. & PILGRIM E., 2017 - Sensitivity and accuracy of high-throughput metabarcoding methods for early detection of invasive fish species. *Scientific Reports*, 7: 46393.
- HEBERT PD., CYWINSKA A., BALL S.L., 2003 - Biological identifications through DNA barcodes. *Proceeding of the Royal Society of London. B. Biological Science*, 270: 313-321.
- JANE S.F., WILCOX T.M., MCKELVEY K.S., YOUNG K.M., SCHWARTZ M.K., LOWE W.H., LETCHER B.H. & WHITELEY A.R., 2014 - Distance flow and PCR inhibition, eDNA dynamics in two headwater streams. *Molecular Ecology Resources*, 15: 216-227.
- LEVY SE & MYERS R.M., 2016 - Advancements in Next-Generation Sequencing. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 17: 95-115.
- LINACRE A., 2006 - Application of mitochondrial DNA Technologies in wildlife investigation - Species Identification. *Forensic Science Review*, 18: 1-8.
- MANDRIOLI M., 2016 - MUSEomic: quando la genomica entra in museo. *Quaderni del Museo Civico di Storia Naturale di Ferrara*, 4: 51-56.
- OGRAM A., SAYLER G.S. & BARKAY T., 1987 - The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *Journal of Microbiological Methods*, 7: 57-66.
- PÅÅBO S., (2014) - *L'uomo d Neanderthal. Alla ricerca dei genomi perduti*. Einaudi.
- PAVOINE S. & BONSALL M.B., 2011 - Measuring biodiversity to explain community assembly: a unified approach. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 86: 792-812.
- PEARMAN J.K., ANLAUF H., IRIGOEN X. & CARVALHO S., 2016 - Please mind the gap - Visual census and cryptic biodiversity assessment at central Red Sea coral reefs. *Marine Environmental Resources*, 118: 20-30.
- PILLIOD D.S., GOLDBERG C.S., ARKLE R.S. & WAITS L.P., 2013 - Estimating occupancy and abundance of stream amphibians using environmental DNA from filtered water samples. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 70: 1123-1130.
- PILLIOD D.S., GOLDBERG C.S., ARKLE R.S. & WAITS L.P., 2014 - Factors influencing detection of eDNA from a stream-dwelling amphibian. *Molecular Ecology Resources*, 14: 109-116.
- REES H.C., MADDISON B.C., MIDDLEDITCH D.J., PATMORE J.R. & GOUGH K.C., 2014 - The detection of aquatic animal species using environmental DNA—a review of eDNA as a survey tool in ecology. *Journal of Applied Ecology*, 51: 1450-1459.
- REGAN E., BRADLEY B.A., DUKES J.S., IBANEZ I., MILLER L.P., SORTE C.J.B. & TATEM A.J., 2016 - Global threats from invasive alien species in the twenty-first century and national response capacities. *Nature Communications*, 7: 12485.
- ROY H.E. & BROWN P.M.J., 2015 - Ten years of invasion: *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae) in Britain. *Ecological Entomology*, 40: 336-348.
- SCHNEIDER J., VALENTINI A., DEJEAN T., MONTARSI F., TABERLET P., GLAIZOT O. & FUMAGALLI L., 2016 - Detection of invasive mosquito vectors using environmental DNA (eDNA) from water samples. *PLoS ONE* 11: e0162493.
- SEDDON N., MACE G.M., NAEEM S., TOBIAS J.A., PIGOT A.L., CAVANAGH R., MOUILLOT D., VAUSE J. & WALPOLE M., 2016 - Biodiversity in the Anthropocene: prospects and policy. *Proceedings of the Royal Society. Biological Sciences*, 283: 1844.
- SHOKRALLA S., SPALL J.L., GIBSON J.F. & HAJIBABAEI M., 2012 - Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. *Molecular Ecology*, 21: 1794-1805.
- SIGSGAARD E.E., CARL H. MØLLER P.R. & THOMSEN P.F., 2015 - Monitoring the near-extinct European weather loach Misgurnus fossilis in Denmark by combining traditional fishing surveys and environmental DNA from water samples. *Biological Conservation*, 183: 46-52.
- SILVERTOWN J., COOK L., CAMERON R., DODD M., MC CONWAY K. & WORTHINGTON J., 2011 - Citizen science reveals unexpected continental-scale evolutionary change in a model organism. *PLoS ONE*, 6: e18927.
- STOECKLE M.Y., SOBOLEVA L. & CHARLOP-POWERS Z., 2017 - Aquatic environmental DNA detects seasonal fish abundance and habitat preference in an urban estuary. *PLoS One*, 12: e0175186.
- TABERLET P., COISSAC E., HAJIBABAEI M. & RIESEBERG L.H., 2012 - Environmental DNA. *Molecular Ecology*, 21: 1789-1793.
- TAKAHARA T., MINAMOTO T., YAMANAKA H., DOI H. & KAWABATA Z.I., 2012 - Estimation of fish biomass using environmental DNA. *PLoS One*, 7: e35868.
- THOMSEN P.F. & WILLERSLEV E., 2015 - Environmental DNA: an emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biological Conservation*, 183: 4-18.
- THOMSEN P.F., KIELGAST J., IVERSEN L.L., MØLLER P.R., RASMUSSEN M. & WILLERSLEV E., 2012a - Detection of a diverse marine fish fauna using environmental DNA from seawater samples. *PLoS One*, 7: e41732.
- THOMSEN P.F., KIELGAST J., IVERSEN L.L., WIUF C., RASMUSSEN M., GILBERT M.T.P., ORLANDO L., WILLERSLEV E., 2012b - Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Molecular Ecology*, 21: 2565-2573.
- TURNER C.R., UY K.L. & EVERHART R.C., 2015. Fish environmental DNA is more concentrated in sediments than in surface water. *Biological Conservation*, 183, 93-102.
- VENTER J.C., REMINGTON K., HEIDELBERG J.F., HALPERN A.L., RUSCH D., EISEN J.A., WU D., PAULSEN I., NELSON K.E., NELSON W., FOUTS D.E., LEVY S., KNAP A.H., LOMAS M.W.,

- NEALSON K., WHITE O., PETERSON J., HOFFMAN J., PARSON'S R., BADEN-TILLSON H., PFANNKOCCH C., ROGERS Y.H & SMITH H.O., 2004 - Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science*, 304: 66-74.
- VENTER O., SANDERSON E.W., MAGRACH A., ALLAN J.R., BEHER J., JONES K.R., POSSINGHAM H.P., LAURANCE W.F., WOOD P., FEKETE B.M., LEVY M.A. & WATSON J.E., 2016 - Sixteen years of change in the global terrestrial human footprint and implications for biodiversity conservation. *Nature Communications*, 7: 12558.
- WATSON J.E., SHANAHAN D.F., DI MARCO M., ALLAN J., LAURANCE W.F., SANDERSON E.W., MACKEY B. & VENTER O., 2016 - Catastrophic declines in wilderness areas undermine global environment targets. *Current Biology*, 26: 2929-2934.
- WILLERSLEV E. & COOPER A., 2005 - Ancient DNA. *Proceeding of the Royal Society. Biological Sciences*, 272: 3-16.
- WOODWARD S.R., WEYAND N.J. & BUNNELL M., 1994 - DNA sequence from Cretaceous period bone fragments. *Science*, 266: 1229-1232.