

## PROGETTO DI DOTTORATO

### Qualità e quantità: eDNA come mezzo per la valutazione dell'abbondanza di specie marine sfruttate dalla pesca

Candidato: **Simone Galli**

#### Stato dell'arte

Nel panorama delle ricerche scientifiche riguardanti il monitoraggio ambientale, e l'ecologia più in generale, un ruolo di primo piano è stato recentemente assunto dal DNA ambientale (environmental DNA, eDNA). La raccolta e la successiva analisi di eDNA costituiscono una tecnica dalla comprovata validità, applicata con successo in studi riguardanti il monitoraggio della biodiversità<sup>1</sup>, il rilevamento di specie aliene<sup>2</sup>, l'analisi della dieta<sup>3</sup>, l'analisi di comunità, microbiche<sup>4</sup> e non, in ambiente terrestre<sup>5</sup>, aereo<sup>6</sup> ed acquatico<sup>7</sup>.

Gran parte degli studi in questione condivide il medesimo approccio: il "metabarcoding". Il DNA metabarcoding consiste nell'amplificazione selettiva, tramite PCR, di specifiche regioni geniche condivise dai taxa di interesse, e del loro successivo sequenziamento. Dal confronto tra le sequenze ottenute e quelle presenti in database di riferimento è possibile l'attribuzione delle sequenze ai rispettivi taxa<sup>8</sup>.

Diversi aspetti contribuiscono tuttavia a rendere complesso lo studio della relazione tra la quantità di materiale genetico e la reale consistenza numerica o in biomassa degli organismi che lo hanno rilasciato<sup>9</sup>. Il numero di sequenze (*reads*) per ogni taxon, così come restituito da un sequenziatore, può infatti essere influenzato da diversi fattori, come la presenza nel campione di sostanze che intaccano l'efficienza della PCR<sup>10</sup> o la diversa affinità dei primer utilizzati per determinate sequenze<sup>11-12</sup>. Dunque, una delle prospettive più interessanti per il prossimo futuro riguarda la possibilità di ricavare dall'eDNA informazioni quantitative sull'abbondanza e sulla biomassa delle specie oggetto di studio<sup>13</sup>.

In ambito marino, la valutazione dello stato delle risorse alieutiche in risposta agli impatti antropici costituisce un imperativo per la ricerca scientifica, come sottolineato dalle Nazioni Unite nell'ambito degli Obiettivi per lo Sviluppo Sostenibile 2030<sup>1</sup>. In questa cornice, l'eDNA metabarcoding potrebbe rappresentare uno strumento di indagine non invasivo, rapido ed accurato, in grado di fornire informazioni sulle comunità di interesse, con risultati anche più completi rispetto ai metodi tradizionalmente impiegati<sup>14-18</sup>.

Recentemente, il gruppo del Laboratorio di Ecologia Sperimentale ed Acquacoltura, in collaborazione con la Commissione Generale per la Pesca nel Mediterraneo della FAO, ha sviluppato una sonda a basso costo e di semplice utilizzo che può essere facilmente integrata nelle attività di pesca professionale o nelle campagne di pesca sperimentale per raccogliere materiale genetico. Questa sonda, denominata *metaprobe* (<https://github.com/GiuliaMaiello/Metaprobe-2.0>), è stata già applicata in diverse aree marine

---

<sup>1</sup> <https://sdgs.un.org/goals/goal14>

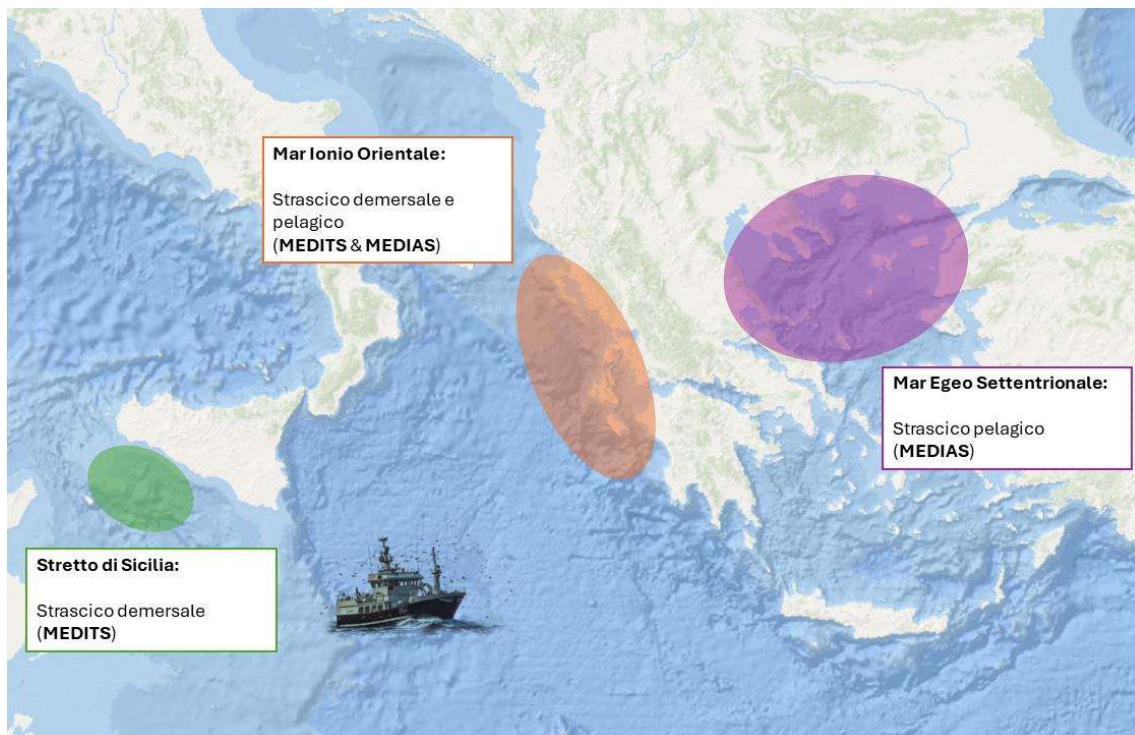
e su diversi attrezzi da pesca, e i primi risultati ottenuti hanno evidenziato come il materiale raccolto possa essere utilizzato per ricostruire efficacemente la composizione delle catture ed in generale delle comunità marine legate alla pesca<sup>19–21</sup>.

### **Obiettivi del progetto e origine dei dati**

Il Progetto di Dottorato ambisce ad indagare la possibilità di utilizzare eDNA raccolto durante le attività di pesca, per mezzo della *metaprobe*, per stimare l'abbondanza numerica e la biomassa di alcune specie presenti nelle aree di indagine.

I campioni sono stati raccolti nell'estate 2023 nell'ambito delle campagne di pesca scientifica MEDITS<sup>22</sup> e MEDIAS<sup>23</sup>, condotte in Mar Egeo, Mar Ionio e nello Stretto di Sicilia (Fig. 1). Oltre ai campioni di eDNA, sono state raccolte osservazioni dirette sulle abbondanze (in termini di numero di individui e biomassa) delle diverse specie. Nel caso del MEDITS, basato su pesca a strascico demersale, saranno i dati di cattura ad essere usati come riferimento. Nel caso del MEDIAS, che opera invece con strascico pelagico, la consistenza delle popolazioni sarà stimata mediante dati di cattura e dati acustici. I dati osservati saranno quindi confrontati con quelli provenienti dall'analisi di eDNA<sup>24</sup>.

<b>Area</b>	<b>Campagna</b>	<b>N campioni</b>	<b>Dati raccolti</b>
Stretto di Sicilia	MEDITS	75	eDNA + catture
Mar Ionio Orientale	MEDITS	57	eDNA + catture
Mar Ionio Orientale	MEDIAS	39	eDNA + catture + dati acustici
Mar Egeo Settentrionale	MEDIAS	30	eDNA + catture + dati acustici



**Fig. 1:** Aree di campionamento e relative campagne.

## Metodi

Saranno esplorati due approcci (Fig. 2).

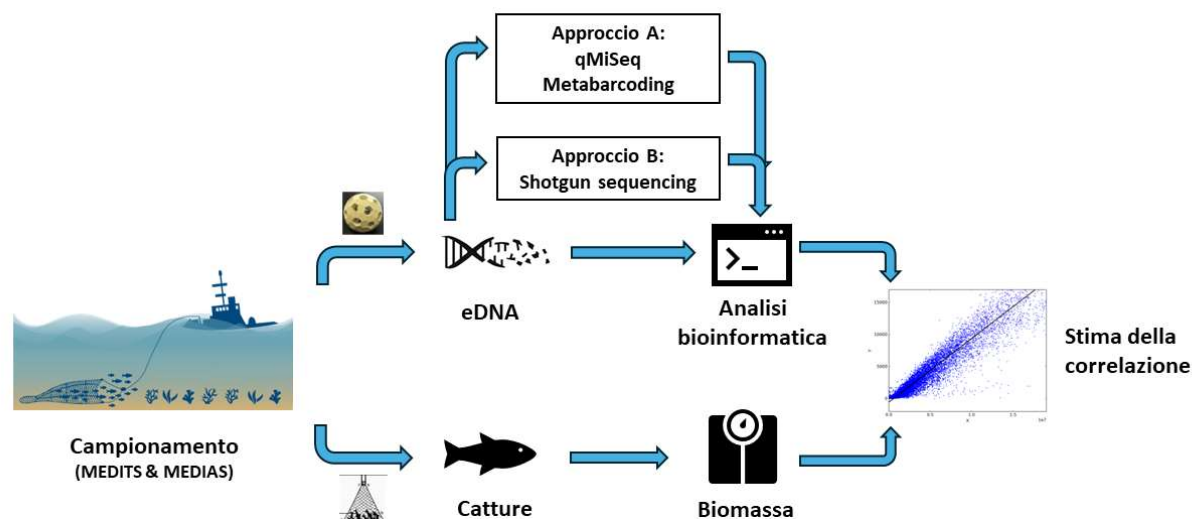
### Approccio A

In prima istanza verrà utilizzato l'approccio, basato su metabarcoding, proposto da Ushio et al.<sup>25</sup>, denominato "qMiSeq". Questa metodologia prevede l'aggiunta, ad ogni campione, di uno standard composto da DNA di specie non presenti nell'area di studio, a concentrazione nota e crescente. Grazie alla presenza dello standard, risulta possibile individuare una correlazione campione-specifica tra il numero di sequenze e la concentrazione iniziale del corrispondente DNA. Il fatto che lo standard venga inserito in ogni campione elimina possibili bias dovuti alla presenza di inibitori di PCR, alla preparazione delle librerie, ed al processo di sequenziamento. La validità di tale approccio è stata confermata in ambiente fluviale<sup>26</sup>. Da quanto noto, questa tecnica non è mai stata applicata in ambiente marino.

### Approccio B

È stato preliminarmente osservato che l'eDNA raccolto dalle *metaprobe* nelle reti da pesca risulta molto più concentrato di quello presente in tracce nell'acqua circostante. Ciò consente di esplorare un diverso approccio quantitativo, basato sullo "*shotgun sequencing*"<sup>27</sup>. Si tratta di un sequenziamento non mirato dell'intero materiale genetico disponibile, che non prevede quindi amplificazione tramite PCR, che aprirebbe nuove opportunità per una esatta quantificazione dell'eDNA, fornendo abbondanze di reads direttamente correlate con il contenuto di DNA nei campioni. Un'altra importante conseguenza riguarderebbe l'identificazione tassonomica: le sequenze utilizzate nel metabarcoding non sono infatti

sempre in grado di discriminare specie filogeneticamente vicine. Per far ciò verranno creati database di riferimento personalizzati, contenenti informazioni sui genomi delle specie di interesse, e saggiate pipeline di quantificazione che forniscano stime da confrontare con i dati di biomassa disponibili.



**Fig. 2:** Diagramma riassuntivo del progetto. Sono rappresentati i due approcci che saranno utilizzati e le sorgenti delle informazioni per la stima della correlazione.

**Piano di lavoro preliminare e collaborazioni pianificate**

Fase	Attività	Luogo	Partner di riferimento
<b>1</b> (Inverno 2024-Primavera 2025)	Aggiornamento della letteratura – estrazione dell’eDNA dai campioni	Laboratorio di Ecologia Sperimentale ed Acquacoltura	Prof. Tommaso Russo Prof. Claudio Ottoni
<b>2</b> (Primavera 2025-Inverno 2025)	Analisi dei campioni (Approccio A: Metabarcoding qMiSeq)	Laboratorio di Ecologia Sperimentale ed Acquacoltura	
<b>3</b> (Inverno 2025-Estate 2026)	Analisi dei campioni (Approccio B: Shotgun sequencing)	Liverpool John Moores University	Prof. Stefano Mariani
<b>4</b> (Estate 2026-Primavera 2027)	Analisi bioinformatica dei risultati ottenuti - Analisi statistica dei dati	Laboratorio di Ecologia Sperimentale ed Acquacoltura	Prof. Tommaso Russo Prof. Claudio Ottoni Prof. Stefano Mariani Dr. Fabio Fiorentino
<b>5</b> (Primavera 2027-Autunno 2027)	Preparazione delle pubblicazioni e della tesi	Laboratorio di Ecologia Sperimentale ed Acquacoltura	Prof. Tommaso Russo Prof. Claudio Ottoni Prof. Stefano Mariani

## Bibliografia

1. Deiner, K. *et al.* Environmental DNA metabarcoding: Transforming how we survey animal and plant communities. *Mol. Ecol.* **26**, 5872–5895 (2017).
2. Holman, L. E. *et al.* Detection of introduced and resident marine species using environmental DNA metabarcoding of sediment and water. *Sci. Rep.* **9**, 11559 (2019).
3. Shum, P., Wäge-Recchioni, J., Sellers, G. S., Johnson, M. L. & Joyce, D. A. DNA metabarcoding reveals the dietary profiles of a benthic marine crustacean, *Nephrops norvegicus*. *PLOS ONE* **18**, e0289221 (2023).
4. Farrell, M. J., Govender, D., Hajibabaei, M., Van Der Bank, M. & Davies, T. J. Bacterial diversity in the waterholes of the Kruger National Park: an eDNA metabarcoding approach. *Genome* **62**, 229–242 (2019).
5. Thomsen, P. F. & Sigsgaard, E. E. Environmental DNA metabarcoding of wild flowers reveals diverse communities of terrestrial arthropods. *Ecol. Evol.* **9**, 1665–1679 (2019).
6. Runnel, K. *et al.* Aerial eDNA contributes vital information for fungal biodiversity assessment. *J. Appl. Ecol.* 1365–2664.14691 (2024) doi:10.1111/1365-2664.14691.
7. Valentini, A. *et al.* Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Mol. Ecol.* **25**, 929–942 (2016).
8. Taberlet, P. *Environmental DNA: For Biodiversity Research and Monitoring*. (Oxford University Press, Oxford, United Kingdom, 2018).
9. Shelton, A. O. *et al.* Toward quantitative metabarcoding. *Ecology* **104**, e3906 (2023).
10. Takasaki, K. *et al.* Water pre-filtration methods to improve environmental DNA detection by real-time PCR and metabarcoding. *PLOS ONE* **16**, e0250162 (2021).
11. Kelly, R. P., Shelton, A. O. & Gallego, R. Understanding PCR Processes to Draw Meaningful Conclusions from Environmental DNA Studies. *Sci. Rep.* **9**, 12133 (2019).
12. Lamb, P. D. *et al.* How quantitative is metabarcoding: A meta-analytical approach. *Mol. Ecol.* **28**, 420–430 (2019).
13. Blackman, R. *et al.* Environmental DNA : The next chapter. *Mol. Ecol.* **33**, e17355 (2024).
14. Aglieri, G. *et al.* Environmental DNA effectively captures functional diversity of coastal fish communities. *Mol. Ecol.* **30**, 3127–3139 (2021).
15. Hansen, B. K., Bekkevold, D., Clausen, L. W. & Nielsen, E. E. The sceptical optimist: challenges and perspectives for the application of environmental DNA in marine fisheries. *Fish Fish.* **19**, 751–768 (2018).
16. Mariani, S., Baillie, C., Colosimo, G. & Riesgo, A. Sponges as natural environmental DNA samplers. *Curr. Biol.* **29**, R401–R402 (2019).
17. Miya, M. Environmental DNA Metabarcoding: A Novel Method for Biodiversity Monitoring of Marine Fish Communities. *Annu. Rev. Mar. Sci.* **14**, 161–185 (2022).
18. Oka, S. *et al.* Environmental DNA metabarcoding for biodiversity monitoring of a highly diverse tropical fish community in a coral reef lagoon: Estimation of species richness and detection of habitat segregation. *Environ. DNA* **3**, 55–69 (2021).
19. Russo, T. *et al.* All is fish that comes to the net: metabarcoding for rapid fisheries catch assessment. *Ecol. Appl.* **31**, e02273 (2021).
20. Maiello, G. *et al.* Little samplers, big fleet: eDNA metabarcoding from commercial trawlers enhances ocean monitoring. *Fish. Res.* **249**, 106259 (2022).
21. Maiello, G. *et al.* Net gain: Low-cost, trawl-associated eDNA samplers upscale ecological assessment of marine demersal communities. *Environ. DNA* **6**, e389 (2024).
22. Spedicato, M. T. *et al.* The MEDITS trawl survey specifications in an ecosystem approach to fishery management. *Sci. Mar.* **83**, 9 (2020).
23. Leonori, I. *et al.* History of hydroacoustic surveys of small pelagic fish species in the European Mediterranean Sea. *Mediterr. Mar. Sci.* **22**, 751 (2021).
24. Sato, M. *et al.* Quantitative assessment of multiple fish species around artificial reefs combining environmental DNA metabarcoding and acoustic survey. *Sci. Rep.* **11**, 19477 (2021).
25. Ushio, M. *et al.* Quantitative monitoring of multispecies fish environmental DNA using high-throughput sequencing. *Metabarcoding Metagenomics* **2**: e23297, (2018).
26. Tsuji, S. *et al.* Quantitative environmental DNA metabarcoding shows high potential as a novel approach to quantitatively assess fish community. *Sci. Rep.* **12**, 21524 (2022).
27. Venter, J. C. *et al.* Shotgun Sequencing of the Human Genome. *Science* **280**, 1540–1542 (1998).