

MARCO ZEDDA, FRANCESCA BALZANO, GIAN LUCA DEDOLA, VITTORIO FARINA

Università di Sassari, Dipartimento di Medicina Veterinaria

## **Variabilità della sequenza genica del citocromo b: un confronto tra ovini sardi antichi e ovini e mufloni attuali**

### *Variability in cytochrome b gene sequence: a comparison between ancient Sardinian sheep and current domestic sheep and moufflons*

Riassunto - Lo scopo di questo lavoro è quello di fare luce sull'origine e sull'evoluzione storica degli ovini sardi studiando un tratto della sequenza genica del citocromo b. Il gene per il citocromo b è localizzato nel DNA mitocondriale ed è particolarmente utile nella ricostruzione delle distanze genetiche tra gli animali e negli studi sul DNA antico. Il materiale era composto da denti di ovino provenienti da diversi siti archeologici sardi di età eneolitica (V-IV mill. BP), nuragica (III mill. BP) e tardo-romana (II-III sec. d.C). Il DNA antico è stato estratto e un corto segmento del gene per il citocromo b (130-170 bp) è stato amplificato mediante specifici primers, sequenziato e allineato in modo da essere comparato con l'analogica sequenza di ovini sardi attuali, cioè la pecora Sarda, la pecora nera di Arbus e il muflone. Le sequenze ottenute sono compatibili, per tutti gli individui studiati, con una loro attribuzione a ciascuno dei due aplogruppi (A e B) ampiamente diffusi in ovini domestici moderni. Lo studio ha evidenziato che il tratto di DNA mitocondriale analizzato è risultato essere conservato dagli ovini preistorici ad oggi.

*Summary - The cytochrome b gene is located in mitochondrial DNA and constitutes an attractive target in reconstructing genetic distances among animals and in ancient DNA studies. The material was composed of ovine teeth from different Sardinian archaeological settlements, dating back to Eneolithic (V-IV mill BP), Nuragic (III mill BP) and late Roman (2nd-3rd cent AD) period. Ancient DNA was extracted and a short cytochrome b gene fragment (130-170 bp) was amplified with specific primers, sequenced and aligned to be compared to current Sardinian sheep, i.e. domestic Sarda and black Arbus sheep and moufflons. On account of the sequence alignments, sheep and moufflons could be included in the widest haplogroups (A or B). On the base of our results it seems the mitochondrial DNA sequence analysed is preserved during the time.*

Parole chiave: DNA antico, Citocromo b, Pecora, Muflone, Sardegna

*Key-words: Ancient DNA, Cytochrome b, Sheep, Moufflon, Sardinia*

## **INTRODUZIONE**

L'allevamento degli ovini in Sardegna rappresenta il volano dell'economia agro-pastorale e del settore industriale caseario. In generale, nelle società preistoriche, gli ovini sono stati in grado di fornire vestiario, carni, latte e lana (in tempi successivi e grazie a differenti razze), con scarse esigenze nella tipologia del pascolo, caratteristiche che li hanno portati ad essere tra gli animali da allevamento più diffusi (Rocha *et al.* 2011). L'esigenza di avere capi sempre più produttivi o capaci di fornire lana piuttosto che carne, ha fatto sì che venissero effettuati continui incroci e movimentazioni di greggi o di riproduttori.

Lo scopo di questo lavoro è quello di fare luce

sull'origine e sull'evoluzione storica degli ovini sardi studiando un tratto della sequenza genica del citocromo b. I primi resti di ovino descritti in Sardegna sono quelli trovati in varie località del Neolitico antico (VII mill. a.C.), tra cui la Grotta Filiestru (Levine 1983) e la Grotta Corbeddu (Sanges 1987) ma poco si sa sulle caratteristiche morfologiche di quegli animali. Ciò dipende principalmente dal fatto che i resti sono frequentemente molto frammentati. Nei periodi successivi la presenza di resti di ovino rappresenta quasi sempre una costante di tutte le località archeologiche in cui sono stati trovati resti animali e ciò conferma l'importanza del ruolo economico avuto da questa specie nel corso del tempo in

Sardegna. Le vicende che hanno contraddistinto la storia evolutiva degli ovini in Sardegna non può non tener conto del problema dell'origine del muflone sardo. Le prime ipotesi formulate per spiegare la sua origine davano per scontato che il muflone sardo attuale fosse il discendente di popolazioni autoctone di mufloni pleistocenici da sempre vissuti nell'isola (Cherchi Paba 1974). Questa teoria, in auge sino agli anni '70 dello scorso secolo, è stata completamente confutata sulla base dei dati archeozoologici e delle conoscenze zoogeografiche accumulate negli ultimi decenni. E' ormai dato per certo che gli ovini sono stati introdotti dall'uomo sin dal Neolitico antico nell'ambito di un vasto processo di colonizzazione delle grandi isole del Mediterraneo durante il quale sono state introdotte la maggior parte delle specie di animali domestici (Masseti 2002; Vigne 1988). Il nodo del problema è se i mufloni si siano originati per rinselvatichimento dai primi ovini domestici importati nel Neolitico (Poplin 1979) oppure se i mufloni siano stati importati come ovini selvatici durante il processo di neolitizzazione delle isole mediterranee e poi da questi siano originati ovini resi domestici e incrociati con altri ovini domestici importati successivamente.

Al fine di valutare meglio i processi che hanno caratterizzato il popolamento e la distribuzione degli ovini, è molto utile l'approccio basato sull'analisi del DNA mitocondriale (mtDNA), la cui diversità potrebbe svelare le tappe evolutive degli ovini sardi, domestici e selvatici, dalla preistoria ad oggi. Per queste valutazioni abbiamo preso in considerazione, oltre a resti di ovini preistorici, gli ovini sardi attuali e cioè il muflone, la pecora di razza Sarda e la pecora nera di Arbus. In questo lavoro abbiamo focalizzato l'attenzione su una specifica porzione del mtDNA. E' noto che i mitocondri sono degli organelli specializzati nella respirazione cellulare. Ogni cellula contiene da poche centinaia fino ad oltre 10.000 copie di DNA mitocondriale ed il suo genoma contiene circa 16.000 paia di basi (bp) codificanti per 37 geni comprendenti 2 RNA ribosomiali (rRNA), 22 RNA di trasporto (tRNA) e 13 proteine. Il numero di geni presenti sul DNA mitocondriale e la sua lunghezza sono variabili, a seconda delle specie; i valori sopra citati si riferiscono al DNA mitocondriale di *Homo sapiens*, non molto differente in lunghezza da quello di *Ovis aries*, oggetto del nostro studio. Negli insetti, ad esempio, il DNA mitocondriale di

*Drosophila* ha una lunghezza di circa 18.000 bp, nei funghi, quello di *Neurospora crassa* è di circa 60.000 bp, mentre di tutt'altra scala di grandezza risulta il DNA mitocondriale delle piante, che arrivano a lunghezze comprese tra le 250.000 ed i 2 milioni di paia di basi.

Una caratteristica che rende particolarmente utile il mtDNA per analisi di tipo filogenetico nei vertebrati è la modalità di trasmissione; infatti, questo viene ereditato esclusivamente per via materna (eredità matrilineare) e non soggetta quindi a ricombinazione, come invece succede per il DNA nucleare (nDNA). Gli scarsi meccanismi di riparazione del mtDNA, inoltre, lo rendono facilmente danneggiabile e con un tasso di mutazione di circa dieci volte maggiore di quello nucleare, dando vita a polimorfismi che permettono di stimare una certa variabilità a distanza di poche generazioni, anche tra madre e figli in certe regioni ipervariabili ed, in certi casi limite, all'interno di uno stesso individuo.

Mentre gran parte dei polimorfismi sono facilmente rilevabili con poche incertezze nel mtDNA moderno, gli studi su quello antico presentano un numero consistente di problematiche, seppure le tecniche di indagine (Margulies *et al.* 2005; Millar *et al.* 2008; Rizzi *et al.* 2012) abbiano fatto dei passi in avanti soprattutto grazie ai sequenziatori di nuova generazione (*Next Generation Sequencing - NGS*). Le difficoltà nell'analisi del DNA antico sono tante e tali che Cooper e Poinar nel 2000, hanno pubblicato sulla rivista *Science* il famoso articolo "Ancient DNA: do it right or not at all" (Cooper, Poinar 2000) in cui ammonivano come in questo delicato campo fosse necessario adottare una serie di precauzioni e protocolli di analisi molto stringenti. Infatti, tra le problematiche nell'analisi del DNA antico, oltre alla contaminazione da DNA moderno (Krause 2010), si può avere l'errata incorporazione di nucleotidi durante la reazione di PCR (*Polymerase Chain Reaction*) conseguente a fenomeni di deaminazione.

## MATERIALI E METODI

In questo lavoro abbiamo standardizzato una tecnica di estrazione che ci permettesse di ottenere DNA antico non eccessivamente degradato da resti di *Ovis aries*, testandolo poi attraverso il design e l'uso di primers adatti per amplificare una porzione del mtDNA. Il DNA antico è stato estratto da denti di

ovino provenienti da diversi siti archeologici sardi di età eneolitica (V-IV mill. BP), nuragica (III mill. BP) e tardo-romana (II-III sec. d.C), mentre per il DNA moderno i campioni sono stati raccolti da animali in cura presso il Dipartimento di Medicina Veterinaria dell'Università di Sassari. Gli ovini più antichi, tra quelli analizzati (Tab.1), sono quelli del villaggio eneolitico di Su Coddu (Selargius), insediamento di pescatori e raccoglitori in cui sono stati rinvenuti anche numerosi resti di animali domestici (Melis *et al.* 2012). Il sito, particolarmente importante perché è uno dei pochi in cui è stato eseguito uno studio multidisciplinare completo, è stato datato a 2500 anni a.C. (Melis *et al.* 2007). Gli ovini nuragici sono quelli provenienti dal nuraghe Iloi (Sedilo) (Tanda *et al.* 2012) e dal villaggio nuragico di Sa Osa (Cabras) (Usai *et al.* 2009). Gli ovini tardo-romani del II-III sec d.C. sono quelli del sito prospiciente l'antico porto di Karalis (Zedda *et al.* 2005). Tutte le datazioni riportate sono state ottenute mediante il metodo al radiocarbonio o con metodo stratigrafico. Da ogni sito sono stati presi in considerazione 4 denti integri. Questi sono stati ripuliti e trattati con radiazioni UV e con ipoclorito di sodio per eliminare il DNA esogeno presente sulle superfici. Successivamente i denti sono stati processati sotto cappa sterile a flusso laminare e finemente sminuzzati con strumenti dedicati. I campioni polverizzati sono stati sottoposti ad estrazione del DNA nei laboratori per lo studio del DNA antico allestiti nella sezione di Anatomia del nostro Dipartimento. Il DNA antico è stato estratto attraverso una tecnica (Rohland, Hofreiter 2007) che ci ha permesso di massimizzare la quantità di DNA utile per le amplificazioni (PCR), minimizzare l'estrazione parallela di inibitori della PCR, e ottimizzare i tempi di estrazione a 2 giorni lavorativi. Il DNA degli ovini moderni è stato estratto mediante kit *Gene-elute* (Sigma) da sangue prelevato da due mufloni, da due pecore di razza Sarda e da due pecore nere di Arbus. La razza Sarda è una pecora dal mantello bianco ampiamente diffusa in tutta l'isola ed è caratterizzata da prevalente attitudine alla produzione latte. La razza nera di Arbus è una pecora dal mantello nero e caratterizzata dal possedere padiglioni auricolari piccoli; è considerata di origini antichissime ma attualmente ha rischiato l'estinzione a causa della sua scarsa consistenza numerica e della localizzazione geografica molto ristretta, il territorio di Arbus, che ha dato il nome alla razza.

La sequenza per il citocromo b è compresa tra le basi 14.159 e 15.298 del mtDNA ed è lungo questa regione che abbiamo disegnato un set di primers mediante il software Primer3 (Rozen, Skaletsky 2000) (Tab.2). Questi primers sono stati testati e hanno consentito l'amplificazione di un corto segmento (130-170 bp)

del gene. Nei laboratori per il DNA antico in cui i campioni di ovino sono stati estratti (sotto cappa *Genesphere UV100 - SAFETECH®*) ed amplificati (sotto cappa *ASALAIR® Vertical 700*) in ambienti dotati di sterilizzatori dell'aria (*BIOSAN® UVR-M, UV-cleaner recirculator*), nessun tipo di campione moderno di *Ovis aries* aveva mai stazionato o era stato in nessun modo manipolato. Un'ulteriore analisi sugli stessi campioni è stata eseguita in un laboratorio situato in altro edificio dell'Università di Sassari, il Dipartimento di Scienze della Natura e del Territorio, adottando gli stessi protocolli. La mix per la PCR (20 µl volume) con Taq (*FINNXYMES® Phusion*), è stata composta seguendo le aliquote e le concentrazioni illustrate nel manuale d'uso ed è stata miscelata per ciascun campione con circa 20 ng di DNA genomico. L'amplificazione è stata eseguita in un termociclatore (*BIOMETRA® "T Personal"*), programmato per 1 ciclo di 1 min at 94°C, 35 cicli di 1 min a 58°C ed 1 min a 72°C. Alla fine dei cicli l'estensione finale è stata di 60°C per 60 min per completare le eventuali amplificazioni parziali ed infine è stata conservata a 4° C. Gli ampliconi sono stati sequenziati tramite servizio esterno (*BMR Genomics*) e allineati mediante il software Clustal W Multiple alignment (Thompson *et al.* 1994), implementato in BioEdit7.1.3.0 (Hall 1999). Oltre agli ovini sardi attuali sono state allineate e confrontate anche 32 sequenze scaricate da *GenBank* e appartenenti ai vari aplogruppi (A, B, C, D, E).

## RISULTATI E CONCLUSIONI

Come ricordato nell'introduzione, tutti i lavori sul DNA antico (aDNA) dimostrano che il trattamento e l'analisi di campioni antichi è un lavoro lungo e pieno di possibili capitolazioni, per cui è importante valutare tutte le implicazioni prima di iniziare tali imprese. Il presente lavoro ha richiesto due anni di prove e controprove, permettendoci di acquisire un'esperienza consolidata nel campo, al prezzo di un notevole impegno di risorse economiche ed umane oltre a vincolare ampi spazi ad uso esclusivo degli operatori sul aDNA, per via dei rischi d'inquinamento del materiale genetico. Tra le diverse coppie di primers testate, quelle più performanti hanno amplificato un tratto del gene codificante per il citocromo b, che è particolarmente adatto alla ricostruzione della discendenza mitocondriale degli animali da allevamento, in quanto il suo pattern evolutivo è stato ampiamente studiato ed è relativamente costante nella maggior parte dei mammiferi (Irwin *et al.* 1991), tanto negli studi sul DNA moderno che su quello antico (Fernández *et al.* 2006).

I risultati ottenuti nei due laboratori sono

corrispondenti.

I risultati finora ottenuti ci permettono di affermare che nel breve tratto sequenziato non vi sono mutazioni con anomali eccessi di A e T imputabili a fenomeni di deaminazione.

Le sequenze da noi ottenute sono state messe a confronto con quanto presente in letteratura fino a questo momento (Tab.1). Recentemente infatti, sequenziando l'intero genoma mitocondriale di sedici esemplari di ovini (pecore e mufloni) moderni, oltre agli aplogruppi noti (A, B, C), sono stati descritti due ulteriori aplogruppi (D, E) (Meadows *et al.* 2011). Mentre gli aplogruppi A e B sono diffusi in tutto l'areale di distribuzione di *Ovis aries*, il gruppo C è il più raro e ha una distribuzione limitata ad alcune zone dell'Asia, della Mezzaluna fertile e della penisola iberica. I due nuovi aplogruppi (D e E) invece sono stati ritrovati esclusivamente in Turchia e nel Caucaso.

Le nostre analisi, seppure su un tratto breve del gene tra le 132 e le 170 bp, comprese tra le basi 14.896 e 15.107, ci permettono di formulare alcune considerazioni, in quanto non vi sono all'interno della sequenza mutazioni caratteristiche degli aplogruppi C (Pedrosa *et al.* 2005), D ed E (Meadows *et al.* 2007) che differiscono dai nostri individui per alcune transizioni individuate nelle posizioni 14.893 C→T (aplog. C) - 14.971 A→G (aplog. C ed E) - 14.983 T→C (aplog. D) - 15.097 G→A (aplog. C ed E). L'assenza di questi polimorfismi fa supporre che gli individui da noi analizzati possano appartenere agli aplogruppi A o B, come già menzionato, i più diffusi lungo tutto l'areale di distribuzione della specie *Ovis aries*, inoltre il fatto che i due campioni di *Ovis musimon* risultino privi degli stessi polimorfismi è in linea con la sua stretta correlazione filogenetica con l'aplogruppo B rilevata da Pedrosa (2005). Con questo lavoro viene pertanto confermata la validità nell'impiego delle sequenze della citocromo b per capire le relazioni filogenetiche degli ovini, viene evidenziato come gli ovini, domestici e selvatici in Sardegna siano altamente conservati sotto il profilo genetico essendo esclusa la presenza degli aplogruppi C, D ed E. Si rileva tuttavia che per stabilire con maggiore precisione l'origine del muflone sardo e cioè poter rispondere al quesito iniziale se siano stati i mufloni i progenitori delle pecore domestiche preistoriche o viceversa, il tratto genico esaminato risulta troppo piccolo e sarebbe più utile estendere lo studio anche ad altri tratti del citocromo b.

## RINGRAZIAMENTI

Ricerca finanziata dalla Fondazione Banco di Sardegna.

Sigla	Aplogruppo	Provenienza	Periodo
ar2rx**	unknown	Sardegna	moderno
arb1rx**	unknown	Sardegna	moderno
cfx+crx**	unknown	Sardegna	nuragico
corfx+corr**	unknown	Sardegna	moderno
H-ales**	unknown	Sardegna	moderno
K-ales**	unknown	Sardegna	.romano imperiale
L-ales**	unknown	Sardegna	nuragico
S-ales**	unknown	Sardegna	eneolitico
mufrx**	muflone	Sardegna	moderno
mumrx**	muflone	Sardegna	moderno
AF010406.1*	B	Germania	moderno
DQ097408.1* - KAR13	B	Turchia	moderno
DQ097409.1* - HEM13	B	Turchia	moderno
DQ097410.1* - HEM06	B	Turchia	moderno
DQ097411.1* - TUJ11	B	Turchia	moderno
DQ097412.1* - AKA02	B	Turchia	moderno
DQ097413.1* - TUJ12	B	Turchia	moderno
DQ097414.1* - TUJ08	B	Turchia	moderno
HM236177.1* - kk2	B	Turchia	moderno
DQ097416.1* - KAR09	A	Turchia	moderno
DQ097417.1* - KAR04	A	Turchia	moderno
DQ097418.1* - MOR04	A	Turchia	moderno
DQ097419.1* - MOR02	A	Turchia	moderno
DQ097420.1* - MOR09	A	Turchia	moderno
DQ097421.1* - MOR11	A	Turchia	moderno
DQ097422.1* - MOR13	A	Turchia	moderno
HM236174.1* - cl122	A	Australia	moderno
HM236175.1* - r359	A	Australia	moderno
DQ097423.1* - AKA06	C	Turchia	moderno
DQ097424.1* - HEM01	C	Turchia	moderno
DQ097425.1* - KAR02	C	Turchia	moderno
DQ097426.1* - AKA07	C	Turchia	moderno
DQ097427.1* - AKA10	C	Turchia	moderno
DQ097428.1* - HEM12	C	Turchia	moderno
DQ097429.1* - MOR12	C	Turchia	moderno
HM236178.1* - kk12	C	Turchia	moderno
HM236179.1* - mk4	C	Turchia	moderno
HM236185.1* - h2	muflone	Germania	moderno
HM236180.1* - mk3	D	Turchia	moderno
HM236181.1* - mk9	D	Turchia	moderno
HM236182.1* - aw25	E	Israele	moderno
HM236183.1* - tj6	E	Turchia	moderno

**Tabella 1.** Elenco dei campioni le cui sequenze sono state utilizzate per il nostro studio: \*Genbank accession number; \*\*Campioni estratti ed analizzati nei nostri laboratori.

Nome	Sequenza - 5'
Cyt b Forward	ACGTCGATACACGGGCTTAC
Cyt b Reverse	AGCCTCCGACTGTGAAAAGA
Cytb ales F	TTCATTGTATGAGCCCACCA
Cytb ales R	AGCCTCCGACTGTGAAAAGA

**Tabella 2.** Primers utilizzati per amplificare la porzione del citocromo b studiata.

## BIBLIOGRAFIA

- F. CHERCHI PABA 1974, *Evoluzione storica dell'attività industriale Agricola caccia e pesca in Sardegna*, Volume I. Regione Autonoma della Sardegna, Cagliari.
- A. COOPER, H. N. POINAR 2000, *Ancient DNA: Do it right or not at all*, «Science», 289, p. 1139.
- H. FERNÁNDEZ, S. HUGHES, J. D. VIGNE, D. HELMER, G. HODGINS, C. MIQUEL, C. HÄNNI, G. LUIKART, P. TABERLET 2006, *Divergent mtDNA lineages of goats in an Early Neolithic site, far from the initial domestication areas*, «Proceedings of the National Academy of Sciences», 42, pp. 15375–15379.
- T. A. HALL 1999, *BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT*, «Nucleic Acids Symposium Series», 41, pp. 95-98.
- D. M. IRWIN, T. D. KOCHER, A. C. WILSON 1991, *Evolution of the cytochrome b gene of mammals*, «Journal of Molecular Evolution», 32, pp. 128–144.
- J. KRAUSE, A. W. BRIGGS, M. KIRCHER, T. MARICIC, N. ZWYNS, A. DEREVIANKO, S. PÄÄBO 2010, *A complete mtDNA genome of an early modern human from Kostenki, Russia*, «Current Biology», 20, pp. 231–236.
- M. LEVINE 1983, *La fauna di Filiestru (trincea D)*, in D.H. Trump, *La Grotta di Filiestru a Bonu Ighinu (Mara, Sassari)*, «Quaderni della Soprintendenza Archeologica di Sassari e Nuoro», Sassari, pp. 11-131.
- M. MARGULIES, M. EGHOLM, W. E. ALTAM, S. ATTIYA, J. S. BADER, L. A. BEMBEN, J. BERKA, M. S. BRAVERMAN, Y. J. CHEN, Z. CHEN 2005, *Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors*, «Nature», 437, pp. 376–380.
- M. MASSETI 2002, *Uomini e (non solo) topi. Gli animali domestici e la fauna antropocora*. University Press, Firenze.
- J. R. S. MEADOWS, I. CEMAL, O. KARACA, E. GOOTWINE, J. W. KIJJAS 2007, *Five Ovine Mitochondrial Lineages Identified From Sheep Breeds of the Near East*, «Genetics», 3, vol. 175, pp. 1371-1379.
- J. R. S. MEADOWS, S. HIENDLEDER, J. W. KIJJAS 2011, *Haplogroup relationships between domestic and wild sheep resolved using a mitogenome panel*, «Heredity», 106, pp. 700–706.
- M. G. MELIS, G. QUARTA, G. CALCAGNILE, M. D'ELIA 2007, *L'inizio dell'Età del Rame in Sardegna. Nuovi contributi cronologici*, «Rivista di Scienze preistoriche», LVII, pp. 185-200.
- M. G. MELIS, L. MANCA, M. ZEDDA 2012, *Marine and Inland Water Resources in Eneolithic Communities. New Data from Sardinia (Italy)*, «Journal of Life Sciences», 6 (6), pp. 679-693.
- C. D. MILLAR, L. HUYNEN, S. SUBRAMANIAN, E. MOHANDASAN, D. M. LAMBERT 2008, *New developments in ancient genomics*, «Trends in Ecology & Evolution», 23, pp. 386–393.
- S. PEDROSA, M. UZUN, J. J. ARRANZ, G. B. GUTIÉRREZ, F. SAN PRIMITIVO, Y. BAYÓN 2005, *Evidence of three maternal lineages in near eastern sheep supporting multiple domestication events*, «Proceedings of the Royal Society B», 272, pp. 2211–2217.
- F. POPLIN 1979, *Origine du Mouflon de Corse dans une nouvelle perspective paléontologique: par marronnage*, «Annales de génétique et de sélection animale», 11(2), pp. 133–143.
- E. RIZZI, M. LARI, E. GIGLI, G. DE BELLIS, D. CARAMELLI 2012, *Ancient DNA studies: new perspectives on old samples*, «Genetics Selection Evolution», 44, pp. 21.
- J. ROCHA, S. CHEN, A. BEJA-PEREIRA 2011, *Molecular evidence for fat-tailed sheep domestication*, «Tropical Animal Health and Production», 43, pp. 1237–1243.
- N. ROHLAND, M. HOFREITER 2007, *Ancient DNA extraction from bones and teeth*, «Nature Protocols», Vol. 2 - Issue 7, pp. 1756–1762.
- S. ROZEN, H. SKALETSKY 2000, *Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers*, in S. KRAWETZ, S. MISENER (eds), *Bioinformatics Methods and Protocols:*

- Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 365–386.
- M. SANGES 1987, *Gli strati del Neolitico antico e medio nella Grotta Corbeddu di Oliena (NU)*, Atti della XXVI Riunione scientifica “Il Neolitico in Italia”, Firenze, 7-10 novembre 1985, pp. 825-830.
- G. TANDA, P. MULÈ, M. ZEDDA 2012, *Le strutture 6 e 7 del villaggio nuragico di Iloi (Sedilo)*, Atti XLIV Riunione Scientifica dell’Istituto Italiano di Preistoria e Protostoria, Cagliari, 23-28 novembre 2009, Firenze, vol. 3, pp. 877-884.
- J. D. THOMPSON, D. G. HIGGINS, T. J. GIBSON 1994, *CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice*, «Nucleic Acids Research», 22, pp. 4673–4680.
- A. USAI, S. SEBIS, A. DEPALMAS, R. T. MELIS, M. ZEDDA, G. CARENTI, S. CARUSO, G. CASTANGIA, V. CHERGIA, L. PAU, I. SANNA, S. SECHI, P. F. SERRELI, L. SORO, S. VIDILI, A. ZUPANCICH 2009, *L’insediamento nuragico di Sa Osa (Cabras – OR)*, Atti XLIV Riunione Scientifica dell’Istituto Italiano di Preistoria e Protostoria, Cagliari, 23-28 novembre 2009, Firenze, vol. 3, pp.1–12.
- J. D. VIGNE 1988, *Les mammifères post-glaciaires de Corse, Etude archéozoologique*, «Supplément a Gallia Préhistoire», 26, pp. 1–337.
- M. ZEDDA, P. MANCA, G. LEPORE, S. GADAU, V. FARINA 2005, *Lo studio dei resti faunistici per la ricostruzione dell’ambiente di vita*, in AA.VV. (a cura di), *Il Quartiere di Marina a Cagliari, ricostruzione di un contesto urbano pluristratificato*, Edicom Editore, Monfalcone, pp. 159–190.