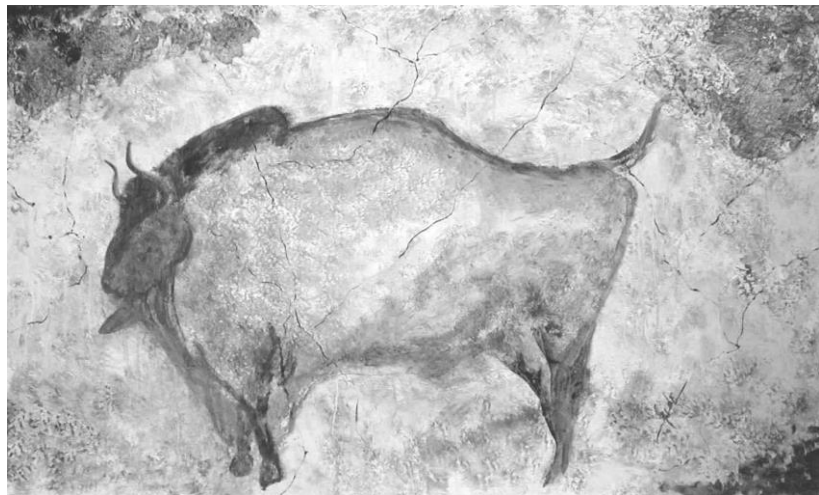


**DOTTORATO DI RICERCA IN
ETOLOGIA, ECOLOGIA ANIMALE ed
ANTROPOLOGIA
(XXV CICLO)**

**“La domesticazione di specie antropocore:
analisi della variabilità genetica nei bovini
italiani antichi”**

Tesi di

Antonella Lannino



**Coordinatore Prof. Alberto Ugolini
Tutor Prof. David Caramelli**

(2013)





UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE

DOTTORATO DI RICERCA IN IN ETOLOGIA,
ECOLOGIA ANIMALE ed ANTROPOLOGIA
CICLO XXV

COORDINATORE Prof. Alberto Ugolini

*"La domesticazione di specie antropocore:
analisi della variabilità genetica nei bovini
italiani antichi"*

Settore Scientifico Disciplinare BIO 05/ BIO 07

Dottorando

Dott. (*Antonella Lannino*)

Tutore

Prof. (*David Caramelli*)

Coordinatore

Prof. (*Alberto Ugolini*)

Anni 2010/2013

INDICE

Indice	Pag.1
Abstract	Pag. 2
1 Introduzione	Pag. 4
1.1 Da bisonti a buoi verso la colonizzazione del mondo	Pag. 4
1.2 La domesticazione dei bovini quando e come	Pag. 12
1.2 L'importanza dello studio della diversità genetica	Pag. 12
1.4 Lo studio degli aplotipi mitocondriali applicato agli studi sulla domesticazione	Pag.16
2 Cos'è il DNA mitocondriale	Pag. 20
2.1 DNA antico o meglio DNA degradato?	Pag. 21
2.2 Principali caratteristiche del DNA	Pag. 21
3 Introduzione alle NGS	Pag. 24
4 Scopo del progetto di dottorato	Pag. 32
5 Materiali e metodi	Pag. 34
5.1 Pulizia dei campioni	Pag. 35
5.2 Estrazione con adsorbimento su silica	Pag. 36
5.3 Amplificazione del DNA	Pag. 38
5.4 Tecniche tradizionali ed NGS	Pag. 40
5.4.1 Costruzione <i>libraries</i>	Pag. 40
5.4.2 PCR emulsionale	Pag. 45
5.4.3 Sequenziamento ultramassivo tramite piattaforma Roche 454	Pag. 47
5.4.4 Mappaggio dei dati della corsa su FLX 454	Pag. 48
6 Analisi classiche con FST ed MSD più Network	Pag. 52
6.1 Analisi statistiche dei dati	Pag. 52
6.2 Analisi a livello intrapopolazionistico	Pag. 52
6.3 Struttura genetica della popolazione	Pag. 44
6.4 Stima delle distanze genetiche tra sequenze nucleotipiche secondo il metodo Kimura 2 Parametri	Pag. 54
6.5 Analisi a livello interpopolazionistico	Pag. 56
6.6 Median Joining Network	Pag. 56
6.7 Metodo Neighbor-Joining	Pag. 57
6.8 MDS (Multidimensional Scaling)	Pag. 57
7 Risultati	Pag. 60
7.1 Numero di sequenze ottenute ed analisi svolte	Pag. 60
7.2 Analisi a livello intrapopolazionistico	Pag. 62
7.2.1 Indici di diversità standard e genetica	Pag. 62
7.3 Rappresentazione delle distanze genetiche tra sequenze	Pag. 64
8 Analisi a livello interpolazionistico	Pag. 66
9 Discussione sui risultati e conclusioni	Pag. 70
Tabella campioni totali	Pag.73
Bibliografia	Pag. 91
Ringraziamenti	Pag. 102

Referenze fotografiche:

Tutte le foto presenti in questa tesi sono da attribuire all'archivio storico Pubbliphoto Palermo.

Abstract

The domestication of grazing species is a fundamental part of the neolithization, the formation of modern productive society. The species that has aroused more interest in the scientific world, both for its particular morpho-ethological behaviour, both for the importance it has played in our understanding of the spread of agriculture and livestock in Europe, is definitely the domestic ox, *Bos taurus* (Harris, 1996). In recent years, the domestication of cattle has been the subject of multidisciplinary studies that have developed a point of connection between archeology and genetics (Catalano et al., 2007). The socio-cultural changes produced by the advent and spread of the earliest forms of pastoralism, documented by archaeological studies are completed through a molecular genetic approach. Recent studies (Troy et al., 2001; Bradley 2006), based on comparison of mitochondrial sequences from a large representative sample of the different breeds of cattle, have identified the region of the Fertile Crescent the center of origin of all variants present today in Europe, thus confirming the hypothesis suggested in the past by numerous archeological findings (Diamond et al., 2002). Some authors (Epstein, 1971) argue, however, that the wide spread of the wild ox in the forest areas of Europe does not exclude the possibility of its independent domestication in these regions. Basing on these assumptions and on data that in recent years have revealed a clear genetic discontinuity in Europe between the ancestral species and modern races (Bollongino et al., 2006; Edwards et al., 2007), we performed analyzes on Italian cattle (post-domestication Neolithic period).

Aims of project were:

- analyze the "gap" between genotypic cattle, going to cover, with the comparison between samples of the Upper Paleolithic and Neolithic, Italians and Europeans, the post-domestication (Neolithic and Bronze Age);
- compare the data obtained from a large number of modern cattle to understand if the current populations derive from the effects of local or imported from the domestication of Neolithic populations (farmers / breeders);

All this in order to add useful information about the process of domestication of cattle breeds in Italy and in Europe.

The study haplotype T3 that characterize the Neolithic *Bos taurus* samples of this thesis was found in Europe in samples dated in a pre-domestication period, and is the most frequent haplogroup in modern samples, suggesting that there may have been two events of domestication: a local one in Europe (in particular in Italy) and another in the Near East regardless of Neolithic migration.

1. INTRODUZIONE

1.1 Da bisonti a buoi verso la colonizzazione del mondo.

Nel Neolitico (VI-IV millennio a.C.) l'uomo diventa stanziale: sorgono i primi villaggi, si cominciano a coltivare alcune specie vegetali e ad addomesticare quelle animali.

La domesticazione nella storia dell'uomo è un processo molto dibattuto sia in campo biologico che archeologico inoltre è concettualmente complesso in quanto gli esseri umani cominciano a ritenere più utile dell'animale "morto", come immediata fonte di cibo, sfruttare lo stesso "vivo" a fini produttivi come sostentamento prolungato e prolungabile nel tempo attraverso l'allevamento dell'animale e della sua prole. (Meadow, 1984).

Il processo di ammansimento e domesticazione degli animali selvatici non è immediato ma piuttosto è un processo "step by step", pieno di piccoli cambiamenti ed errori, che coinvolgono le mandrie di bestiame che intraprendono una relazione di tipo mutualistico con l'uomo.



Fig.1.1 Incisioni rupestri rappresentanti bovini nelle grotte dell'Addaura a Palermo.

La Domesticazione dei bovini , e di altri animali , ha permesso lo sviluppo di una cultura di "produzione", dell'agricoltura e rappresenta un punto di svolta nella storia dell'umanità . Popolazioni nomadi di

cacciatori-raccoglitori sono state trasformate in società agricole stanziali , in cui la sicurezza e la relativa abbondanza di cibo ha consentito la crescita della popolazione .

Le società pastorali hanno sfruttato la capacità di bovini, pecore e capre di nutrirsi di erba e fogliame; di conseguenza il bestiame è diventato la principale fonte di latte , carne e pelli. I potenti tori allevati vennero anche rivestiti di potere magico nelle cerimonie religiose (fig.1.2)



fig.1.2 Rilievi a testimonianza del dio toro alle “Domus de Janas”, vicino Alghero in Sardegna

Allevare mandrie e greggi , infatti richiede manodopera per il pascolo , spazi per alloggiare , e custodire . Probabilmente, questo può aver contribuito ad una distribuzione non uniforme delle attività e risorse nelle prime organizzazioni delle società umane . Il bestiame Neolitico era più piccolo dei bisonti selvatici locali e le dimensioni hanno continuato a diminuire fino al Medioevo (fig.1.3).

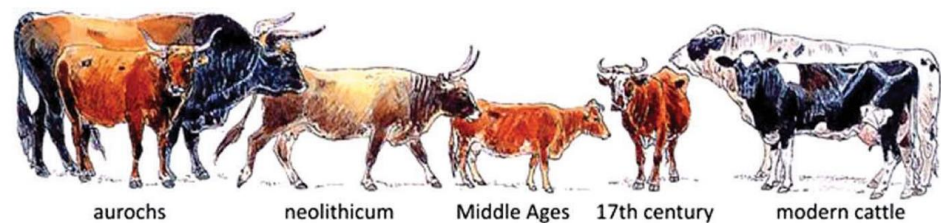


Fig.1.3 – differenze nelle dimensioni dei bovini nei vari periodi storici

In breve tempo , i bovini allevati divennero adatti ad ambienti che vanno da verdi pascoli ai deserti sviluppando una grande varietà di fenotipi “visibili” . Grandi corna per combattere divennero inutili e probabilmente si ebbe un mitigamento del carattere aggressivo originario (Clutton-

Brock et al.1999; Hemmer et al.1990). Sorprendentemente, questa non è stata affatto l'ultima fase dell'evoluzione bovina .

L'uro (*Bos primigenius*) era un ruminante erbivoro e brucatore dalle lunghe corna a forma di mezzaluna nei maschi, le fonti iconografiche ci dicono inoltre, che fosse di colorazione bruno scura nel mantello e, nella femmina, una livrea più chiara con corna a forma di lira.

Proprio dall'uro, indiscusso capostipite di tutte le razze bovine viventi, si sarebbero originate due varietà differenti sia da un punto di vista fenotipico (Zeuner, 1963a; Grigson, 1978; 1980; Epstein & Mason, 1984; Payne, 1991) sia, ma con differenze molto meno marcate, da un punto di vista genotipico (Baker & Manwell, 1991).

Esistono quindi due specie, anche se per la completa interfertilità vengono considerate sottospecie: una europea e africana - *Bos taurus* (fig.1.4) - , l'altra esclusivamente asiatica - *Bos indicus* - o zebù. La forma asiatica si distingue morfologicamente da quella europea per la presenza di una gobba adiposa nella zona dorsale e un lembo pendulo, una "giogaia" (fig.1.5).



fig.1.4



fig.1.5

Inoltre tra le due sottospecie sussistono differenze fisiologiche e comportamentali. Con caratteristiche fisiche e genetiche intermedie sono le popolazioni "sanga" dell'Africa meridionale. Riassumendo, l'Europa ha una esclusiva connotazione "taurina", l'Asia una predominante connotazione "gibbata", in Africa, invece, le razze "gibbute" sono un fenomeno più frequentemente rilevato al sud, mentre il contrario avviene al nord.

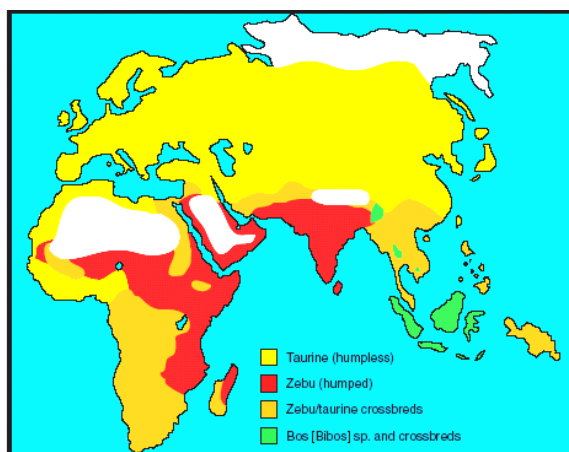


fig.1.6 – diffusione delle varie specie bovine nel mondo (Catalano G., 2006)

Nei tempi preistorici le cose stavano diversamente: il bestiame domestico era presente in Africa almeno 9000 anni fa e a quel tempo nessuna razza aveva la caratteristica gobba. Attorno al II millennio a.C (Payne, 1970) si colloca una prima ingressione di razze “gibbute” attraverso lo stretto di Suez fino alle regioni dell’Africa orientale.

Queste prime introduzioni non avrebbero avuto un impatto significativo sulle native popolazioni “taurine” fino a quando le tribù pastorali realizzarono che la razza asiatica zebù possedeva un migliore adattamento alle condizioni di notevole aridità, rispetto alle razze sprovviste della gobba. Per questo motivo, presumibilmente, gli allevatori contribuirono in maniera sostanziale alla produzione di una razza intermedia, quella “sanga”. Le migrazioni interne delle popolazioni Ottentotte prima (circa 3500 anni fa) e dei Bantu successivamente (circa 700 anni fa) facilitarono la dispersione delle razze “sanga” nelle regioni centrali e meridionali dell’Africa (Epstein, 1971).

Sulle origini delle forme bovine con e senza gobba c’è una discrepanza di vedute; una prima scuola di pensiero identificherebbe in una forma pre-domestica di *Bos taurus*, il progenitore di *Bos indicus* (Epstein, 1971; Epstein & Mason, 1984; Payne, 1991), mentre *Bos taurus* sarebbe una forma evoluta dell’uro asiatico (Epstein & Mason, 1984), il *Bos primigenius namadicus*.

La gran parte degli archeologi, archeozoologi e genetisti si schiera a favore di un’origine indipendente di *Bos indicus*. (Grigson 1978;1980)

ipotizza per *Bos taurus* una discendenza diretta dall'uro eurasiatico (*Bos primigenius primigenius*) mentre per *Bos indicus* una discendenza diretta dall'uro asiatico (*Bos primigenius namadicus*). Questa teoria si basa su comparazioni morfometriche che hanno rivelato una contiguità rispettivamente di *Bos taurus* con il suo antenato europeo e di *Bos indicus* con il suo antenato asiatico. Per la mancanza di dati archeologici a sostegno, sembra poco plausibile una stretta parentela con l'uro africano (*Bos primigenius opisthonomus*).

Nel corso degli ultimi secoli, la differenziazione è stata evidenziata dallo sviluppo di centinaia di razze elaborate per le specifiche esigenze di chi li alleva (fig.1.5.b).



fig. 1.5.b - Principali Razze Bovine Moderne (*Bos taurus*)

Queste sono ora spesso legate alla tradizione locale e percepite come risorse genetiche uniche. Con la selezione fatta dall'uomo, i bovini riacquistano grandi dimensioni, anche se i tori moderni sono ancora di dimensioni minori degli enormi tori-bisonti. Lo sviluppo più recente, spinto da un approccio più industriale alla zootecnia e la globalizzazione della società umana, ha portato ad un ampliamento delle razze più produttive a scapito delle varie razze terrestri tradizionali locali.

La domesticazione è quindi, a tutt'oggi un'attività dell'uomo costantemente e consapevolmente diretta al controllo dei singoli individui, alla selezione della specie ed al controllo della riproduzione tra i singoli individui (Masseti, 2002). L'allevamento del bestiame, unito alle migrazioni umane ha cambiato il corso della storia. È interessante notare che il bestiame ha accompagnato le varie migrazioni delle società

del Vecchio Mondo e ne abbia anche condiviso la sofferenza da calamità naturali, carestie e guerre (fig.1.8a-b).

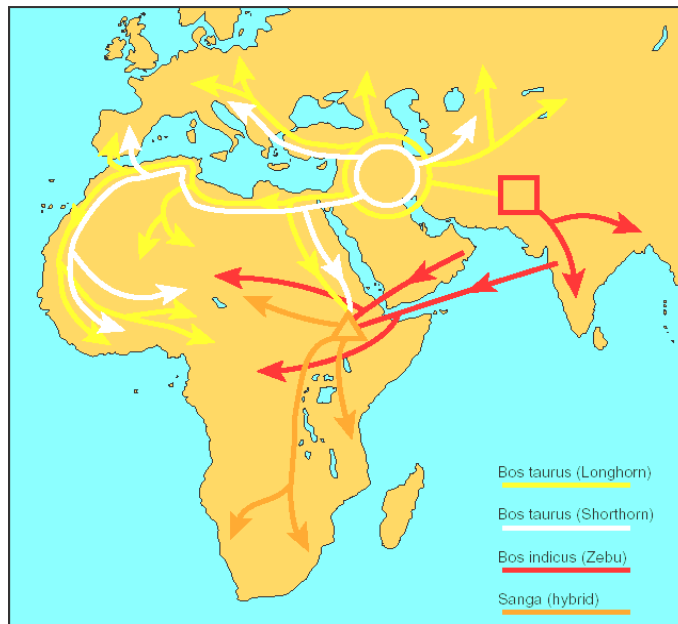
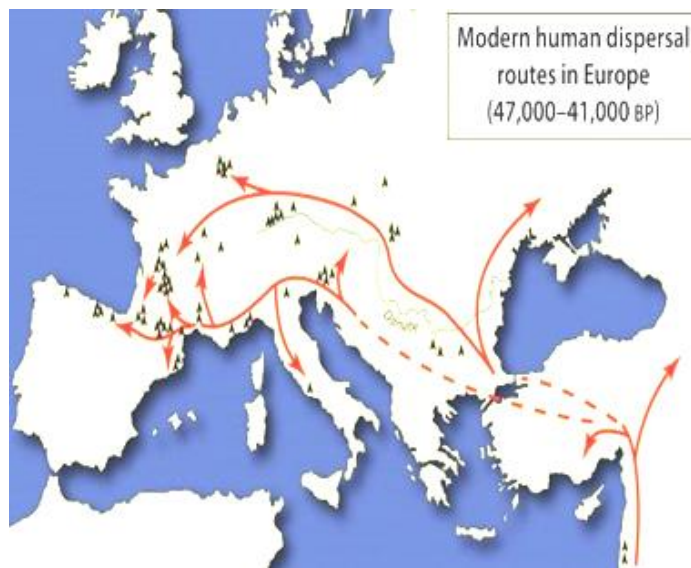


Fig.1.8a e 1.8b (sotto) Principali corridoi di migrazione delle razze bovine, suggerite dall'analisi delle sequenze mitocondriali paragonate con le principali rotte migratorie umane nell'epoca neolitica. Credits: 1.8a Questa rappresentazione grafica è basata sui diagrammi pubblicati da Payne (1970) ed (Epstein e Mason 1984). 1.8b Dora Kemp, McDonald Institute for Archaeological Research.



Tuttavia, la nostra conoscenza ad oggi, della storia di bovini e del bestiame non rende giustizia al loro ruolo nella società. Come conseguenza, la ricostruzione della storia antica del bestiame da allevamento si è basata su rappresentazioni pittoriche, reperti archeologici, e ora, sempre più, sulle analisi del DNA . In questa tesi, descriveremo come la ricerca genetico-molecolare possa integrare gli studi archeologici della definizione dell'evoluzione più recente dei bovini da allevamento.

1.2 La domesticazione nei bovini: quando e come?



Mosaico romano, Piazza Armerina (En)

-dal "De Bello Gallico": "... Questo animale è un po' al di sotto dell'elefante in dimensioni e di aspetto, colore e forma di un toro. Non risparmia né uomo né bestia selvaggia ... anche se quando è presa molto giovane può essere addomesticata."
Giulio Cesare, a proposito dei Bos osservati nella Foresta Nera (Germania meridionale)

Le prime testimonianze archeologiche di bestiame domestico risale dal 8.800 al 8.300 aC nella Mezzaluna Fertile e circa 1.500 anni dopo, nella valle dell'Indo . La prova della presenza di bestiame domestico in Africa 9000 anni fa, è ancora in discussione , ma la loro apparizione nel VI millennio aC nella documentazione fossile africana è ben supportata (Wendorf F, Schild R. 2005). I bovini domestici possono essere fatti risalire al VII millennio aC nel sud-ovest dell' Europa (Kuhn R, et al, 2005) e nel millennio dopo nella parte occidentale , centrale e settentrionale . (Scheu A, et al,2008) Nel nord-est -asiatico la prima datazione per la comparsa del bestiame è del 3.000 aC . (Payne WJA, Hodges J. 1997) Tutti questi risultati cadono all'interno dell'area geografica degli Uri, che possono essere differenziati da bovini dalle dimensioni delle loro ossa . Questi risultati possono ora essere collegati a popolazioni esistenti dalle analisi in campo molecolare dapprima con una valutazione molecolare della divergenza del bestiame taurino , il tipo comune di bestiame nella zona a clima temperato , e zebùino , che tollera meglio gli ambienti caldi e aridi nei climi tropicali .

Come indicato dallo studio del DNA mitocondriale , questa divergenza implica domesticazioni separate di *Bos taurus primigenius* nella Mezzaluna Fertile e *Bos primigenius indicus* nella valle dell'Indo . (Bradley et al., 1998, 2006, Bruford et al., 2003).

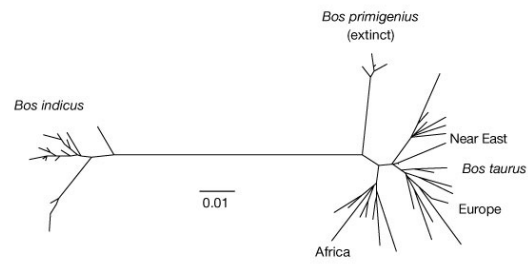


Fig - L'albero filogenetico (neighbor-joining) mostra le distanze tra le razze "gibbute". (*Bos indicus*), le razze "taurine" (*Bos taurus*) e l'uro (*Bos primigenius*). (Troy et al., 2001).

Le più recenti stime del tempo di divergenza tra "taurini" e Zebù sono attualmente in discussione tra stime a 330.000 anni (Achilli et al., 2008) o 2 milioni di anni, (Hiendleder et al., 2008) .

1.3 L'importanza dello studio della diversità genetica



Comprendere la costituzione genetica di popolazioni di bovini è rilevante anche per l'individuazione delle priorità per la conservazione delle risorse genetiche, che sono considerate appartenenti al nostro patrimonio culturale. Molte razze locali sono a rischio di estinzione a causa dell'abbandono dell'agricoltura in aree marginali, della sostituzione con razze cosmopolite, e/o incroci indiscriminati. Tuttavia, la conservazione del patrimonio genetico è un prerequisito per rispondere alle future richieste di mercato o cambiamenti nell'ambiente. Secondo un recente rapporto della FAO, (FAO congress Roma 2007) 209 razze bovine si sono estinte e più di 200 saranno dichiarate in via di estinzione nel prossimo futuro. La maggior parte delle razze estinte (141) erano di origine europea, dove la formazione delle stesse è stata più sistematica, mentre nei paesi in via di sviluppo le differenze tra le popolazioni locali tendono ad essere gradualmente e la documentazione sull'allevamento è spesso scarsa. Una valutazione razionale dei valori di conservazione su base dei dati genetici non è semplice, ma può essere uno dei vantaggi delle prossime tecnologie ecogenomiche, fornendo una migliore comprensione su sfondo genetico della diversità fenotipica.

1.4 Lo studio degli aplotipi mitocondriali applicato agli studi sulla domesticazione

Abbiamo visto che utilizzando il DNA mitocondriale come un orologio molecolare, è stato stimato, per l'antenato comune del cluster europeo e asiatico, un tempo di divergenza tra i 330.000 e due milioni di anni mentre l'antenato comune delle razze europee e africane sembra sia vissuto fra i 22000 e i 26000 anni fa (Bradley et al.,1998).

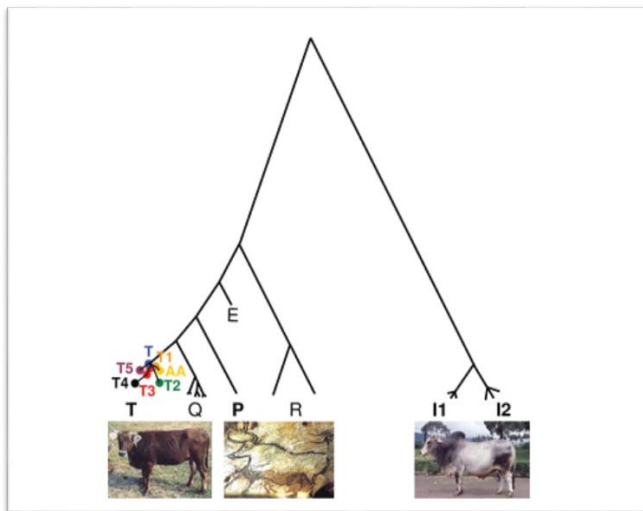


Fig 1.10 - Questo albero filogenetico dà un'idea della profonda divisione tra *Bos indicus* e *Bos taurus*. Alla formazione dell'attuale pool genico delle razze africane "zebù" ha contribuito in maniera predominante il flusso genico paterno entrato con l'introggressione delle razze "gibbute" asiatiche e secondariamente quello materno già presente nelle razze locali "taurine" migrate in tempi più antichi nel continente africano. (Ajmone et al., 2010). P è l'aplogruppo principale che si trova negli uredi europei, l'aplogruppo E è stato trovato in campioni tedeschi. La specie zebuina è caratterizzata dagli aplogruppi I1 e I2. Gli Aplogruppi della specie taurina sono T, da T1 a T5. Tutti questi ad eccezione di T4 e qualche derivato di T1 sono presenti nel sud-ovest asiatico. In Europa, T3 è predominante, mentre in Africa T1 è di gran lunga il più frequente. Aplogruppi Q, P, e R sono stati trovati sporadicamente negli esemplari moderni.

Lo studio del DNA mitocondriale (mtDNA) contribuisce ulteriormente a comprendere l'origine dei siti di domesticazione, e le dinamiche migratorie. (Bradley et al., 1996;). E' generalmente accettato che i moderni bovini da allevamento derivino da due distinti eventi di

domesticazione dell'antico uro (*Bos primigenius*) e che, abbiano avuto luogo nel sud-ovest asiatico e nell'Asia meridionale dando luogo alla specie taurina (*Bos taurus*) e zebuina (*Bos indicus*), [Loftus 1994; Troy 2001] (fig.10). Questa è stata seguita dalla diffusione di allevamenti in tutto il Vecchio Mondo che hanno accompagnato il commercio e migrazioni umane. Tuttavia il *B. primigenius* non era limitato in Asia, era già comune in Nord Africa e in nord Europa, come testimoniato resti scheletrici e pitture rupestri del Paleolitico superiore. Quindi si può ragionevolmente pensare che i periodi di diffusione e di distribuzione per i bisonti selvatici ed il bestiame domestico siano stati sovrapposti per millenni. A partire dal XIII secolo d.C., gli uri selvatici erano estremamente rari e limitati all'Europa nord-orientale, con l'ultimo uro di cui è stata documentata la morte in Polonia nel 1627.

Gli studi sull'mtDNA dei bovini si sono concentrati su un frammento del gene (circa 213-910 paia di basi) della regione di controllo HVR-I di varie razze europee, africane e indiane (Loftus 1994), in totale sono stati definiti 24 aplotipi definiti da 63 siti polimorfici, quelli principali sono indicati dalla seguente **Tab1** e dalla figura **1.12**

Haplogroups	Control-region motifs
T1'2'3	16255 169
T1	16113 16255 169
T2	16057C 16185 16255 169
T3	169
T4	16042 16093 16302 169
T5	16255 163 169
P	15951 15953G 15994 16049 16051 16058 16074 16085 16122 16231 16247 16255 16264 106 173 190 221+c 222 249 300 301
Q	15953G 16255 169
R	15818 15900 15951 15953G 16057 16076 16084 16085 16121 16122 16127 16135 16137 16200+A 16231 16248 16250 16264 16301 8 106 166 173 221+C 234+T 249 296 300

Tab.1 principali aplogruppi con i corrispettivi siti diagnostici (Achilli 2009).

In particolare nel cluster di *B. taurus* sono stati rivelati cinque differenti grandi aplotipi (T * T1-T2-T3-T4) e due in *B. indicus* (I1-I2) [Beja-Pereira 2006; Pellecchia 2007]. Inoltre, dall'analisi della prima regione ipervariabile (HVS-1) è emerso sorprendentemente che le sequenze africane avevano un grado di somiglianza con quelle europee molto alto e entrambe si discostavano decisamente dalle sequenze indiane. Recentemente l'analisi filogeografica dell'mtDNA del bestiame è stata portata al più alto livello di risoluzione molecolare [Achilli 2008, Catalano 2010], mostrando che quasi tutte le sequenze dell'mtDNA taurino moderne appartengono al singolo macro-aplogruppo T, la cui divergenza corrisponde ad una stima del tempo di solo, 16 mila anni (ky). Questo tempo di coalescenza potrebbe indicare un evento "collo di bottiglia" estremamente stretto nella storia evolutiva recente di *B. taurus*. Inoltre, il macro-aplogruppo T mostra una scissione iniziale in due sub-clades sorelle, T5 e eT1'2'3: il sub-clade T1'2'3 predominante è costituito da tre rami principali, corrispondenti agli aplogruppi precedentemente definiti T1, T2 e T3, mentre T4 si rivelò essere inserita all'interno di T3 (Troy 2001).

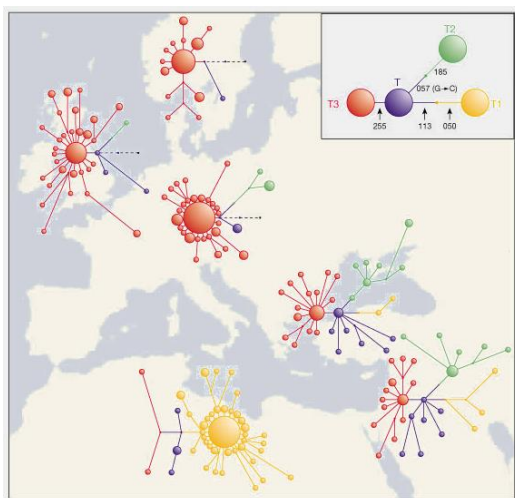


Fig.1.11: Distribuzione principale dei 4 aplogruppi T. T3 predomina in Europa e, insieme a T1 e T, rappresenta quasi tutta la variabilità del vicino e medio oriente. T1 invece, è tendenzialmente esclusivo dell'area africana mentre è scarsamente rappresentato altrove (Troy, 2001).

I precedenti studi quindi, considerando questa età di coalescenza e le distribuzioni geografiche dei rami T, sostengono un'origine neolitica per

tutti gli aplogruppi T-mtDNA da un popolazione uri proveniente dalla mezzaluna Fertile, e respingono la possibilità che altre domesticazioni possano avere avuto un epicentro coinvolgente mtDNA-T in diverse aree geografiche [Mannen 2004; Bradley et al., 1996].

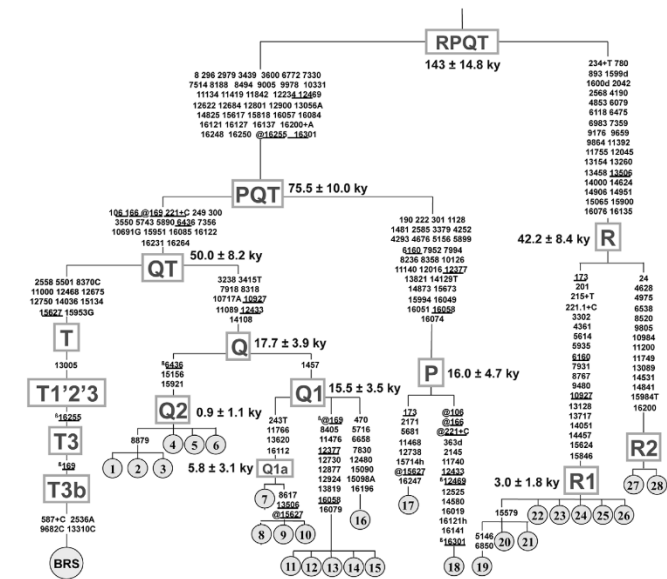


fig.1.12 – Albero rappresentante tutte gli aplogruppi bovini conosciuti. Questo albero, illustra i rapporti tra l' aplogruppo comune T rappresentato dai BRS e rari mtDNA appartenenti ad aplogruppi P , Q e R. Le mutazioni sono riportati sui rami e sono numerati secondo la BRS, sono transizioni a meno che una base sia esplicitamente indicato. L'eteroplasmia è contrassegnato con un suffisso (h). (Achilli et al. 2008)

2.1 - DNA antico o meglio, DNA degradato?

Il termine “DNA antico” viene usato per qualsiasi traccia di DNA proveniente da un organismo morto o parte di esso: per dare una definizione più precisa è considerato antico qualsiasi DNA sottoposto a processi autolitici o diagenetici.

La caratteristica comune, non è tanto quella di presentarsi come materiale “vecchio” in termini di tempo, bensì di risultare fortemente frammentato e degradato. Questa definizione include i tessuti antichi di migliaia d’anni: questi campioni sono conservati grazie al loro stato disidratato che impedisce l’attività enzimatica intracellulare e quindi la degradazione.

2.2 - Principali caratteristiche del DNA antico

Caratteristiche fondamentali del DNA antico sono l’elevato stato di frammentazione dei filamenti della doppia elica, la mancanza di alcune delle basi azotate, la presenza di basi modificate e di legami "cross-link". L’insieme delle modificazioni chimiche a cui va incontro una doppia elica di DNA e che portano alla sua completa degradazione possono essere definiti processi diagenetici. Fra essi, quelli che riguardano in modo diretto i depositi archeologici sono i processi di idrolisi e ossidativi (Hoss, 1996).

Gli acidi nucleici si decompongono spontaneamente in soluzione, anche in condizioni fisiologiche, per effetto dell'idrolisi. Tuttavia mentre la cellula viva, avendo elaborato processi di riparazione del DNA, può rimediare a questi danni, una cellula morta non è più in grado di far fronte ai processi di degradazione.

Il DNA inoltre, può andare incontro a perdita delle basi azotate: generalmente le purine si liberano per prime, infatti le pirimidine si distaccano con una velocità di 20 volte inferiore; e in presenza di un sito abasico, in cui cioè una base si è staccata dal deossiribosio, il filamento è indebolito e va rapidamente incontro a rottura. Anche i gruppi amminici delle basi sono suscettibili di idrolisi che può provocare deaminazione. Nel DNA, l'emivita di un residuo citosinico in una molecola a doppio filamento a 37° e pH 7.4 è mediamente 30.000 anni. Per questi motivi la

depurinazione è considerata il principale meccanismo di degradazione del DNA in soluzione (Lindahl et Nyberg, 1974).

I danni che si incontrano a livello del DNA antico sono quindi principalmente quelli indicati nella seguente Tabella 2:

Forme di Degradazione	Processi di degradazione	Effetti sul DNA	Possibili soluzioni
Rotture nel filamento	Azione degradativa di microorganismi Azione autolitica delle endonucleasi	Frammentazione del DNA	Amplificazione di frammenti di DNA "overlapping"
Lesioni ossidative	Degradazione delle basi azotate Degradazione dei residui di deossiribosio	Modificazioni nucleotidiche	Amplificazione di frammenti di DNA "overlapping" Sequenziamento multiplo di cloni
Lesioni Idrolitiche	Deaminazione Adenina → Ipoxantina Citosina → Uracile 5-metilcitosina → Timina Guanina → Xantina	Miscodificazioni Nucleotidiche	Digestione enzimatica con UNG (uracil-N-glicosilasi) Sequenziamento multiplo di cloni
DNA cross-links	Riarrangiamenti DNA-DNA DNA-proteine	Frammentazione del DNA	Trattamento del campione con PTB (N-phenacylthiazolium bromide)

Tab2: schema sulla degradazione del DNA

3 - Introduzione alle *Next Generation Sequencing*

Recentemente sono state sviluppate nuove strategie per il sequenziamento del DNA su livelli differenti. I progressi generali in vari campi tecnologici hanno prodotto strategie alternative per il sequenziamento di DNA sempre più pratiche da realizzare. Da questo punto di vista la tecnologia *Roche/454* è apparsa subito possedere un vantaggio nell'associare la creazione di *libraries* (ovvero complete genoteche) con il successivo pirosequenziamento simultaneo. Ci troviamo quindi ad assistere ad uno scenario completamente rivoluzionario, rapidamente mutato nell'arco di pochi anni attraverso l'invenzione e l'introduzione sul commercio di alcuni nuovi approcci per il sequenziamento "high-throughput" chiamati *Next Generation Sequencing (NGS)* che consentono parallelamente di ridurre i tempi e i costi di analisi e di aumentare notevolmente la capacità di sequenziamento.

In realtà, nonostante gli studi di Margulies et al. [2005] mostrassero che genomi di batteri di piccole-medie dimensioni potessero essere sequenziati con una o due corse su uno strumento NGS, non venne immediatamente compreso come il pirosequenziamento consentisse studi biologici basati su sequenziamenti che non fossero realizzabili con il metodo di Sanger. Già alla fine del 2005 uno studio di metagenomica applicato all'analisi di aDNA mostrò dati illuminanti: con una singola corsa sulla Roche 454 GS20 fu possibile analizzare 13 milioni di bp del genoma nucleare di un *Mammuthus primigenius* datato 27.740 ± 220 anni da oggi [Poinar et al. 2006], aprendo la strada all'ancor più complicato progetto sul genoma di Neanderthal [Green. et al. 2006; Noonan et al. 2006]. Queste metodiche di sequenziamento "high-throughput" NGS. Si sono mostrate fin da subito molto indicate per superare le limitazioni dell'analisi dell'aDNA, apportando evidenti vantaggi. Innanzitutto è possibile determinare lo stato di conservazione del reperto stimando lo stato di frammentazione delle molecole di DNA in esso contenute; poi c'è il vantaggio di eliminare il clonaggio batterico generando centinaia di migliaia di *reads* (letture di sequenza per corsa) a partire da singole

molecole amplificate in isolamento, quindi non competitive; inoltre le *reads* coprono lunghezze compatibili con la dimensione media dei frammenti di DNA conservati in reperti fossili (70-200 bp). Oltre a ciò il vantaggio principale sta nel fatto che l'alto numero di molecole sequenziate permette di ottenere stime sulla composizione di molecole endogene e contaminanti attraverso l'analisi dei patterns di misincorporazione e frammentazione nucleotidica alle estremità delle singole molecole. Dati interessanti sono emersi da uno studio di Krause [2010] nel quale sono stati analizzati estratti di DNA di Neanderthal ritenuti altamente contaminati (fig. 3.1), in particolare amplificando la regione del mtDNA nella quale contaminazioni e DNA endogeno possono essere distinti attraverso il confronto di sequenze a noi note di mtDNA neanderthaliano e di mtDNA moderno.

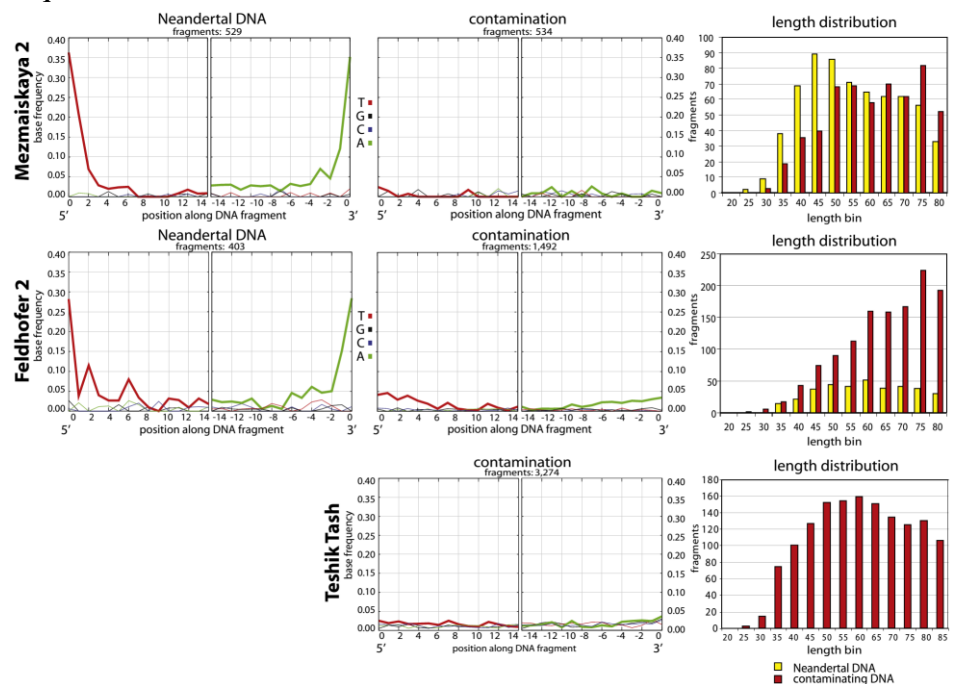


fig. 3.1 Esempi di patterns di misincorporazioni nucleotidiche e distribuzioni di lunghezza per le molecole di mtDNA endogeno e contaminante nei Neanderthal Feldhofer 2, Mezmaiskaya 2, e Teshik Tash (altamente contaminato). (Krause 2010).

Si è notato che insieme alla riduzione della lunghezza dei frammenti, la deaminazione della citosina è la mutazione che più comunemente

occorre, in particolare attraverso una misincorporazione C→T alle estremità 5' e le corrispondenti G→A alle estremità complementari 3'. Le analisi hanno mostrato una distribuzione della lunghezza media dei frammenti di DNA maggiore di 81 bp per le molecole contaminanti e di 60-45 bp per le molecole endogene, e questo può essere un primo dato che consente di distinguere il DNA endogeno dal DNA contaminante. Una distinzione più netta è data dal fatto che le misincorporazioni si presentano distribuite in quantità compresa tra il 28% e il 35% nel caso di DNA proveniente da molecole endogene e in quantità tra il 4% e il 2% nel caso di DNA proveniente da molecole contaminanti (Figura 3.2).



Fig. 3.2

Questo andamento consente una reale distinzione tra DNA endogeno e DNA contaminante moderno [Krause et al. 2010]. Successivamente questi strumenti, divenuti disponibili sul mercato solamente nel 2005, hanno avuto un forte impatto sulla nostra abilità di esplorare e trovare risposte a questioni biologiche e genomiche e più di 100 articoli correlati a questi temi sono apparsi in letteratura soltanto dal 2005 al 2013 molti di questi hanno contribuito nel mettere a punto protocolli specifici per il DNA antico (Briggs et al., 2009; Maricic et al., 2010; Stoneking & Krause, 2011; Gansuage & Meyer, 2013). Attualmente, tra le metodiche di sequenziamento ultramassivo si trovano certamente ad avere un'ampia diffusione la FLX-Titanium

Genome Sequencer Roche/454 Life Sciences, la Illumina/Solexa Genome Analyzer e la Applied Biosystems SOLiD TM System, tecnologie utilizzate anche nel “1000 Genomes Project”, che ha l'obiettivo di produrre una mappa delle variazioni del genoma umano comuni a più dell'1% della popolazione umana del mondo.

Ognuna di queste apparecchiature è frutto di una complessa interazione tra biochimica, ottica CCD ad alta risoluzione e hardware/software ingegnerizzati. Anche se differenti, queste tecnologie hanno caratteristiche comuni: la prima è quella di ridurre e semplificare gli step preliminari alle reazioni di sequenziamento, la seconda, è che esse sono eseguite e rilevate automaticamente. Come è ovvio che sia, queste tecnologie hanno anche richiesto profondi cambiamenti per l'analisi dei dati. I classici metodi statistici e algoritmi di calcolo non sono sufficienti per analizzare la quantità di dati di sequenze genomiche. Sono necessarie nuove strategie analitiche per esplorare le nuove funzionalità di sequenziamento dei dati, integrando i vari dati genomici con lo scopo di riuscire a dipanare sempre di più la struttura, l'organizzazione e la funzione del genoma umano. La Roche ha immesso sul mercato nel 2005 una 454 di seconda generazione, che ha avuto diversi successi applicativi sul DNA antico [Poinar et al. 2006; Gilbert et al. 2007]. La *GS FLX/454*, è in grado di ottenere in media reads di 250 bp di lunghezza (Figura sotto).



TITANIUM GENOME SEQUENCER ROCHE/454 LIFE SCIENCES

Secondo quanto indicato (<http://www.454.com>), per il sistema *GS FLX* le specifiche di throughput indicano che in una corsa di 7 ore e mezzo

possono essere sequenziate una media di 100 milioni di basi di DNA. In base agli attuali prezzi di listino per il sistema, *GS FLX* il costo corrente per tutti i reagenti per eseguire un singolo esperimento è molto alto, intorno ai 7.000 euro. Questo tipo di sequenziatore è basato su un sistema di pirosequenziamento mediante sintesi massiva parallela che si basa sul dosaggio del pirofosfato liberato in seguito all'attacco di un dNTP al filamento polimerizzato.

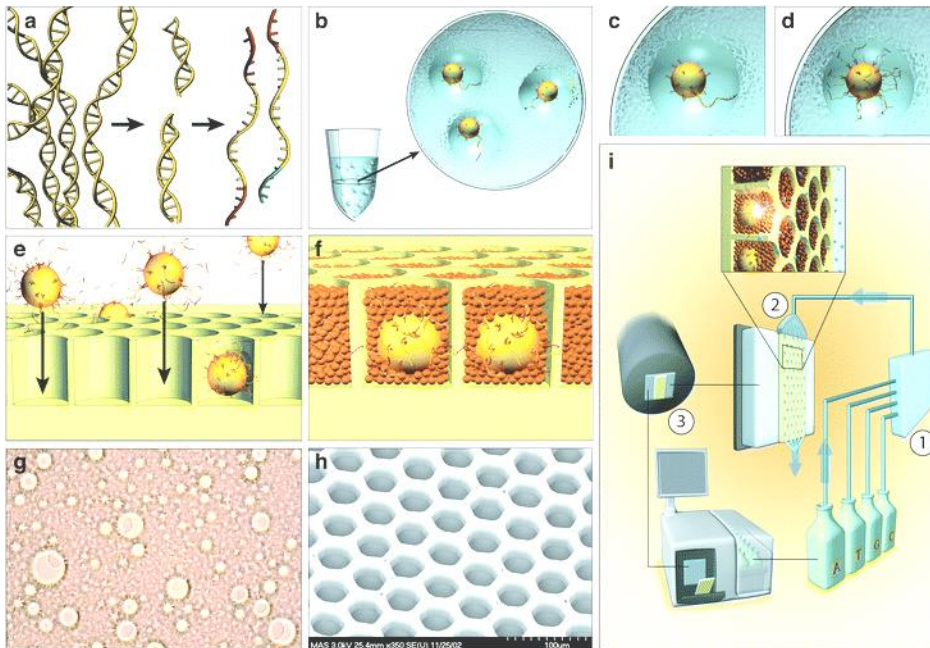


Fig. 3.3 Dal sito : www.454.com. Il DNA genomico è isolato, frammentato, legato agli adattatori e separato in singoli filamenti. (b) I frammenti sono legati a microsferi (un frammento per sfera), le sfere sono isolate nelle goccioline di emulsione seguirà una emPCR in ogni goccia. (c) L'emulsione è rotta, i filamenti di DNA vengono denaturati e depositati in una PicoTiter Plate. (e) Ogni sfera è depositata in un pozzetto con gli enzimi necessari per la reazione di sequenziamento. (f) PicoTiter Plate. (f-g-h) Lo strumento 454 è costituito dai seguenti sottosistemi principali: un insieme fluido (1), una cella di flusso che include la Plate contenente fibra ottica (2), una fotocamera a CCD (3), e un computer che fornisce l'interfaccia con l'utente (parte inferiore del 3).

In questa tecnica i frammenti che compongono la *library* vengono miscelati con una popolazione di sferette di sefarosio che portano sulla superficie oligonucleotidi complementari alle sequenze di adattatori specifici per la Roche/454 che vengono attaccati ai frammenti da sequenziare durante la preparazione della *library*, in

modo tale che ogni sfera sia associata ad un singolo frammento, formando un complesso frammento-sfera.

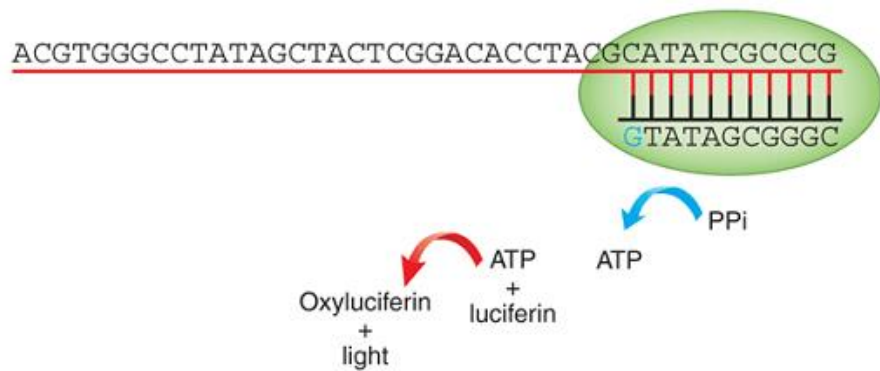


fig. 3.4 Pirosequenziamento. Il filamento stampo è rappresentato in rosso, il primer è mostrato in nero e la DNA polimerasi è indicata con l'ovale verde. L'incorporazione della base complementare (la "G" blu) genera pirofosfato inorganico (PPi), che viene convertito in ATP dalla sulfurylasi. La luciferasi utilizza l'ATP per convertire luciferina in ossiluciferina, producendo luce.

Il pirosequenziamento (fig. 3.4) è una tecnica per il sequenziamento del DNA per la quale la sequenza da analizzare, dopo essere stata amplificata con la emPCR, viene incubata come singola elica insieme ad alcuni enzimi. In breve, ogni nucleotide incorporato grazie all'enzima DNA polimerasi induce il rilascio di pirofosfato, che dà il via ad una serie di reazioni a cascata che portano infine alla produzione di un segnale luminoso prodotto attraverso l'enzima luciferasi. La quantità totale di luce prodotta viene rilevata da un detector a CCD (fig. 3.5) ed è direttamente proporzionale al numero di nucleotidi incorporati (fino al punto di saturazione del detector).

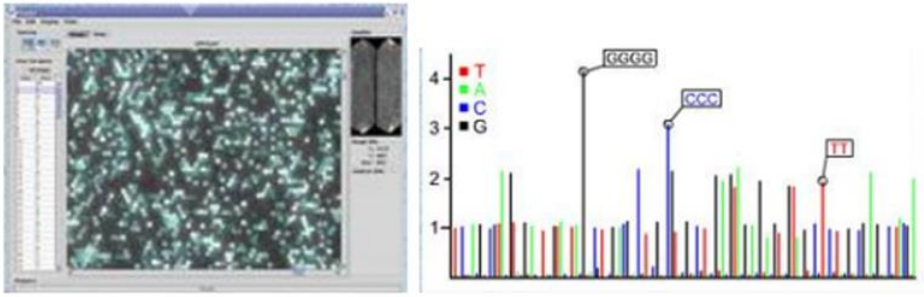


fig. 3.5 Segnali di luminescenza acquisiti con un'apposita camera fotosensibile (CCD), convertiti e visualizzati come picco in un pirogramma. (foto Roche)

Grazie all'utilizzo del pirosequenziamento il sistema è in grado di sequenziare circa 400-600 Mb di DNA con una corsa di 10 ore sul Genome Sequencer FLX con reagenti GS FLX della serie Titanium.

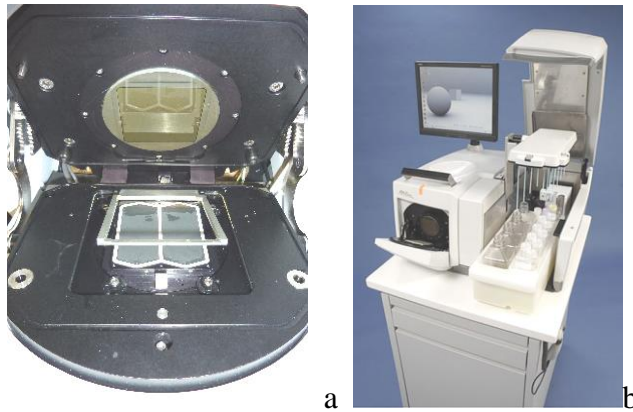


Fig. 3.3a – b, Genome Sequencer FLX, e camera della *plate* (a)

4 - Scopo del progetto di dottorato

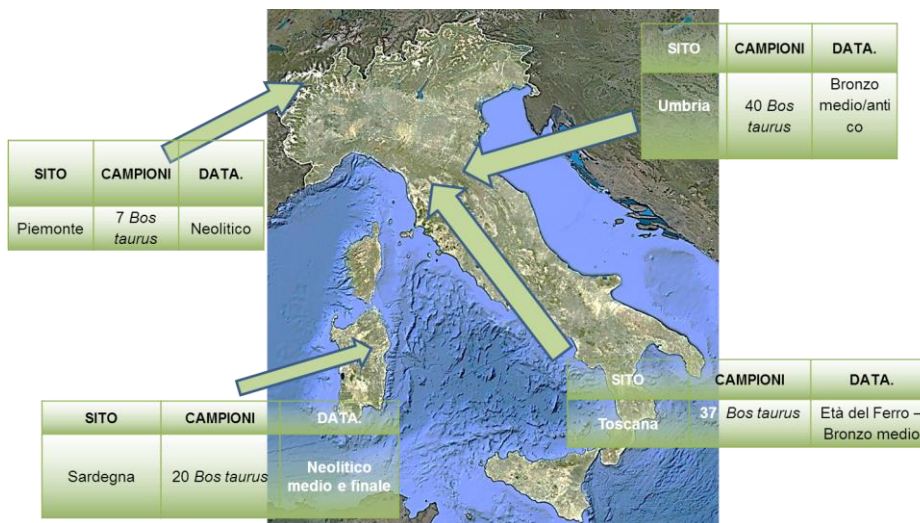
La domesticazione delle specie da pascolo è parte fondamentale della neolitizzazione, cioè della formazione delle società produttive stanziali. La specie animale che ha suscitato più interesse nel mondo scientifico, sia per i suoi particolari caratteri morfo-etologici, sia per l'importanza che essa ha rivestito nella comprensione della diffusione dell'agricoltura e dell'allevamento in Europa, è sicuramente il bue domestico, *Bos taurus* (Harris, 1996). Negli ultimi anni la domesticazione dei bovini è stato oggetto di studi multidisciplinari che hanno sviluppato un punto di raccordo fra l'archeologia e la genetica (Catalano et al., 2007). I cambiamenti socioculturali prodotti dall'avvento e dalla diffusione delle prime forme di pastorizia, documentati dagli studi archeologici, vengono completati attraverso un approccio genetico-molecolare. Recenti studi (Troy et al., 2001; Bradley 2006), basati sul confronto di sequenze mitocondriali di un ampio campione rappresentativo delle diverse razze bovine, hanno identificato nella regione della Mezzaluna Fertile il centro di origine e di espansione di tutte le varianti oggi presenti in Europa. Alcuni autori sostengono, tuttavia, che l'ampia diffusione del bue selvatico nei territori forestali dell'Europa non escluda la possibilità, di una sua domesticazione indipendente in queste regioni.

Ipotizzando nel passato in Italia la possibilità di incroci spontanei o ad opera dell'uomo, gli obiettivi del mio progetto sono stati:

1. analizzare il "gap" genotipico tra bovini, andando a coprire, con il confronto tra campioni neolitici e del paleolitico superiore italiani ed europei, il periodo post-domesticazione (Neolitico ed età del bronzo).
2. Confrontare i dati ottenuti con un numero elevato di bovini moderni per comprendere se le popolazioni attuali derivino da fenomeni di domesticazione locale o da importazioni da parte di popolazioni neolitiche (agricoltori/allevatori)

Tutto questo al fine di aggiungere utili informazioni sul processo di domesticazione delle razze bovine tutt'oggi diffuse in Italia e in Europa.

5. Materiali e metodi



Tab 5.1

Nel presente studio, abbiamo analizzato 85 campioni neolitici italiani (tab 5.1, tab4) provenienti da Piemonte, Toscana, Umbria e Sardegna. Datati in un arco di tempo "post-domesticazione" dal Neolitico all'inizio dell'età del ferro.

5.1 Pulizia dei campioni

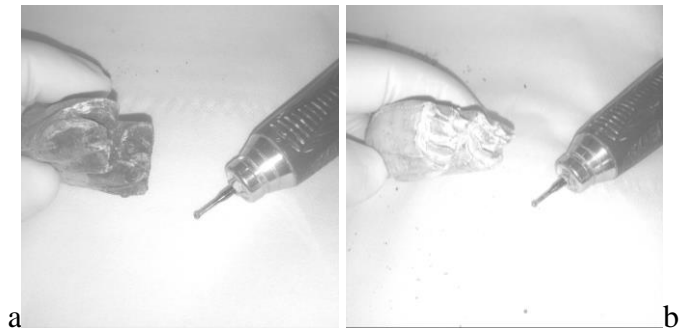


fig. 5.1 pulizia di un dente di bovino adulto

Al fine di eliminare eventuali tracce di DNA esogeno, è stato rimosso uno strato osseo superficiale di circa 1 mm (fig. 5.1); successivamente ciascuna superficie è stata ortogonalmente irradiata con raggi UV a 254 nm per 45 minuti all'interno di microlink PBI. In seguito all'irraggiamento i campioni sono stati polverizzati con micromotore Marathon Multi 600, ogni punta dello stesso è stata preventivamente sterilizzata all'interno di microlink PBI. Le polveri sono state utilizzate in parte per l'estrazione del DNA, in parte conservate all'interno di falcon sterili a -20°C.

5.2 Estrazione con adsorbimento su *silica* (polvere di silicio)

Il protocollo prevede tre fasi.

Il primo passaggio consiste nell'aggiunta di 5 ml di *Extraction Buffer* ad ogni aliquota da 250 mg di polvere, in modo da ottenere una soluzione che, ruotando overnight in assenza di radiazione visibile, subisce decalcificazione della parte inorganica e digestione della parte proteica intrappolando, se presente, il DNA. L'*Extraction Buffer* viene preparato con EDTA 0,5M pH8 in quantità 4,5 ml, Proteinase K 10 mg/ml in quantità 0,125 ml e H₂O HPLC in quantità 0,375 ml (le quantità sono riferite ad un'aliquota di polvere da 250 mg). Nel secondo passaggio le aliquote, dopo aver ruotato *overnight*, vengono centrifugate (2 min a 4000 rpm) in modo tale da far precipitare sul fondo la parte non digerita (*pellet*). La parte digerita (surnatante) viene invece recuperata, unita a 20 ml di *Binding Buffer* e 4 ml di una sospensione di *silica*, ed infine fatta ruotare per 3 h in assenza di radiazione visibile. Il *Binding Buffer* viene preparato con Guanidina Tiocianato (GuSCn) in quantità 12,39 g, H₂O HPLC in quantità 9,66 ml e Sodio Acetato 3M pH 5.3 in quantità 2,1 ml (le quantità sono riferite ad un'aliquota di polvere da 250 mg). Si ottiene, così, una soluzione quasi satura di Guanidina Tiocianato (concentrazione 5M) con pH acido, che in tali condizioni ha la funzione di facilitare il legame del DNA con la *silica*.

Trascorse 3h il DNA si trova legato alla *silica*. Inizia quindi una terza fase, durante la quale i campioni vengono centrifugati (2 min a 4000 rpm), vengono recuperati i surnatanti, vengono risospesi in 1 ml di *Binding Buffer*, ricentrifugati (10s alla massima velocità) e sottoposti a due lavaggi tramite *Wash Buffer*, in modo tale da eliminare il più possibile tutto il materiale che non sia né *silica* né DNA. Il *Wash Buffer* viene preparato con Etanolo 100%, NaCl 5M, Tris 1M, EDTA 0,5M e H₂O.

Dopo il lavaggio con *Wash Buffer* è opportuno attendere circa 20 min con i tubini dei campioni aperti sotto cappa in modo da favorire l'evaporazione dell'etanolo. Giunti alla fase finale dell'estrazione

l'obiettivo è che DNA e *silica* si separino. DNA e *silica* stanno insieme per affinità a basse condizioni di pH e alte concentrazioni saline; con l'aggiunta di 60 µl di 1X TE, un buffer salino a bassissima concentrazione e pH leggermente basico, vengono variate queste due condizioni inducendo il distacco del DNA dalla *silica*. Dopo un passaggio in centrifuga viene recuperato il surnatante contenente il DNA per un totale di 60 µl di estratto, il quale sarà conservato in freezer alla temperatura di -20°C.

E' necessario in ultima analisi sottolineare che parallelamente alla manipolazione dei campioni in fase di estrazione viene applicato l'intero protocollo ad un tubino vuoto nel quale saranno portate avanti le reazioni coi soli reagenti. Questo è detto "controllo negativo di estrazione" (Ke-) ed ha la finalità di mettere l'operatore nella condizione di poter successivamente saggiare lo stato di contaminazione dei reagenti, dell'ambiente e del materiale di lavoro fino a poter risalire ad eventi o fonti inquinanti di DNA esogeno.

Tabella 4 campioni estratti:

Campioni *Bos taurus*

REGIONE	SITO	N° CAMPIONI	Datazione
Piemonte	Vari scavi	7	Neolitico
Umbria	<u>Grotta dei Cocci</u>	10	Eneolitico
	Grotta del Lago	10	Neolitico finale
	Tor D'Andrea	10	Bronzo medio
	<u>Pian delle Rotte</u>	10	Bronzo Antico
Toscana	Trebbio	10	Early Iron age
	Prato	7	neolitico
	<u>musei civici</u>	8	neolitico
	<u>Gorgo del Ciliegio</u>	12	Bronzo medio
Sardegna	Fenosu	4	Neolitico finale
	Cuccuru is Arrius	4	eneolitico
	Su Mulinu Mannu	12	Neolitico medio

5.3 - Amplificazione del DNA

La PCR viene utilizzata per amplificare un segmento di DNA che è compreso tra due regioni note.

La regione bersaglio per il nostro studio è l'HVR-I della D-Loop del DNA mitocondriale, lunga 300 bp. A causa della degradazione del DNA antico e quindi della sua presunta frammentarietà, l'HVR I è stata suddivisa in quattro tratti parzialmente sovrapposti (fig.5.1) identificati dai primers:

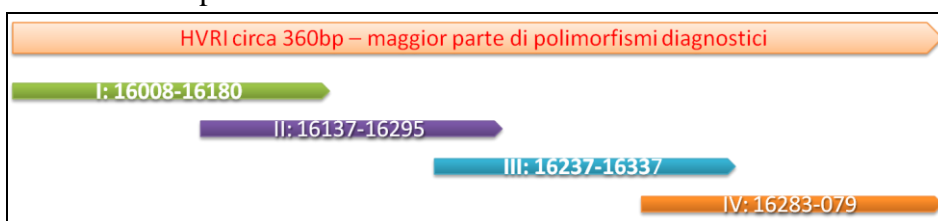


Fig 5.1

La miscela di reazione è stata preparata all'interno di una cappa sterilizzata prima di ogni utilizzo tramite raggi UV a 254 nm. L'operatore ha indossato camice, mascherina, cuffia e guanti sterili per tutta la durata dell'esperimento. Al fine di minimizzare il rischio di contaminazione, tutti i reagenti utilizzati sono stati aliquotati in ambiente sterile e sono sempre state utilizzate aliquote esclusivamente dedicate a questo studio.

In tabella si riportano le coppie di primers testate:

TRATTO	NOME e REGIONE ANNEALING	SEQUENZA	bp
I	L16008 - 16030	ACA TTA AAT TAT ATG CCC CAT GC	173
	H16165 - 16180	TTC ACG CGG CAT GGT A	
II	L16137 - 16157	TTC CTT ACC ATT AGA TCA CGA	159
	H16276 - 16295	GAT GAG ATG GCC CTG AAG AA	
TRATTO	NOME (e REGIONE ANNEALING)	SEQUENZA	bp
III	L16237-16257	GGGTCGCTATCCAATGAATTT	101
	H16312-16337	CATCGAGATGTCTTATTTAAGAGGAA	
IV	L16283-16302	GGCCATCTCATCTAAAACG	135
	H060-079	CAAGCATCCCCAAAATAAA	

Ogni reazione di PCR ha previsto un controllo negativo per verificare l'assenza di contaminazione con campioni antichi bovini trattati precedentemente.

Per tutti i campioni è stata inizialmente verificata la presenza di sostanze inibitrici dell'azione della Taq polimerasi mediante l'amplificazione di 2µl di estratto con del DNA di controllo. Per i campioni risultati inibiti, le amplificazioni dei quattro frammenti dell'HVRI sono state effettuate dopo aver aliquotato a varie concentrazioni decrescenti l'estratto in maniera tale da rendere inefficaci gli inibitori presenti per diluizione.

I prodotti di PCR sono stati controllati mediante elettroforesi su gel di agarosio al 1,5-2% di concentrazione caricando 25 µl di amplificato. Gli amplificati ottenuti sono stati prelevati mediante rimozione con bisturi o apposite punte *millipore*[®] del tassello di gel che li conteneva e successiva centrifugazione.

5.4 - Tecniche tradizionali ed NGS

Una volta prodotti questi amplificati con le tecniche classiche si è passati a completare le analisi con le nuove strategie high throughput delle NGS.

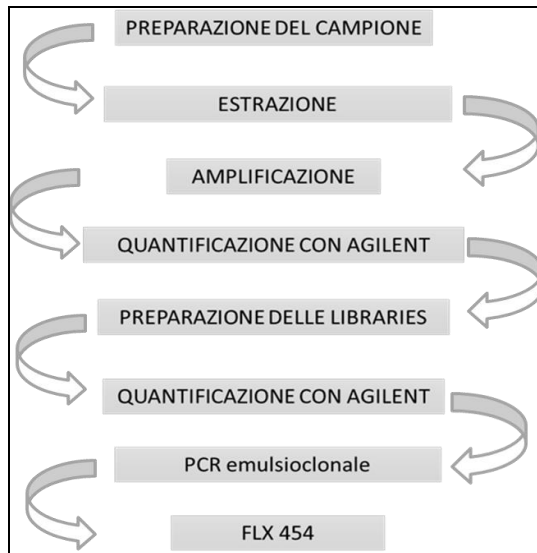


Fig 5.2 – schema rappresentante il “workflow” relativo alla fase sperimentale del progetto.

5.4.1 - Costruzione *Libraries*

Costruire una *library* significa preparare una genoteca totale e completa di tutti i tratti di nostro interesse, che in questo caso sono i 4 ampliconi dei quattro tratti dell’HVR-I. Tutti devono essere presenti alla stessa concentrazione; è stato stabilito empiricamente che la concentrazione minima per avere una genoteca di buona qualità è di 1ng/microl.

Quindi per prima cosa deve essere quantificato ciascun amplicone con “Agilent Bioanalyzer” (fig.5.2bis) che è una macchina che sfrutta lo stesso principio dell’elettroforesi, ma invece di avere un substrato in gel, sfrutta una serie di chip a capillari: questo garantisce una analisi rapida della concentrazione del campione usando appena un microlitro dello

stesso. Nel nostro caso, vista la natura dei frammenti di DNA analizzati è stato usato un chip “*High Sensivity*”.



Fig.5.2bis workflow dell' *Agilent Bioanalyzer 2100*

Successivamente a questo controllo si può passare alla preparazione di una *library*: viene preparata una mix dei quattro tratti in un volume finale di 16 μ l.

Il protocollo utilizzato, presso i nostri Laboratori per la costruzione della *library* segue il protocollo “RAPID” utilizzato per il sistema di sequenziamento *Roche/454 Titanium*[®], con alcune piccole modifiche per sfruttare a pieno le capacità della macchina *FLX* della Roche. Avendo a che fare con aDNA si ha la certezza che il DNA, se presente, si trovi già frammentato, per cui non è necessario procedere con la frammentazione iniziale del campione tramite nebulizzazione.

In questo protocollo invece di utilizzare due diversi adattatori ne viene utilizzato uno soltanto con una struttura particolare a forma di Y: dopo un tratto iniziale a doppio filamento si ha una biforcazione in due singoli (vedi fig. 5.3) l'attacco tra l'adattatore ed il filamento di DNA avviene grazie al riconoscimento di una coda poli-T montate sull'adattatore e delle code poli-A portate all'estremità del filamento di dna. In questo caso si ottengono *libraries* a doppio filamento.

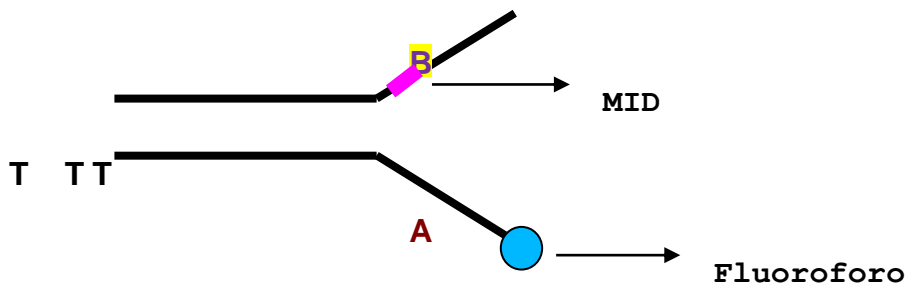


Fig. 5.3 adattatore unico a forma di “Y”.

La fase iniziale della procedura è quindi quella di *Fragment-End Repair* utile a convertire tutte le estremità dei frammenti di DNA presenti in soluzione rendendole adatte all’attacco dell’adattatore che servirà in fase di sequenziamento. La fase successiva è quella di *Adaptor Ligation*. In questa fase viene attaccato l’adattatore alle estremità dei frammenti di DNA precedentemente riparati e purificati. La parte A dell’ adattatore ha sequenza fissa; all’estremità ha un fluoroforo, mentre all’interno della parte B dell’adattatore è possibile inserire in fase di sintesi dell’oligonucleotide una piccola sequenza variabile (10 bp) denominata MID (ogni MID è diverso per ogni campione) che consente di creare un sistema campione-adattatore che permette di distinguere un campione dall’altro (*barcoding* fig. 5.4) e, in fase di sequenziamento, di discriminare le contaminazioni, in quanto esse non presenteranno la sequenza MID specifica del campione, oltre che darci il vantaggio di poter sequenziare più librerie sulla stessa *lane*.

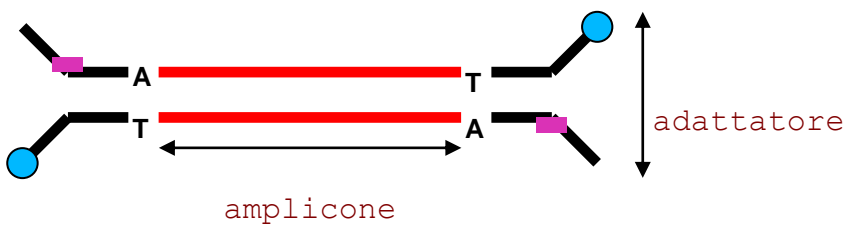


Fig 5.4

Un'altra modifica che è stata fatta rispetto al protocollo Roche è quella di diminuire la quantità di adattatori utilizzati nella mix per ciascun

campione, in quanto una concentrazione elevata degli stessi può promuovere la formazione di dimeri inter-adattatori piuttosto che i corretti legami adattatore-DNA *target*.

La genoteca così ottenuta viene purificata con biglie magnetiche *Agencourt AMPure[®] XP* secondo il protocollo: [(Volume di biglie per reazione) = 1.2x (Volume di reazione)] il principio di questa purificazione è spiegato nella figura sottostante:

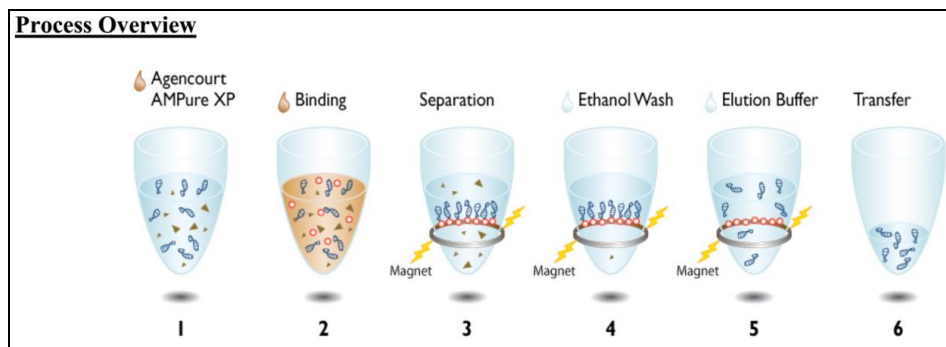


Fig 5.5 -1. Si aggiunge 1.8ul AMPure XP per 1.0ul di amplificato; 2. Si fa legare l'amplificato alle biglie magnetiche; 3. Si separa il complesso biglie-amplificato dal resto; 4. Lavaggio con 70% di Etanolo per rimuovere le impurità; 5. Separare il purificato dalle biglie; 6. Trasferire in un nuovo tubino.

La fase successiva prima di passare alla PCR emulsio-clonale è una pre-amplificazione allo scopo di aumentare il numero di molecole sequenziabili. Per questo motivo viene eseguita una prima *Library pre-amplification*, che non è altro che una reazione di PCR a 20 cicli effettuata su 5µl della nostra libreria.

I primer utilizzati sono complementari alla sequenza degli adattatori (in rosso) in maniera che non subiscano variazioni nel corso della PCR:

PrimerA-key:5'-CCATCTCATCCCTGCGTGTC	TCCGACTCAG-MID-3'
PrimerB-key:5'-CCTATCCCCTGTGTGCCTTG	GCAGTCTCAG-MID-3'

Nella pre-amplificazione sono stati utilizzati 5 µl di libreria purificata in una mix di reazione così costituita:

1X High Fidelity PCR Buffer (Invitrogen),
 0.2 mM di ciascun dNTP, 2 mM MgSO₄,
 0.2 µM di ciascun primer

1 U di Platinum® Taq High Fidelity

La reazione è stata svolta con il seguente profilo termico:

temperatura	tempo	Cicli 20
94°C	2	
94°C	30 sec	20
55°C	30sec	20
68°C	30 sec	20
72°C	2min	

Come risultato finale nelle library avremo tutto il DNA dell'estratto (sia quello del campione che quello di altri organismi del suolo o di chi ha maneggiato il reperto). Tutte le fasi sopra elencate sono state effettuate sull'estratto del campione di Bos ottenuto attraverso estrazione con adsorbimento su silica e sul controllo negativo di estrazione (Ke-), inoltre è stato introdotto un ulteriore controllo negativo per monitorare eventuali contaminazioni introdotte in fase di preparazione della *library* o presenti nei reagenti (Kl-).

Di seguito riportiamo le *libraries* ottenute:

CAMPIONE	pg PER TRATTO	N° TRATTI	pg TOTALI	MID	PROVENIENZA CAMPIONI
PDR_10	1000	4	4000	MID 3 (1:50)	UMBRIA
PDR_6	1000	4	4000	MID 8 T.Q.	
767	2500	2	5000	MID 6 (1:50)	
PDR_9	1000	3	3000	MID 10 (1:50)	
480	2000	2	4000	MID 5 (1:50)	
PDR_1	2000	3	6000	MID 5 (1:50)	
PDR_2	2000	3	6000	MID 6 (1:50)	
US 100,2	2000	4	8000	MID 10 (1:10)	TOSCANA
US 104	2500	4	10000	MID 4 (1:10)	
108	2000	2	4000	MID 3 (1:50)	
54	2000	4	8000	MID 4 (1:50)	PIEMONTE
60	1850	4	6752	MID 10 (T.Q.)	
68	1500	4	6000	MID 11 (T.Q.)	
76	2000	4	8000	MID 4 (1:50)	
77	1000	3	3000	MID 6 (1:50)	

5.4.2 - PCR Emulsio-Clonale (emPCR)

Le *libraries* così ottenute vengono sottoposte ad una reazione di amplificazione, definita emulsio-clonale, che permette di separare tra di loro le molecole di DNA da amplificare tramite il legame con nanosfere, che portano un certo numero di oligonucleotidi complementari agli adattatori, che vengono poi fisicamente isolate le une dalle altre grazie all'utilizzo di un'emulsione acqua in olio (Mardis, 2008). In questo caso la singola molecola di DNA che si lega ad una sola nanosfera di superficie 28 μm viene utilizzata come stampo per la reazione di PCR. I singoli complessi frammento-sfera si trovano isolati in micelle acqua-olio contenenti anche i reagenti per la PCR in modo che, una volta sottoposti ad opportuni cicli termici, si ottengano sulle singole superficie delle sfere approssimativamente un milione di copie identiche tra loro di ogni frammento di DNA, generando localmente una genoteca di quel singolo frammento (fig.5.4.1)

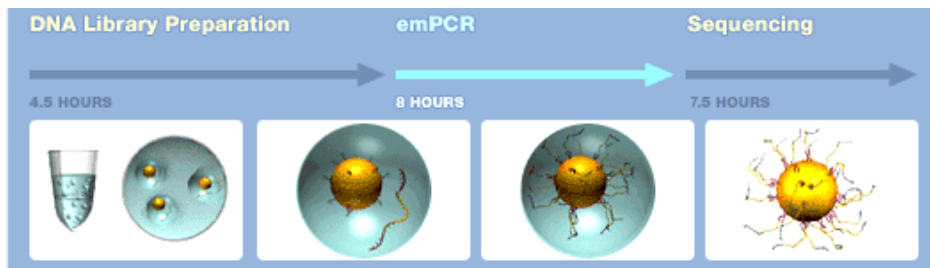


Fig. 5.4.1 creazione delle biglie (*beads*) contenenti la genoteca (*library*) del frammento di DNA di interesse. (www.roche.com)

Nel nostro caso, per calcolare il numero di biglie, è stato considerato di sfruttare una sola molecola di DNA per biglia secondo il protocollo Roche per l'amplificazione di librerie Rapid. Per ogni reazione di emPCR si utilizzano sempre $2,4 \times 10^6$ biglie. Punto critico di questa tecnica è calcolare il giusto rapporto tra il numero delle sfere e il numero di molecole del campione per evitare che più molecole diverse si leghino ad una stessa sfera (*mixed*), producendo quindi segnali non univocamente interpretabili in fase di sequenziamento, oppure che un numero troppo elevato di sfere rimangano non legate (*null*) (su hanno infatti accanto alle corrette DNA beads, le “*mixed*” e le “*null*” beads) determinando, invece, una diminuzione della capacità di sequenziamento.

“*Arricchimento*”:

A questo punto le biglie con il DNA vengono separate da quelle senza DNA (le biglie “*null*” si eliminano mentre le “*mixed*” restano) e si aggiungono dei primers chiamati *Enrichment Primers*, che sono complementari alla parte B dell'adattatore (legati alla Biotina), si aggiungono anche delle sfere magnetiche con streptavidina.

Grazie all'interazione tra la biotina dei primers e la streptavidina nelle sfere magnetiche si possono raccogliere le biglie con il DNA con un magnete posizionato all'esterno del tubino. La percentuale di biglie con legato il DNA di nostro interesse non è sempre la stessa, quindi sono state fatte diverse emPCR in tandem per ogni campione utilizzando volumi decrescenti di DNA, così da ottenere la corretta quantità di DNA dopo l'arricchimento.

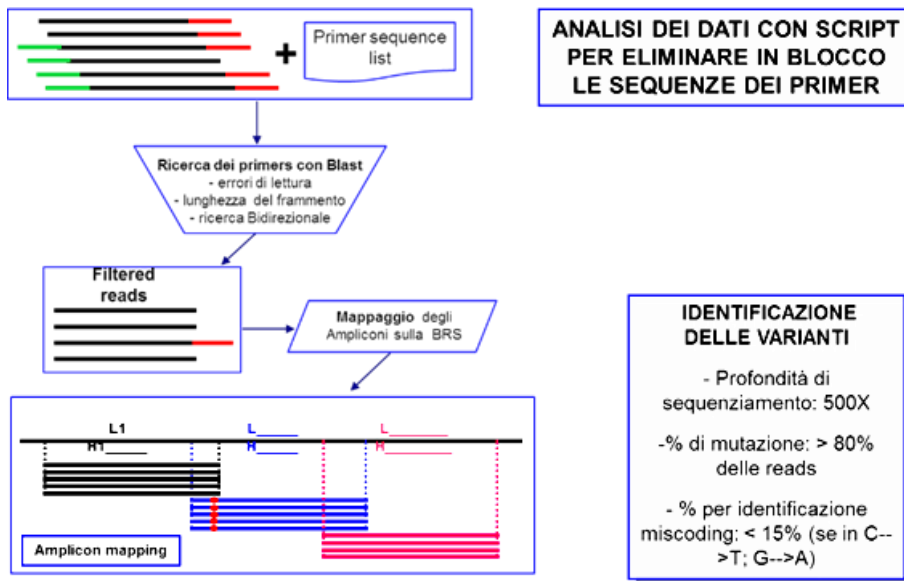
5.4.3 Sequenziamento ultramassivo tramite piattaforma *Roche 454*

Il sequenziamento massivo (FLX-Titanium Genome Sequencer) consente di ottenere migliaia di sequenze di DNA partendo sia da un estratto di DNA che da un amplificato. In quest'ultimo caso, il vantaggio di sottoporre a questa metodica dei frammenti preventivamente amplificati con tecniche classiche, permette di ottenere la successione nucleotidica di decine di migliaia di filamenti della regione di interesse, con lo scopo di verificare tutte le tipologie di mutazioni presenti in quella particolare sequenza.

I frammenti di DNA di interesse sono stati successivamente preparati, contati (Multisizer 3 Coulter Counter, Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) e sequenziati attraverso il Genome Sequencer FLX (FLX Roche/454 LifeSciences): la PicoTiterPlate (PTP) è stata suddivisa in 8 lane e, per ciascun campione, sono state caricate circa 6 mila biglie, lasciando da 3 a 6 campioni per lane. Per preparare lo strumento e la PTP è stato seguito il protocollo fornito dalla Roche.

Le reads ottenute per ogni locus sono state mappate e tramite l'utilizzo del software BVA, sono state generate le sequenze consenso utilizzando il programma Python script, che assegna ad ogni posizione la base più frequente.

5.4.4 Mappaggio dei dati della corsa su *FLX-454*



Schema del processo di “mapping”

Una volta ottenute, le reads (letture di sequenza) vengono analizzate attraverso uno script (ovvero un comando di linguaggio di programmazione) progettato appositamente per l’analisi dei nostri amplificati di aDNA e per automatizzare il riconoscimento delle mutazioni (in gergo tecnico “chiamata”).

Profondità di lettura: E’ stato impostato come copertura delle sequenze una profondità di 500x ovvero ogni nucleotide deve essere letto 500 volte prima di essere assegnato: i campioni che raggiungono questo determinato livello di lettura sono stati mappati; per gli altri invece si è ripetuto il sequenziamento finchè non hanno soddisfatto i parametri limite imposti.

Successivamente il programma identifica i MID ed effettua il demultiplexing per ciascuna lane, ovvero assegna ad ogni singola read il campione corrispondente. A questo punto abbiamo identificato tutti i campioni che ci interessano solo che nella loro sequenza sono ancora presenti i primers.

Primers trimming: si devono rimuovere i primers alle estremità delle reads viene quindi creata una lista con le sequenze dei primers utilizzati per l'amplificazione dei quattro tratti che è stata usata dal programma per ricercare quelle specifiche serie nucleotidiche (mediante "Blast") e le tagli.

Il programma viene impostato con questi comandi:

- *Mismatch*: sono ammessi fino a tre errori nella lettura di confronto tra la sequenza dei primers inseriti nella lista e quelli presenti alle estremità delle reads non è, infatti, necessaria una corrispondenza del 100%.

- *Match length*: si fissa la lunghezza minima del primer che deve essere letto, facente parte della "sequenza-primer-lista" e "sequenza-primer-reads" come pari a 10 bp;

- *"Dual" search*: la ricerca del primer deve essere fatta a livello bidirezionale da tutti e due i lati del frammento sia 3' che 5', in maniera da dare una lettura delle reads più fedele possibile.

Il mappaggio viene svolto con un programma che si chiama BVA a cui però vanno impostati alcuni comandi.

Lo script che usiamo è molto studiato e ha una caratteristica peculiare infatti il mappaggio avviene direttamente sulle quattro porzioni singole (della -brs, non sulla sua intera sequenza) in cui l'HVR1 è stata suddivisa in fase di amplificazione: in questo modo le reads sono state divise per tratto, questo ci servirà in un secondo momento per ritrovare più agilmente le mutazioni diagnostiche.

Finito il confronto tra i tratti sequenziati con il nostro lavoro e i tratti della sequenza di riferimento, il file di output che è in formato "*.bam" viene analizzato con un apposito software di gestione che si chiama "Samtools", il cui algoritmo riconosce ogni singola base ed effettua la "chiamata" e la conta per ogni posizione nucleotidica.

Nella figura si può vedere un esempio di lettura delle chiamate nucleotidiche tab 5.4.a :

Chr	Pos	Ref	Alt	Depth	somma		rapporto F	ref Vs mu
					Forw	somma R		
HVRI.Tratto.IVb	23	C	T	1835 #	31	1803	0.01719357	mut
HVRI.Tratto.I	16050	C	T	361 #	152	209	0.72727273	mut
HVRI.Tratto.III	16303	G	G	7350 #	2282	5068	0.45027624	ref
HVRI.Tratto.IVb	9	C	C	1833 #	31	1802	0.01720311	ref
HVRI.Tratto.IVb	27	C	C	1834 #	31	1803	0.01719357	ref
HVRI.Tratto.III	16263	G	G	6858 #	2157	4701	0.45883854	ref
HVRI.Tratto.III	16284	G	G	7428 #	2311	5117	0.45163182	ref
HVRI.Tratto.III	16302	G	G	7350 #	2282	5068	0.45027624	ref
HVRI.Tratto.II	16236	G	G	521 #	463	58	7.98275862	ref
HVRI.Tratto.II	16196	G	G	861 #	794	67	11.8507463	ref
HVRI.Tratto.I	16102	G	G	361 #	153	208	0.73557692	ref
HVRI.Tratto.II	16270	G	G	451 #	445	6	74.1666667	ref

In tabella 5.4.a vediamo nella prima colonna il tratto del campione preso in esame dal programma, nella seconda colonna, la posizione della base letta, nella terza e quarta colonna si vede qual è la base in quella posizione nella sequenza di riferimento ed in quella mutata, nella colonna a seguire la profondità di lettura ed infine dopo che analizza il rapporto tra le letture in forward ed in reverse il programma dichiara se nella posizione si abbia o meno una mutazione.

Anche in questo programma si devono impostare dei particolari comandi infatti perché venga riconosciuta la mutazione presente bisogna che dell'80% delle reads portino l'allele variato; perché venga considerato il caso di eteroplasmia si deve avere la percentuale tra l'allele wild type e il variato attorno al 50%; perché venga identificata come miscoding la variante deve presentarsi in meno del 15% delle reads e se si ha C<->T, G<->A, concentrate soprattutto alle estremità delle reads.

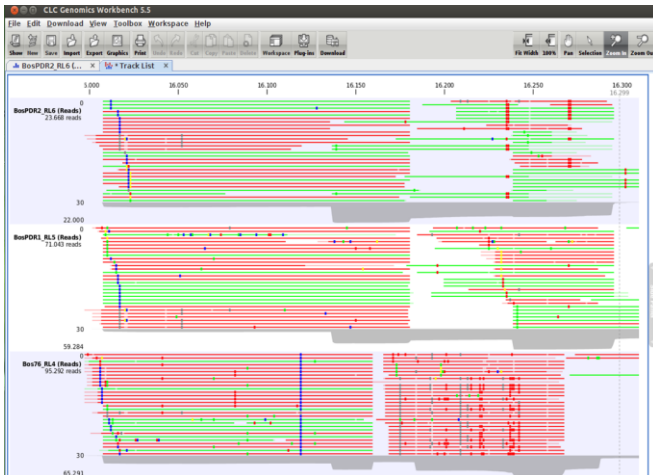


fig. 5.4.b: mappaggio delle reads con CLC Genomics Workbench. Le reads rosse sono quelle lette in reverse, le reads verdi sono quelle lette in forward

Queste reads accuratamente filtrate sono state mappate con “CLC Genomics Workbench” (fig.5.4.b), su l'intera sequenza di riferimento, questo in maniera da poter usare l'allineamento delle sequenze per poter procedere con le analisi statistiche inter ed intra-popolazionistiche.

6 - Analisi classiche con FST ed MDS piu' network

6.1 - Analisi statistiche dei dati

Al fine di valutare la struttura genetica dei campioni di *Bos taurus* e *Bos primigenius* analizzati, sono stati stimati alcuni parametri descrittivi della variabilità genetica attraverso l'analisi del frammento della prima regione ipervariabile (HVR-I) del DNA mitocondriale che va dalla posizione 16004 alla posizione 16289.

6.2 - Analisi A Livello Intrapopolazionistico

Indici di diversità standard e di diversità genetica

1-Numero di loci utilizzabili

E' definito come il numero di loci che sono utilizzati nel confronto a coppie tra individui della stessa popolazione e tra individui appartenenti a popolazioni diverse.

2-Numero di siti polimorfici

Il numero di siti variabili o polimorfici si definisce come il numero di loci utili che presentano più di un allele per locus.

3-Numero di transizioni osservate

E' definito come il numero di loci osservati in cui si sono verificate delle transizioni.

4-Numero di transversioni osservate

E' definito come il numero di loci osservati in cui si sono verificate delle transversioni.

5-Numero di aplotipi

Rappresenta il numero di aplotipi diversi osservati all'interno della popolazione. Ciascuna variante mitocondriale definita rispetto alla sequenza consenso costituisce un aplotipo mitocondriale (k).

6-Diversità aplotipica o Diversità genetica di Nei (Nei, 1987)

Si definisce come la probabilità che due aplotipi presi a caso nella popolazione siano diversi. Questa stima e la varianza associata si calcolano con le seguenti formule:

$$\hat{H} = \frac{n}{n-1} \left(1 - \sum_{i=1}^k p_i^2\right) \quad V(\hat{H}) = \frac{2}{n(n-1)} \left\{ 2(n-2) \left[\sum_{i=1}^k p_i^3 - \left(\sum_{i=1}^k p_i^2\right)^2 \right] + \sum_{i=1}^k p_i^2 - \left(\sum_{i=1}^k p_i^2\right)^2 \right\}$$

dove n è il numero di copie del gene, k è il numero di alleli (aplotipi) e p_i è la frequenza nel campione dell'allele (o aplotipo) i .

7-Numero medio di differenze a coppie

E' il numero medio di differenze tra tutte le coppie di aplotipi del campione. E si calcola:

$$\pi = \sum_{i=1}^k \sum_{j < i} p_i p_j d_{ij}$$

dove d_{ij} è la stima del numero di mutazioni verificatesi dal momento della divergenza tra i e j , k è il numero di aplotipi e p_i è la frequenza dell'aplotipo i (Tajima, 1983). La varianza, assumendo non ricombinazione tra siti e neutralità selettiva, è data da:

$$V(\pi) = \frac{3n(n+1)\pi + 2(n^2 + n + 3)\pi^2}{11(n^2 - 7n + 6)}$$

La diversità nucleotidica è analoga alla diversità genetica di Nei ma definita a livello nucleotidico. Questo indice descrive la probabilità che due nucleotidi omologhi presi a caso tra due sequenze siano differenti. La diversità nucleotidica può calcolarsi come il numero medio di differenze tra coppie di sequenze (π) diviso la lunghezza della sequenza studiata (Tajima, 1983; Nei, 1987). Le formule corrispondenti per la stima di questo parametro e della varianza associata assumendo non ricombinazione e neutralità selettiva sono:

$$\pi_n = \frac{\sum_{i=1}^k \sum_{j < i} p_i p_j d_{ij}}{L} \quad V(\pi_n) = \frac{n+1}{3(n-1)L} \pi_n + \frac{2(n^2 + n + 3)}{9n(n-1)} \pi_n^2$$

dove p_i e p_j sono le frequenze nel campione degli aplotipi i e j , d_{ij} è la stima del numero di mutazioni verificatesi dal momento della divergenza tra i e j ed L è la lunghezza della sequenza analizzata.

Tutti gli indici di diversità sono stati determinati con il software ARLEQUIN 3.5, (Schneider et al., 1999).

6.3 - Struttura genetica della popolazione

Il livello di strutturazione genetica della popolazione esaminata è stato analizzato mediante l'utilizzo della tecnica AMOVA (Analisi della Varianza Molecolare), metodo che utilizza sia le informazioni relative al contenuto allelico degli aplotipi sia quelle legate alle loro frequenze (Excoffier et al., 1992). La significatività statistica delle componenti della varianza associate con i differenti possibili livelli di struttura (entro gli individui, entro le popolazioni, entro i gruppi di popolazioni, fra i gruppi) è stata testata mediante procedure di permutazione non-parametrica. Con l'approccio AMOVA si ottiene una stima dell'indice di fissazione, F_{st} (Wright, 1965), corretto per l'informazione molecolare (e perciò definito anche Φ_{st}). Il valore ottenuto varia da 0 a 1: tanto maggiormente si avvicina a 1 tanto più le popolazioni risultano tra loro differenziate. La tecnica AMOVA è stata applicata utilizzando il software ARLEQUIN 3.0 (Schneider et al., 1999).

6.4 Stima delle distanze genetiche fra sequenze nucleotidiche secondo il modello Kimura 2-parametri

Per il confronto tra i campioni all'interno del gruppo dei bovini antichi italiani, e per il confronto tra il gruppo nel suo insieme e altre popolazioni (razze), a partire dai dati di sequenza sono state costruite delle matrici di distanze genetiche utilizzando il modello Kimura 2-Parametri. Secondo tale modello la probabilità che tutte le sostituzioni nucleotidiche abbiano luogo casualmente, è nella maggior parte dei casi poco realistica. In effetti, è stato dimostrato, empiricamente, che le transizioni sono generalmente più frequenti delle trasversioni. Il modello a due parametri, proposto da Kimura, tiene conto proprio di tali differenze nei tassi di sostituzione delle transizioni e delle trasversioni. In questo modello le sostituzioni che determinano transizioni hanno un tasso α per sito per anno che differisce da un tasso β delle trasversioni e il tasso totale di sostituzione per sito per anno è dato da $\alpha+2\beta$. Kimura ha quindi dimostrato che il numero di sostituzioni nucleotidiche per anno è dato da:

$$d = 2\lambda t = 2\alpha t + 4\beta t = -1/2 \log_e [(1 - 2P - Q) \sqrt{1 - 2Q}]$$

$$P = UP/N$$

$$Q = UQ/N$$

$$N = M + UP + UQ$$

Dove P è la frazione di siti nucleotidici che differiscono per una transizione (UP = numero di posizioni che differiscono per una transizione), Q è la frazione di posizioni della sequenza che differiscono per una trasversione (UQ = numero di posizioni che differiscono per una trasversione) N è il numero totale di siti nucleotidici comparati. Nel Metodo di Kimura 2 Parametri è stata utilizzata la gamma correction nella generazione delle matrici di distanza. Questa correzione è proposta quando i tassi di mutazione non possono essere assunti uniformi per tutti i siti. Inizialmente questo tipo di correzione veniva utilizzata per i tassi di mutazione delle sostituzioni amminoacidiche, ma recentemente è stata utilizzata anche per la regione di controllo del mtDNA (Wakeley, 1993). La forma di questa distribuzione è principalmente controllata dal parametro α , che è l'inverso del coefficiente di variazione del tasso di mutazione: più piccolo è il coefficiente α , e più sono assunti irregolari i tassi di mutazione; solitamente, nel caso del mtDNA bovino viene utilizzato un coefficiente α pari a 0.14. Se il tasso di mutazione fosse uguale per tutti i siti il valore di α tenderebbe all'infinito.

Nel caso di valori negativi delle distanze genetiche, le matrici sono state corrette aggiungendo una piccola costante; tale procedura non altera le relazioni genetiche tra le popolazioni e consente di utilizzare gli algoritmi per le ricostruzioni filogenetiche. La matrice di distanza secondo il modello Kimura 2 Parametri è stata calcolata con il software ARLEQUIN 3.5 (Schneider et al., 1999).

6.5 - Analisi a livello interpopolazionistico

Il pool di sequenze determinate in questo lavoro è stato comparato con altre 50 sequenze mitocondriali rappresentative della variabilità genetica antica pre-domesticazione europea e con 726 sequenze mitocondriali appartenenti a 53 razze bovine moderne italiane, europee, medio-orientali (Tabella c1). Dalle matrici di distanze genetiche ottenute sono stati costruiti un albero filogenetico con il metodo del NJTree (Saitou & Nei, 1987) e uno scaling multidimensionale (MDS) nonché un median-joining network. Sono stati costruiti due alberi filogenetici con l'algoritmo Median Joining Network utilizzando le sequenze antiche italiane ed europee. Il primo albero riflette la diversità aplo-tipica in relazione all'origine geografica, mentre nel secondo la variabilità aplo-tipica è correlata al tempo.

Entrambe le ricostruzioni sono state realizzate con il programma Network Ver. 4.0 (Bandelt et al., 1999).

6.6 - Median-Joining network

Un network è la rappresentazione in due dimensioni dei rapporti fra sequenze di DNA, basata sul principio della massima parsimonia, secondo il quale viene scelto come albero filogenetico migliore quello che presenta il minor numero possibile di passaggi evolutivi. Questo metodo utilizza gli stati dei caratteri e permette di visualizzare contemporaneamente tutti i possibili passaggi evolutivi avvenuti, inferendo anche quelli costituiti da sequenze non campionate o estinte, ma necessariamente esistenti, che vengono rappresentate da nodi chiamati Median Vector (MV). Per dati relativi alla regione di controllo del mtDNA, in cui possono esservi frequenti omoplasie (mutazioni parallele o reversioni) e per cui è assente la ricombinazione, viene utilizzato generalmente il Median-Joining Network (Bandelt, Forster et al. 1999). Con questo tipo di visualizzazione è possibile anche rilevare eventuali incompatibilità filogenetiche tra i dati che possono quindi essere filtrati prima di essere utilizzati per le analisi

definitive (Bandelt, Macaulay et al. 2000; Bandelt, Quintana-Murci et al. 2002). Per la realizzazione del Median-Joining Network è stata presa in considerazione la diversa frequenza di transizioni e trasversioni, così come le singole posizioni nucleotidiche sono state suddivise nelle categorie “rapido”, “intermedio” e “lento” relativamente al proprio tasso di transizione (Macaulay, Richards et al. 1997; Richards, Macaulay et al. 2000; Bandelt, Quintana-Murci et al. 2002), in modo da assegnare un peso inversamente proporzionale alla probabilità con cui ciascun sito nucleotidico può andare incontro a mutazione. Tale peso rispecchia l'importanza relativa che i caratteri assumono nella costruzione del network. È stato utilizzato il programma Network 4.6 (www.fluxus-engineering.com).

6.7 - Metodo Neighbor-Joining

Il metodo del NJ (Saitou & Nei, 1987) che letteralmente significa “unione dei vicini”, permette di rappresentare graficamente con un albero (starlike) i valori delle distanze genetiche ottenute. Affinché sia valida l'applicazione di questo metodo deve essere soddisfatta la sola condizione di addittività: la somma dei segmenti che separano due popolazioni dell'albero deve essere uguale (tenendo conto di un certo errore statistico) alla loro distanza genetica. Viene scelto come miglior possibile albero quello in cui la somma delle differenze al quadrato delle distanze stimate e quelle osservate di ogni coppia di popolazioni è minima. Per la realizzazione dei calcoli generanti l'albero NJ è stato usato il pacchetto software MEGA 5.0 (Tamura, 2007), mentre per la visualizzazione dell'albero ottenuto è stata utilizzata l'applicazione TREEVIEW (Page, 1996).

6.8 - MDS (Multidimensional Scaling)

L'MDS può essere considerato un'alternativa all'analisi classica dei dati basata sulla realizzazione di alberi filogenetici. Il Multidimensional

scaling è una tecnica esplorativa dei dati che permette di ottenere una rappresentazione di 'n' oggetti in uno spazio a 'k' dimensioni derivate da informazioni relative alla similarità/dissimilarità tra ciascuna coppia di oggetti. Tecnica iterativa usata per visualizzare le distanze tra oggetti in uno spazio (2D o 3D), fornisce una rappresentazione geometrica dei rapporti fra questi e permette di trovare una configurazione che approssima le distanze osservate nel modo migliore. In termini più tecnici, il programma usa un algoritmo di minimizzazione di funzioni che valuta differenti configurazioni con l'obiettivo di massimizzare la bontà dell'adattamento (o minimizzare la "mancanza d'adattamento") rispetto ai dati. La misura più comune usata per valutare quanto una particolare configurazione riproduce la matrice di distanze osservata è la misura di stress. Il valore di stress grezzo (o semplice) Phi (fi) per una configurazione è definito da:

$$\text{Phi} = S[d_{ij} - f(\delta_{ij})]^2$$

In questa formula, i d_{ij} rappresentano le distanze riprodotte, dato il rispettivo numero di dimensioni e i δ_{ij} rappresentano invece i dati originali (cioè, le distanze osservate). L'espressione $f(\delta_{ij})$ indica una trasformazione monotona non metrica dei dati originali osservati (distanze). Quindi, il programma tenterà di riprodurre l'ordinamento delle distanze tra gli oggetti nell'analisi. I calcoli e la rappresentazione grafica per il multidimensional scaling sono state effettuate con il software STATISTICA 7.1 prodotto da StatSoft. Inc.

7 – RISULTATI

7.1 – Numero di sequenze ottenute ed analisi svolte

ID	Haplotype from	Region	Missing Fragm.	Quality	Haplogroup
54	BRS		IV	OK	T
60	16190h 16173h 16239h 16220h	Piemonte		OK	T3
68	16122			OK	T3
76	16119 16250			OK	T3
77	16057		IV	OK	T3
5a	16221	Toscana	IV	OK	T3
US100.2	BRS		I	Ok	T3
767	16255		III, IV	Ok	nonT3
108	16301			Ok	T3
Pdr 9					t3
PDR10					T3
PDR1	BRS	Umbria		Ok	T3
PDR2	16235 16236		III, IV and II from 16249	OK	t3

Tab 7.1.a In tabella è possibile vedere, i campioni ottenuti, la provenienza, I frammenti mancanti, l'aplogruppo di appartenenza e le mutazioni osservate al termine delle analisi.

Siamo riusciti ad ottenere 289 bp da 14 campioni di *Bos taurus* analizzati (tabella 7.1.a); il frammento sequenziato va dalla posizione 16008 alla posizione 16300 della prima regione ipervariabile della regione di controllo del dna mitocondriale bovino; abbiamo deciso di focalizzare la nostra attenzione su questo primo frammento perché dai dati osservati in letteratura (Bailey, 1996; Bradley, 1996; Troy, 2001; Bollongino, 2006; Edwards, 2004;2007) è in questa regione che si osservano le maggiori differenze tra la specie ancestrale e le attuali razze bovine. Una volta ottenute, le sequenze sono state confrontate con 620 campioni di mtDNA moderno da 20 razze italiane, e 53 moderni europei e 30 moderne del vicino oriente, e 80 paleolitiche per valutare pienamente la natura e la portata del contributo genetico dei Bos europei alle moderne razze taurine (vedi tabella C1).

7.2 - Analisi a livello intrapopolazionistico

Per facilitare le analisi statistiche i campioni sono stati divisi in 9 gruppi:

Bovini neolitici: Taurus_Ita_Anc (Italiani), Taurus_Eur_Anc (europei),
Taurus_Neast_Anc (vicino oriente)

Bovini moderni: Taurus_Ita_Mod, Taurus_Eur_Mod,
Taurus_Neast_Mod.

Bovini paleolitici: Primig_Ita, Primig_Eur, Primig_Neast.

7.2.1 - Indici di diversità standard e di diversità genetica

Nella tab.D1 sono riportati i valori degli indici FST più comuni calcolati a partire dal gruppo di sequenze bovine:

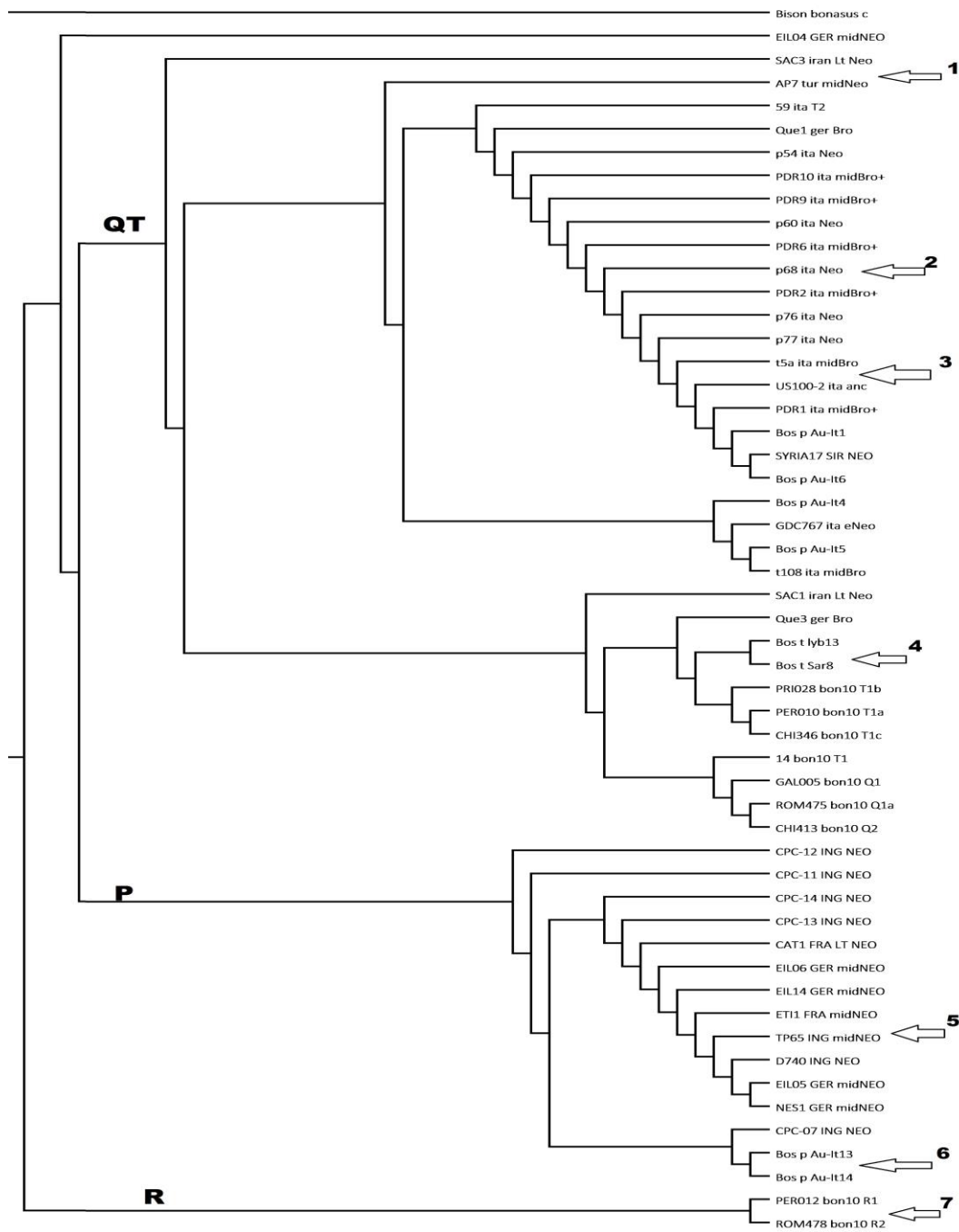
INDICI FST			
tabD1			
	Taurus_Ita_Anc	Taurus_Eur_Anc	Taurus_Neast_Anc
n° individui	14	43	17
n° aplotipi	3	14	13
n° loci utilizzati	289	289	289
N° siti polimorfici	4	16	12
N° transizioni	4	16	11
N° trasversioni	0	0	1
N° medio diff a coppie	0.813187 +/- 0.620238	1.165006 +/- 0.765856	2.617647 +/- 1.471360
diversità genetica	0.2747 +/- 0.1484	0.6323 +/- 0.0846	0.9338 +/- 0.0393
	Taurus_Ita_Mod	Taurus_Eur_Mod	Taurus_Neast_Mod
n° individui	589	53	30
n° aplotipi	11	3	24
n° loci utilizzati	289	288	287
N° siti polimorfici	39	6	27

N° transizioni	37	4	5
N° trasversioni	2	2	3
N° medio diff a coppie	2.532345+/- 1.364466	0.648766 +/- 0.511288	3.112644 +/- 1.661392
diversità genetica	0.4236 +/- 0.0252	0.1785 +/- 0.0689	0,9839 +/- 0.0131
	Primig_Ita	Primig_Eur	Primig_Neast
n° individui	19	50	2
n° aplotipi	8	20	2
n° loci utilizzati	152	210	155
N° siti polimorfici	13	73	2
N° transizioni	12	45	2
N° trasversioni	1	30	0
N° medio diff a coppie	2.005848 +/- 1.181787	4.311837+/- 2.170349	2.000000 +/- 1.732051
diversità genetica	0.6140 +/- 0.1301	0.7314 +/- 0.0628	1.0000 +/- 0.5000

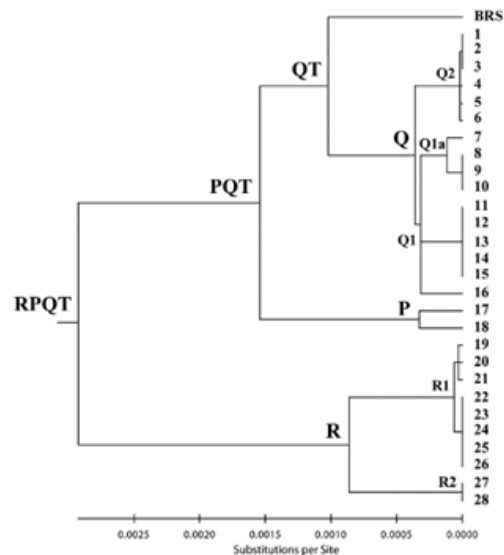
Nella tabella D1 sono riportati i valori degli indici di diversità standard e genetica calcolati per i diversi gruppi di bovini antichi e moderni sequenziati. La diversità genetica all'interno dei gruppi è espressa dagli indici di diversità genetica e dal numero medio di differenze a coppie tra sequenze, i cui valori sono, rispettivamente, per i campioni pre-domesticazione 2.005848 +/- 1.181787 (ita) e 4.311837+/- 2.170349 (eu) e 2.000000 +/-1.732051 (v.o.), per i campioni antichi post domesticazione 0.813187 +/- 0.620238 (ita) e 1.165006 +/- 0.765856 (eu) e 2.617647+/-1.471360 (v.o.), e per i moderni 2.532345+/-1.364466 (ita), 0.648766 +/- 0.511288 (eu) e 3.112644 +/- 1.661392 (v.o).

7.3 - Rappresentazioni delle distanze genetiche tra sequenze

Nella figura sottostante (7.1.a) è mostrato l'albero nj in cui sono rappresentate le distanze genetiche tra le sequenze analizzate, calcolate secondo gli FTS:



Nella fig.7.1 abbiamo una rappresentazione grafica dell'albero filogenetico costruito secondo il principio di massima parsimonia, sulla base delle sequenze parziali in nostro possesso (sono indicati solo i campioni più rappresentativi per ragioni grafiche, i bracci QT, P, ed R sono stati accorciati per adattare la grafica alla pagina). Questo tipo di albero può essere considerato soltanto una ipotesi perchè appunto alcune sequenze sono soltanto parziali ma è importante vedere, come la loro collocazione rispetti fedelmente gli indici di distanza genetica raccogliendo nel macroaplogruppo "QT" tutti i moderni ed i neolitici (post-domesticazione) Vicino orientali, Europei ed Italiani (1,2,3,4) sottolineandone comunque la distanza evolutiva collocando i vicino orientali su braccia diverse (1 e 4). Nella figura il numero 5 rappresenta i *B. primigenius* europei pre-domesticazione (P), ed il 6 i *B. primigenius* Italiani (P), mentre il 7 indica i *Bos taurus* moderni italiani con il raro aplogruppo R che rappresenta attualmente il più distante dal punto di vista evolutivo tra le razze bovine moderne.



Nella fig.7.2a NJ tree costruito su mitocondri completi (Bonfiglio et Al., 2010) mostrato per confronto.

8 - Analisi a livello interpopolazionistico

E' stato costruito un albero filogenetico con l' algoritmo Median Joining Network utilizzando le sequenze antiche italiane, europee e vicino orientali (Tabella c1). La rappresentazione grafica è correlata la variabilità aptotipica, al periodo storico ed alla collocazione geografica.

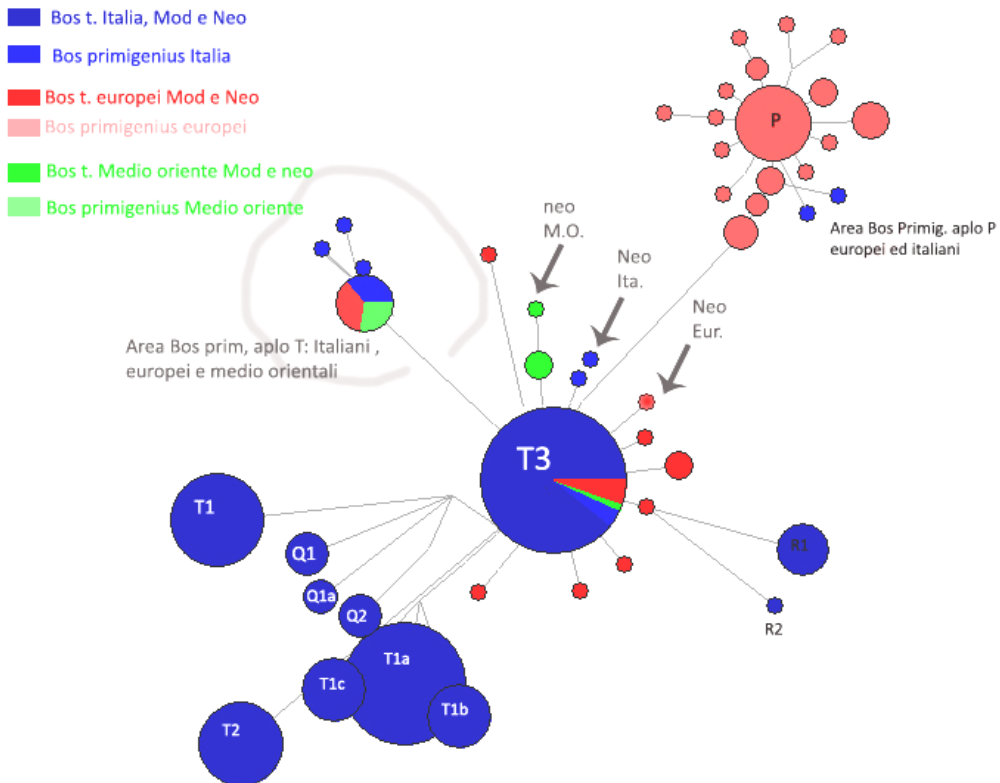


Fig 8.1

(Tabella K)

Distance method: Kimura 2P									
	T_Ita_Anc	T_Eur_Anc	T_Neast_Anc	T_Ita_Mod	T_Eur_Mod	T_Neast_Mod	Pr_Ita	Pr_Eur	Pr_Neast
Taurus_Ita_Anc	0								
Taurus_Eur_Anc	-0.00518	0							
Taurus_Neast_Anc	0.21215	0.23299	0						
Taurus_Ita_Mod	-0.00336	0.01834	0.12793	0					
Taurus_Eur_Mod	0.04764	0.02793	0.38855	-0.00021	0				
Taurus_Neast_Mod	0.42	0.47435	0.29014	0.33359	0.57897	0			
Primig_Ita	-0.01575	-0.06282	0.06031	-0.1532	0.07242	0.2962	0		
Primig_Eur	0.12165	0.18244	0.12632	0.55498	0.22382	-0.07191	-0.36498	0	
Primig_Neast	0.12466	-0.00687	-0.17156	-0.19802	0.32364	0.22943	-0.28856	-0.47907	0

Matrix of significant Fst P values		Significance Level=0.0500							
	T_Ita_Anc	T_Eur_Anc	T_Neast_Anc	T_Ita_Mod	T_Eur_Mod	T_Neast_Mod	Pr_Ita	Pr_Eur	Pr_Neast
Taurus_Ita_Anc		-	+	-	-	+	-	-	-
Taurus_Eur_Anc	-		+	-	+	+	-	+	-
Taurus_Neast_Anc	+	+		+	+	+	-	+	-
Taurus_Ita_Mod	-	-	+		-	+	-	+	-
Taurus_Eur_Mod	-	+	+	-		+	-	+	-
Taurus_Neast_Mod	+	+	+	+	+		+	-	+
Primig_Ita	-	-	-	-	-	+		-	-
Primig_Eur	-	+	+	+	+	-	-		-
Primig_Neast	-	-	-	-	-	+	-	-	

Tab a_1

Dalla matrice di Fst (Tab a1) sono stati ricavati MDS che rappresentano graficamente le distanze genetiche tra tutte le 9 popolazioni (3 *Bos primigenius* pre-domesticazione, 3 *Bos taurus* post domesticazione e 3 *Bos taurus* moderni) (fig. 8.2, 8.2a e 8.2b). Nel primo grafico (fig.34) è stata fatta una rappresentazione bidimensionle, in tale spazio è chiaro che la distorsione per rappresentare la distanza genetica sia maggiore; infatti, mentre è ben chiaro che la popolazione dei Bos neolitici italiani clusterizzi vicino alle popolazioni italiane pre e post domesticazione, non è ben chiara la “vicinanza” dei *Bos taurus* moderni vicini orientali ai *Bos primigenius* europei in contraddizione con la tabella k che rappresenta le distanze genetiche FST.

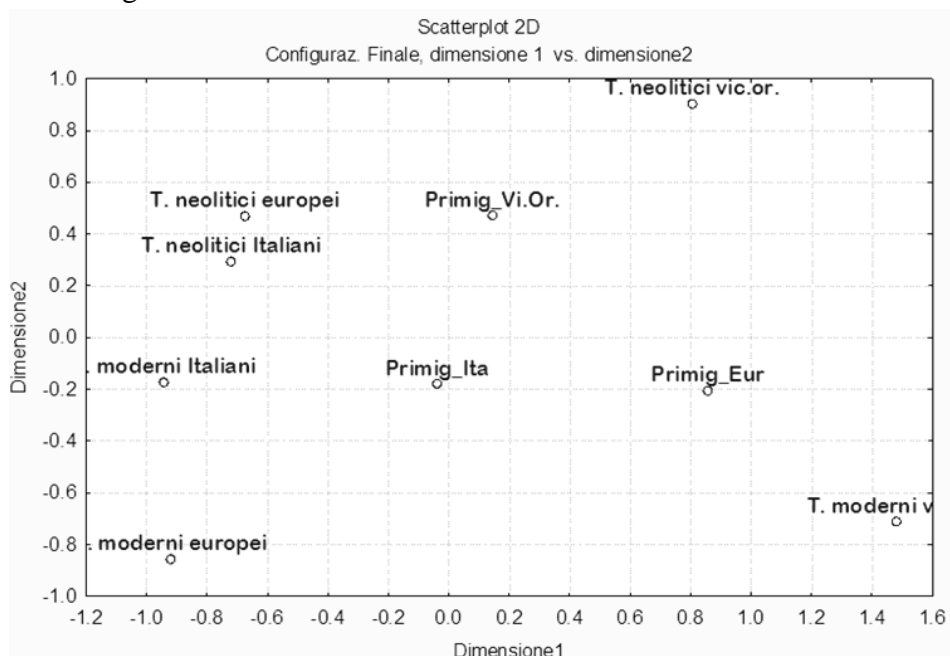


Fig.8.2 La distorsione è chiamata “stress” nel grafico (st= 0.122).

Questa è perfettamente comprensibile se si considera l'indice di distorsione, ma se cambiamo prospettiva ed usiamo una visualizzazione 3D con indice di distorsione pari a 0,066 (il 50% in meno del bidimensionale) la situazione cambia (fig.8.2a) e non solo risulta ben visibile il distacco tra *B.taurus* vicino orientali (aplo T) e *B. primigenius* europei (aplo P),

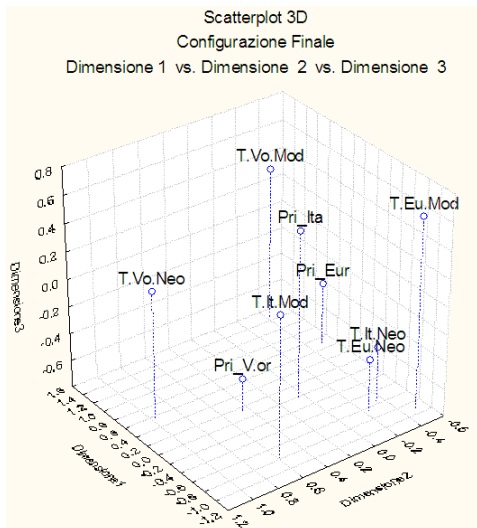


Fig 8.2a

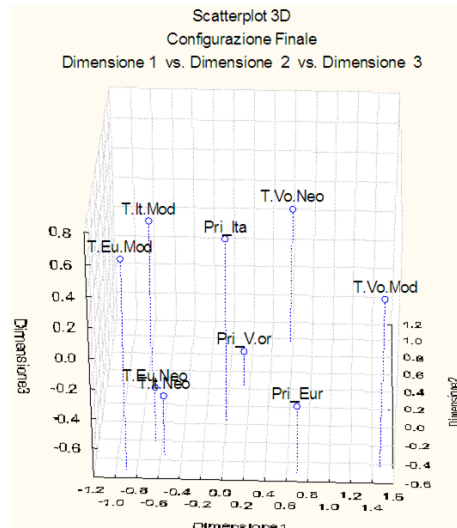


fig 8.2b

ma è ben chiara anche che i *Bos taurus* italiani moderni (fig 8.2b) risultino geneticamente più vicini ai *B. taurus* italiani Neolitici (post-domesticazione) e ben più lontani dai *B.taurus* neolitici vicino orientali, loro presunto centro di origine.

9 - Discussione sui risultati e conclusioni:

Analisi a livello intrapopolazionistico e interpopolazionistico

Nei campioni neolitici italiani (*Bos taurus* – post domesticazione) si riscontrano gli stessi aplotipi presenti nei bovini del paleolitico superiore (*Bos primigenius* pre-domesticazione) e gli stessi aplotipi presenti nelle razze moderne europee ed italiane. Questo risultato è discordante con le ipotesi sulla domesticazione formulate in precedenza. Infatti se, come si pensava in passato, ci fossero stati molteplici eventi migratori dal vicino oriente, le specie europee ed italiane di popolazioni di *B. taurus* non solo avrebbero avuto mtDNA afferente all'aplogruppo T, ma il loro mtDNA-T sarebbe dovuto rimanere quasi identico rispetto a quello tipico del Vicino oriente nel corso dell'evoluzione allopatrica.

Nel Median Joining Network (figura 8.1) si osserva un gruppo numericamente più grande rappresentato dai campioni con aplotipo di derivazione T (tra cui T3) che comprende i campioni post domesticazione neolitici e moderni ma anche i campioni di *Bos primigenius* italiani, e un altro ramo ben separato costituito dai campioni caratterizzati dall'aplotipo P, nord europei (questi ben visibili nel grafico MDS) ed italiani, che sono molto distanti rispetto al primo in termini di mutazioni. Il dato, sul quale incide anche la lunghezza del segmento analizzato, è comunque significativo poichè il frammento da noi amplificato comprende la maggioranza dei siti polimorfici all'interno della prima regione ipervariabile (HVR-I). All'interno del gruppo di sequenze antiche (pre-domesticazione) afferenti all'aplogruppo T la variabilità mitocondriale è piuttosto bassa ma aumenta significativamente a partire dai campioni neolitici fino ad arrivare a dividersi in subaplogruppi nei moderni. Dal punto di vista interpopolazionistico, il confronto con il gruppo dei *Bos primigenius* “europei” e *Bos primigenius* “vicino orientali” mette in evidenza come in Italia ancor prima che nel resto d'Europa fossero presenti contemporaneamente *Bos primigenius* con una caratterizzazione mitocondriale oggi presente nella gran parte delle razze europee di *Bos taurus* e uri con un aplotipo mitocondriale (P) di cui al contrario si è perso il retaggio. Inoltre alcune popolazioni italiane, come quelle caratterizzate dagli aplogruppi R e Q (datati su base

filogenetica a ben 43ka, Achilli et Al., 2009) hanno contribuito al pool genico moderno ma non è stato trovato ancora un riscontro nei campioni antichi post domesticazione.

Gli aplotipi T3 che caratterizzano i campioni *Bos taurus* neolitici della presente tesi si ritrovano in Europa sia in periodi precedenti la domesticazione, sia nei campioni più moderni. Ciò suggerisce che ci possano essere stati due eventi di domesticazione locali uno in Europa (in particolare in Italia) e l'altro Asia minore, indipendentemente dai fenomeni migratori neolitici.

Come ultima considerazione bisogna osservare che la manipolazione attraverso gli incroci fatti per secoli a dalle popolazioni neolitiche (agricoltori e allevatori) delle specie da allevamento ha ridotto notevolmente la variabilità genetica dei bovini italiani.

Tabella c1 campioni totali.

NOME CAMPIONE	DATAZIONE	PROVENIENZA	Specie	Fonte
Bos_p_Au-It19	paleolitico superiore	Italia	primigenius	Catalano 2010; Lari 2011;
Bos_p_Au-It18	paleolitico superiore	Italia	primigenius	Catalano 2010; Lari 2011;
Bos_p_Au-It17	paleolitico superiore	Italia	primigenius	Catalano 2010; Lari 2011;
Bos_p_Au-It16	paleolitico superiore	Italia	primigenius	Catalano 2010; Lari 2011;
Bos_p_Au-It14	paleolitico superiore	Italia	primigenius	Catalano 2010; Lari 2011;
Bos_p_Au-It15	paleolitico superiore	Italia	primigenius	Catalano 2010; Lari 2011;
Bos_p_Au-It13	paleolitico superiore	Italia	primigenius	Catalano 2010; Lari 2011;
Bos_p_Au-It12	paleolitico superiore	Italia	primigenius	Catalano 2010; Lari 2011;
Bos_p_Au-It11	paleolitico superiore	Italia	primigenius	Catalano 2010; Lari 2011;
Bos_p_Au-It10	paleolitico superiore	Italia	primigenius	Catalano 2010; Lari 2011;
Bos_p_Au-It9	paleolitico superiore	Italia	primigenius	Catalano 2010; Lari 2011;
Bos_p_Au-It8	paleolitico superiore	Italia	primigenius	Catalano 2010; Lari 2011;
Bos_p_Au-It7	paleolitico superiore	Italia	primigenius	Catalano 2010; Lari 2011;
Bos_p_Au-It6	paleolitico superiore	Italia	primigenius	Catalano 2010; Lari 2011;
Bos_p_Au-It1	paleolitico superiore	Italia	primigenius	Catalano 2010; Lari 2011;
Bos_p_Au-It5	paleolitico superiore	Italia	primigenius	Catalano 2010; Lari 2011;
Bos_p_Au-It4	paleolitico superiore	Italia	primigenius	Catalano 2010; Lari 2011;
Bos_p_Au-It3	paleolitico superiore	Italia	primigenius	Catalano 2010; Lari 2011;
Bos_p_Au-It2	paleolitico superiore	Italia	primigenius	Catalano 2010; Lari 2011;
p54_ita_Neo	Neolitico	Italia_piemonte	Taurus	presente lavoro di tesi
p60_ita_Neo	Neolitico	Italia_piemonte	Taurus	presente lavoro di tesi
p68_ita_Neo	Neolitico	Italia_piemonte	Taurus	presente lavoro di tesi
p76_ita_Neo	Neolitico	Italia_piemonte	Taurus	presente lavoro di tesi
p77_ita_Neo	Neolitico	Italia_piemonte	Taurus	presente lavoro di tesi
t5a_ita_midBro	Bronzo Medio	Italia_toscana	Taurus	presente lavoro di tesi
US100-2_ita_anc	Neolitico	Italia_toscana	Taurus	presente lavoro di tesi
t108_ita_midBro	Bronzo Medio	Italia_toscana	Taurus	presente lavoro di tesi
PDR1_ita_midBro+	Bronzo Medio	Italia_Umbria	Taurus	presente lavoro di tesi
PDR2_ita_midBro+	Bronzo Medio	Italia_Umbria	Taurus	presente lavoro di tesi
PDR6_ita_midBro+	Bronzo Medio	Italia_Umbria	Taurus	presente lavoro di tesi
PDR9_ita_midBro+	Bronzo Medio	Italia_Umbria	Taurus	presente lavoro di tesi
PDR10_ita_midBro+	Bronzo Medio	Italia_Umbria	Taurus	presente lavoro di tesi
GDC767_ita_eNeo	eNeolitico	Italia_Umbria	Taurus	presente lavoro di tesi
ALB2_UNG_BRO	Età del Bronzo	Ungheria	Primigenius	Bollongino 2006, 2007
ALB4_UNG_BRO	Età del Bronzo	Ungheria	Primigenius	Bollongino 2006, 2007
ALL1_UNG_BRO	Età del Bronzo	Ungheria	Primigenius	Bollongino 2006, 2007
CAT1_FRA_LT_NEO	3694 bC	Francia	Primigenius	Bollongino 2006, 2007
ETI1_FRA_midNEO	5464bC	Francia	Primigenius	Bollongino 2006, 2007
PAR1_FRA_midNEO	3340-3150bC	Francia	Primigenius	Bollongino 2006, 2007
RUF4_FRA_NEO	Mesolitico/Neolitico	Francia	Primigenius	Bollongino 2006, 2007
ROU6_FRA_midNEO	Tardo Neolitico	Francia	Primigenius	Bollongino 2006, 2007
CPC-02_ING_NEO	Mesolitico/Neolitico	Inghilterra	Primigenius	Bollongino 2006, 2007
CHWF_ING_LT_NEO	4090-3720BP	Inghilterra	Primigenius	Troy 2001
CPC-03_ING_NEO	Mesolitico/Neolitico	Inghilterra	Primigenius	Bollongino 2006, 2007
CPC-04_ING_NEO	Mesolitico/Neolitico	Inghilterra	Primigenius	Bollongino 2006, 2007
CPC-05_ING_NEO	Mesolitico/Neolitico	Inghilterra	Primigenius	Bollongino 2006, 2007

NOME CAMPIONE	DATAZIONE	PROVENIENZA	Specie	Fonte
CPC-06_ING_NEO	Mesolitico/Neolitico	Inghilterra	Primigenius	Bollongino 2006, 2007
CPC-07_ING_NEO	Mesolitico/Neolitico	Inghilterra	Primigenius	Bollongino 2006, 2007
CPC-08_ING_NEO	Mesolitico/Neolitico	Inghilterra	Primigenius	Bollongino 2006, 2007
CPC-10_ING_NEO	Mesolitico/Neolitico	Inghilterra	Primigenius	Bollongino 2006, 2007
CPC-11_ING_NEO	Mesolitico/Neolitico	Inghilterra	Primigenius	Bollongino 2006, 2007
CPC-12_ING_NEO	Mesolitico/Neolitico	Inghilterra	Primigenius	Bollongino 2006, 2007
CPC-13_ING_NEO	Mesolitico/Neolitico	Inghilterra	Primigenius	Bollongino 2006, 2007
CPC-14_ING_NEO	Mesolitico/Neolitico	Inghilterra	Primigenius	Bollongino 2006, 2007
CPC-98_ING_NEO	Mesolitico/Neolitico	Inghilterra	Primigenius	Bollongino 2006, 2007
D740_ING_NEO	12290BP	Inghilterra	Primigenius	Bayley 1996
NORF_ING_NEO	3990-3720BP	Inghilterra	Primigenius	Troy 2001
TP65_ING_midNEO	7570-7320BP	Inghilterra	Primigenius	Troy 2001
EIL04_GER_midNEO	5000bC	Germania	Primigenius	Edward 2007
EIL05_GER_midNEO	5000bC	Germania	Primigenius	Edward 2007
EIL06_GER_midNEO	5000bC	Germania	Primigenius	Edward 2007
EIL14_GER_midNEO	5000bC	Germania	Primigenius	Edward 2007
NES1_GER_midNEO	4800-4100 bC	Germania	Primigenius	Bollongino 2006
NES2_GER_midNEO	4800-4100 bC	Germania	Primigenius	Bollongino 2006
ROS01_GER_NEO	tardo Mesolitico/antico Neolitico	Germania	Primigenius	Edwards 2007
ROS02_GER_NEO	tardo Mesolitico/antico Neolitico	Germania	Primigenius	Edwards 2007
ROS03_GER_NEO	tardo Mesolitico/antico Neolitico	Germania	Primigenius	Edwards 2007
ROS04_GER_NEO	tardo Mesolitico/antico Neolitico	Germania	Primigenius	Edwards 2007
ROS05_GER_NEO	tardo Mesolitico/antico Neolitico	Germania	Primigenius	Edwards 2007
ROS07_GER_NEO	tardo Mesolitico/antico Neolitico	Germania	Primigenius	Edwards 2007
ROS10_GER_NEO	tardo Mesolitico/antico Neolitico	Germania	Primigenius	Edwards 2007
ROS11_GER_NEO	tardo Mesolitico/antico Neolitico	Germania	Primigenius	Edwards 2007
ROS12_GER_NEO	tardo Mesolitico/antico Neolitico	Germania	Primigenius	Edwards 2007
HAL1_GER_MOD	100 bC	Germania	Primigenius	Bollongino 2006
GL411_AUS_midNEO	4900-4700 bC	Austria	Primigenius	Bollongino 2007
GL412_AUS_midNEO	4900-4700 bC	Austria	Primigenius	Bollongino 2007
GL413_AUS_midNEO	4900-4700 bC	Austria	Primigenius	Bollongino 2007
GL418_AUS_midNEO	4900-4700 bC	Austria	Primigenius	Bollongino 2007
H1_UNG_midNEO	5900-5500bC	Ungheria	Primigenius	Bollongino 2007
H3_UNG_midNEO	5900-5500bC	Ungheria	Primigenius	Bollongino 2007
H5_UNG_midNEO	5900-5500bC	Ungheria	Primigenius	Bollongino 2007
SZE2_UNG_midNEO	5500-5000 bC	Ungheria	Primigenius	Edwards Bollongino 2007
IRN02_IRA_midNEO	5000 bC	IRAN	Primigenius	Edwards Bollongino 2007
LJU3_SLO_midNEO	6070 bC	Slovenia	Primigenius	Bollongino 2006
SYRIA17_SIR+A61:E8701E8300 bC	8700-8300 bC	SIRIA	Primigenius	Edwards Bollongino 2007
WAN10_ger_Neo	4100-3800 bC	Germania	Taurus	Edwards Bollongino 2006-07
WAN09_ger_Neo	4100-3800 bC	Germania	Taurus	Edwards Bollongino 2006-07
WAN07_ger_Neo	4100-3800 bC	Germania	Taurus	Edwards Bollongino 2006-07
WAN05_ger_Neo	4100-3800 bC	Germania	Taurus	Edwards Bollongino 2006-07
WAN04_ger_Neo	4100-3800 bC	Germania	Taurus	Edwards Bollongino 2006-07
WAN02_ger_Neo	4100-3800 bC	Germania	Taurus	Edwards Bollongino 2006-07
WAN01_ger_Neo	4100-3800 bC	Germania	Taurus	Edwards Bollongino 2006-07
TRE04_ger_midNeo	4000 bC	Germania	Taurus	Edwards Bollongino 2006-07
TRE03_ger_midNeo	4000 bC	Germania	Taurus	Edwards Bollongino 2006-07

NOME CAMPIONE	DATAZIONE	PROVENIENZA	Specie	Fonte
ROS09_ger_Lt_Neo	4000 bC	Germania	Taurus	Edwards Bollongino 2006-07
TRE01_ger_midNeo	4000 bC	Germania	Taurus	Edwards Bollongino 2006-07
Nmr24_ger_midNeo	Neolitico Medio	Germania	Taurus	Edwards Bollongino 2006-07
Nmr22_ger_midNeo	Neolitico Medio	Germania	Taurus	Edwards Bollongino 2006-07
Nmr3_ger_midNeo	Neolitico Medio	Germania	Taurus	Edwards Bollongino 2006-07
God3_ger_Neo	Neolitico antico	Germania	Taurus	Edwards Bollongino 2006-07
God2_ger_Neo	Neolitico antico	Germania	Taurus	Edwards Bollongino 2006-07
God1_ger_Neo	Neolitico antico	Germania	Taurus	Edwards Bollongino 2006-07
Eil13_ger_midNeo	5000 bC	Germania	Taurus	Edwards Bollongino 2006-07
Eil12_ger_midNeo	5001 bC	Germania	Taurus	Edwards Bollongino 2006-07
Eil9_ger_midNeo	5002 bC	Germania	Taurus	Edwards Bollongino 2006-07
Eil7_ger_midNeo	5003 bC	Germania	Taurus	Edwards Bollongino 2006-07
Eil2_ger_midNeo	5004 bC	Germania	Taurus	Edwards Bollongino 2006-07
Eil1_ger_midNeo	5005 bC	Germania	Taurus	Edwards Bollongino 2006-07
Der1_ger_midNeo	3600 bC	Germania	Taurus	Edwards Bollongino 2006-07
Que3_ger_Bro	1800-700 bC	Germania	Taurus	Edwards Bollongino 2006-07
Que2_ger_Bro	1800-700 bC	Germania	Taurus	Edwards Bollongino 2006-07
Que1_ger_Bro	1800-700 bC	Germania	Taurus	Edwards Bollongino 2006-07
Svo2_slok_Lt_Neo	tardo neolitico	Slovacchia	Taurus	Edwards Bollongino 2006-07
Pol4_ung_Lt_Neo	tardo neolitico	Ungheria_T3	Taurus	Edwards Bollongino 2006-07
Pol2_ung_Lt_Neo	tardo neolitico	Ungheria_T3	Taurus	Edwards Bollongino 2006-07
Hod4_ung_Lt_Neo	tardo neolitico	Ungheria_T3	Taurus	Edwards Bollongino 2006-07
Ber6_ung_Neo	Neolitico	Ungheria	Taurus	Edwards Bollongino 2006-07
POL5_ung_Lt_Neo	tardo neolitico	Ungheria	Taurus	Edwards Bollongino 2006-07
ALB3_ung_Lt_Neo	2500 bC	Ungheria	Taurus	Edwards Bollongino 2006-07
Mar8_fra_Lt_Neo	tardo neolitico	Francia	Taurus	Edwards Bollongino 2006-07
NOY02_fra_midNeo	4000 bC	Francia_T3	Taurus	Edwards Bollongino 2006-07
MAR10_fra_Lt_Neo	tardo neolitico	Francia_T	Taurus	Edwards Bollongino 2006-07
EF02_fra_Neo	Neolitico antico	Francia_T3	Taurus	Edwards Bollongino 2006-07
Lju1_slo_Lt_Neo	tardo mesolitico	slovenia	Taurus	Edwards Bollongino 2006-07
SVO1_slo_midNeo	3000 bC	slovenia	Taurus	Edwards Bollongino 2006-07
SVO3_slo_midNeo	3000 bC	slovenia	Taurus	Edwards Bollongino 2006-07
Ap6_tur_midNeo	5200 bC	Turchia	Taurus	Edwards Bollongino 2006-07
AP7_tur_midNeo	5200 bC	Turchia	Taurus	Edwards Bollongino 2006-07
Tb07_sir_Bro	4000-2000 bC	Siria_T3	Taurus_T3	Edwards Bollongino 2006-07
ZAG1_iran_Lt_Neo	tardo neolitico	Iran_T	Taurus_T	Edwards Bollongino 2006-07
TAS1_iran_Lt_Neo	tardo neolitico	Iran	Taurus_T2	Edwards Bollongino 2006-07
TAB1_iran_Lt_Neo	tardo neolitico	Iran	Taurus_T3	Edwards Bollongino 2006-07
SAC7_iran_Lt_Neo	tardo neolitico	Iran	Taurus_T	Edwards Bollongino 2006-07
SAC6_iran_Lt_Neo	tardo neolitico	Iran	Taurus_T2	Edwards Bollongino 2006-07
SAC5_iran_Lt_Neo	tardo neolitico	Iran	Taurus_T	Edwards Bollongino 2006-07
SAC3_iran_Lt_Neo	tardo neolitico	Iran	Taurus_T	Edwards Bollongino 2006-07
SAC2_iran_Lt_Neo	tardo neolitico	Iran	TaurusT3	Edwards Bollongino 2006-07
SAC1_iran_Lt_Neo	tardo neolitico	Iran	Taurus_T2	Edwards Bollongino 2006-07
QAL4_iran_midNeo	medio neolitico	Iran	Taurus_T	Edwards Bollongino 2006-07
QAB4_iran_Lt_Neo	tardo neolitico	Iran	Taurus_T2	Edwards Bollongino 2006-07
MF7_iran_Lt_Neo	tardo neolitico	Iran	Taurus	Edwards Bollongino 2006-07
JB1_iran_Lt_Neo	tardo neolitico	Iran	Taurus	Edwards Bollongino 2006-07

NOME CAMPIONE	DATAZIONE	PROVENIENZA	Specie	Fonte
HAF2_iran_Bro	Bronzo	Iran	Taurus_T1	Edwards Bollongino 2006-07
WH10_ing_midNeo	4800-4600 BP	Inghilterra	Taurus_T3	Edwards Bollongino 2006-07
WH06_ing_midNeo	4800-4600 BP	Inghilterra	Taurus_T3	Edwards Bollongino 2006-07
PER012_bon10_R1	Moderni	Italia	Taurus	Bonfiglio 2010
61_AGE_ita_T3	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
62_AGE_ita_T3	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
63_AGE_ita_T3	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
64_AGE_ita_T3	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
65_AGE_ita_T3	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
66_AGE_ita_T3	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
67_AGE_ita_T3	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
68_AGE_ita_T3	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
69_AGE_ita_T3	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
70_AGE_ita_T3	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
71_AGE_ita_T3	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
72_AGE_ita_T3	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
73_AGE_ita_T3	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
74_AGE_ita_T3	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
75_AGE_ita_T3	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
76_AGE_ita_T3	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
77_AGE_ita_T3	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
78_AGE_ita_T3	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
79_AGE_ita_T3	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
80_AGE_ita_T3	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
81_AGE_ita_T3	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
82_AGE_ita_T3	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
83_AGE_ita_T3	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
84_AGE_ita_T3	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
85_AGE_ita_T3	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
86_AGE_ita_T3	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
87_AGE_ita_T3	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
88_AGE_ita_T3	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
14_bon10_T1	Moderni	Italia	Taurus	Bonfiglio 2010
15_bon10_T1	Moderni	Italia	Taurus	Bonfiglio 2010
16_bon10_T1	Moderni	Italia	Taurus	Bonfiglio 2010
17_bon10_T1	Moderni	Italia	Taurus	Bonfiglio 2010
PER010_bon10_T1a	Moderni	Italia	Taurus	Bonfiglio 2010
PER005_bon10_T1a	Moderni	Italia	Taurus	Bonfiglio 2010
PER017_bon10_T1a	Moderni	Italia	Taurus	Bonfiglio 2010
PER020_bon10_T1a	Moderni	Italia	Taurus	Bonfiglio 2010
PRI028_bon10_T1b	Moderni	Italia	Taurus	Bonfiglio 2010
442_ita_T3	Moderni	Italia_Lombar	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
443_ita_T3	Moderni	Italia_Lombar	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
444_ita_T3	Moderni	Italia_Lombar	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
445_ita_T3	Moderni	Italia_Lombar	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
446_ita_T3	Moderni	Italia_Lombar	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
447_ita_T3	Moderni	Italia_Lombar	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010

NOME CAMPIONE	DATAZIONE	PROVENIENZA	Specie	Fonte
449_ita_T3	Moderni	Italia_Piemont	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
221_ita_T3	Moderni	Italia_Fresian	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
222_ita_T3	Moderni	Italia_Fresian	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
223_ita_T3	Moderni	Italia_Fresian	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
224_ita_T3	Moderni	Italia_Fresian	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
225_ita_T3	Moderni	Italia_Fresian	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
226_ita_T3	Moderni	Italia_Fresian	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
227_ita_T3	Moderni	Italia_Fresian	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
228_ita_T3	Moderni	Italia_Fresian	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
229_ita_T3	Moderni	Italia_Fresian	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
230_ita_T3	Moderni	Italia_Fresian	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
231_ita_T3	Moderni	Italia_Fresian	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
232_ita_T3	Moderni	Italia_Fresian	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
233_ita_T3	Moderni	Italia_Fresian	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
89_BVP_ita_T3	Moderni	Italia_Lombar	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
90_BVP_ita_T3	Moderni	Italia_Lombar	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
91_BVP_ita_T3	Moderni	Italia_Lombar	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
92_BVP_ita_T3	Moderni	Italia_Lombar	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
93_BRU_ita_T3	Moderni	Italia (zona Al	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
94_BRU_ita_T3	Moderni	Italia (zona Al	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
95_BRU_ita_T3	Moderni	Italia (zona Al	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
96_BRU_ita_T3	Moderni	Italia (zona Al	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
97_BRU_ita_T3	Moderni	Italia (zona Al	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
98_BRU_ita_T3	Moderni	Italia (zona Al	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
99_BRU_ita_T3	Moderni	Italia (zona Al	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
100_BRU_ita_T3	Moderni	Italia (zona Al	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
35_bon10_T1	Moderni		Taurus	Bonfiglio 2010
36_bon10_T1	Moderni		Taurus	Bonfiglio 2010
GAL005_bon10_Q1	Moderni		Taurus	Bonfiglio 2010
GAL016_bon10_Q1	Moderni		Taurus	Bonfiglio 2010
101_ita_T3	Moderni	Italia_Veneto	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
102_ita_T3	Moderni	Italia_Liguria	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
103_ita_T3	Moderni	Italia_Liguria	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
104_ita_T3	Moderni	Italia_Liguria	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
105_ita_T3	Moderni	Italia_Liguria	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
106_ita_T3	Moderni	Italia_Liguria	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
107_ita_T3	Moderni	Italia_Liguria	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
108_ita_T3	Moderni	Italia_Liguria	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
109_ita_T3	Moderni	Italia_Liguria	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
110_ita_T3	Moderni	Italia_Liguria	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
111_ita_T3	Moderni	Italia_Liguria	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
112_ita_T3	Moderni	Italia_Liguria	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
113_ita_T3	Moderni	Italia_Liguria	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
114_ita_T3	Moderni	Italia_Liguria	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
115_ita_T3	Moderni	Italia_Liguria	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
116_ita_T3	Moderni	Italia_Liguria	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
117_ita_T3	Moderni	Italia_Liguria	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
118_ita_T3	Moderni	Italia_Liguria	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
119_ita_T3	Moderni	Italia_Liguria	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010

NOME CAMPIONE	DATAZIONE	PROVENIENZA	Specie	Fonte
121_ita_T3	Moderni	Italia_Liguria	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
122_ita_T3	Moderni	Italia_Liguria	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
123_ita_T3	Moderni	Italia_Liguria	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
124_ita_T3	Moderni	Italia_Liguria	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
125_ita_T3	Moderni	Italia_Liguria	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
126_ita_T3	Moderni	Italia_Liguria	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
59_ita_T2	Moderni	Italia_Liguria	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
60_ita_T2	Moderni	Italia_Toscana	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
CAB001_bon10_Q1	Moderni	Italia_Liguria	Taurus	Bonfiglio 2010
CAB002_bon10_Q1	Moderni	Italia_Liguria	Taurus	Bonfiglio 2010
CAB003_bon10_Q1	Moderni	Italia_Liguria	Taurus	Bonfiglio 2010
CAL009_bon10_T1c	Moderni	Italia_Toscana	Taurus	Bonfiglio 2010
CAL024_bon10_T1c	Moderni	Italia_Toscana	Taurus	Bonfiglio 2010
CHI217_bon10_T1c	Moderni	Italia_Toscana	Taurus	Bonfiglio 2010
CHI346_bon10_T1c	Moderni	Italia_Toscana	Taurus	Bonfiglio 2010
CHI459_bon10_T1c	Moderni	Italia_Toscana	Taurus	Bonfiglio 2010
CHI432_bon10_T1c	Moderni	Italia_Toscana	Taurus	Bonfiglio 2010
CHI524_bon10_T1c	Moderni	Italia_Toscana	Taurus	Bonfiglio 2010
CHI525_bon10_T1c	Moderni	Italia_Toscana	Taurus	Bonfiglio 2010
CHI425_bon10_T1b	Moderni	Italia_Toscana	Taurus	Bonfiglio 2010
CHI556_bon10_T1b	Moderni	Italia_Toscana	Taurus	Bonfiglio 2010
CHI193_bon10_T1b	Moderni	Italia_Toscana	Taurus	Bonfiglio 2010
CHI414_bon10_T1b	Moderni	Italia_Toscana	Taurus	Bonfiglio 2010
394_ita_T3	Moderni	Italia_Toscana	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
395_ita_T3	Moderni	Italia_Toscana	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
396_ita_T3	Moderni	Italia_Toscana	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
397_ita_T3	Moderni	Italia_Toscana	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
398_ita_T3	Moderni	Italia_Toscana	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
399_ita_T3	Moderni	Italia_Toscana	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
400_ita_T3	Moderni	Italia_Toscana	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
401_ita_T3	Moderni	Italia_Toscana	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
402_ita_T3	Moderni	Italia_Toscana	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
403_ita_T3	Moderni	Italia_Toscana	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
404_ita_T3	Moderni	Italia_Toscana	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
405_ita_T3	Moderni	Italia_Toscana	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
406_ita_T3	Moderni	Italia_Toscana	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
407_ita_T3	Moderni	Italia_Toscana	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
408_ita_T3	Moderni	Italia_Toscana	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
409_ita_T3	Moderni	Italia_Toscana	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
422_ita_T3	Moderni	Italia_Toscana	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
423_ita_T3	Moderni	Italia_Toscana	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
424_ita_T3	Moderni	Italia_Toscana	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
425_ita_T3	Moderni	Italia_Toscana	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
426_ita_T3	Moderni	Italia_Toscana	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
427_ita_T3	Moderni	Italia_Toscana	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
428_ita_T3	Moderni	Italia_Toscana	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
429_ita_T3	Moderni	Italia_Toscana	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
430_ita_T3	Moderni	Italia_Toscana	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
431_ita_T3	Moderni	Italia_Toscana	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010

NOME CAMPIONE	DATAZIONE	PROVENIENZA	Specie	Fonte
168_ita_T3	Moderni	Italia_Umbria	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
169_ita_T3	Moderni	Italia_Umbria	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
170_ita_T3	Moderni	Italia_Umbria	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
171_ita_T3	Moderni	Italia_Umbria	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
172_ita_T3	Moderni	Italia_Umbria	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
173_ita_T3	Moderni	Italia_Umbria	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
174_ita_T3	Moderni	Italia_Umbria	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
175_ita_T3	Moderni	Italia_Umbria	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
37_ita_T2	Moderni	Italia_Emiliana	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
38_ita_T2	Moderni	Italia_Emiliana	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
39_ita_T2	Moderni	Italia_Emiliana	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
40_ita_T2	Moderni	Italia_Emiliana	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
41_ita_T2	Moderni	Italia_Emiliana	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
09_bon10_T1	Moderni	Italia	Taurus	Bonfiglio 2010
10_bon10_T1	Moderni	Italia	Taurus	Bonfiglio 2010
11_bon10_T1	Moderni	Italia	Taurus	Bonfiglio 2010
12_bon10_T1	Moderni	Italia	Taurus	Bonfiglio 2010
13_bon10_T1	Moderni	Italia	Taurus	Bonfiglio 2010
CHI466_bon10_Q1	Moderni	Italia_Umbria	Taurus	Bonfiglio 2010
CHI467_bon10_Q2	Moderni	Italia_Umbria	Taurus	Bonfiglio 2010
CHI490_bon10_Q2	Moderni	Italia_Umbria	Taurus	Bonfiglio 2010
CHI597_bon10_Q2	Moderni	Italia_Toscana	Taurus	Bonfiglio 2010
CHI413_bon10_Q2	Moderni	Italia_Toscana	Taurus	Bonfiglio 2010
CHI575_bon10_T1a	Moderni	Italia_Toscana	Taurus	Bonfiglio 2010
CHI532_bon10_T1a	Moderni	Italia_Toscana	Taurus	Bonfiglio 2010
CHI344_bon10_T1a	Moderni	Italia_Toscana	Taurus	Bonfiglio 2010
CHI397_bon10_T1a	Moderni	Italia_Toscana	Taurus	Bonfiglio 2010
CHI336_bon10_T1a	Moderni	Italia_Toscana	Taurus	Bonfiglio 2010
CHI034_bon10_T1a	Moderni	Italia_Toscana	Taurus	Bonfiglio 2010
CHI350_bon10_T1a	Moderni	Italia_Toscana	Taurus	Bonfiglio 2010
CHI447_bon10_T1a	Moderni	Italia_Toscana	Taurus	Bonfiglio 2010
CHI580_bon10_T1a	Moderni	Italia_Toscana	Taurus	Bonfiglio 2010
CHI481_bon10_T1a	Moderni	Italia_Toscana	Taurus	Bonfiglio 2010
MAR_36_bon10_T1a	Moderni	Italia_Toscana	Taurus	Bonfiglio 2010
MAR_10_bon10_T1a	Moderni	Italia_Toscana	Taurus	Bonfiglio 2010
MAR_12_bon10_T1a	Moderni	Italia_Toscana	Taurus	Bonfiglio 2010
176_ita_T3	Moderni	Italia_Toscana	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
177_ita_T3	Moderni	Italia_Toscana	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
178_ita_T3	Moderni	Italia_Toscana	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
179_ita_T3	Moderni	Italia_Toscana	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
180_ita_T3	Moderni	Italia_Toscana	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
181_ita_T3	Moderni	Italia_Toscana	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
182_ita_T3	Moderni	Italia_Toscana	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
183_ita_T3	Moderni	Italia_Toscana	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
184_ita_T3	Moderni	Italia_Toscana	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
185_ita_T3	Moderni	Italia_Toscana	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
186_ita_T3	Moderni	Italia_Toscana	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
187_ita_T3	Moderni	Italia_Toscana	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
188_ita_T3	Moderni	Italia_Toscana	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010

NOME CAMPIONE	DATAZIONE	PROVENIENZA	Specie	Fonte
190_ita_T3	Moderni	Italia_Toscana	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
191_ita_T3	Moderni	Italia_Toscana	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
192_ita_T3	Moderni	Italia_Toscana	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
CIN013_bon10_R1	Moderni	Italia_Sicilia	Taurus	Bonfiglio 2010
CIN019_bon10_R1	Moderni	Italia_Sicilia	Taurus	Bonfiglio 2010
CINL5B_bon10_T1c	Moderni	Italia_Sicilia	Taurus	Bonfiglio 2010
CINL14_bon10_T1b	Moderni	Italia_Sicilia	Taurus	Bonfiglio 2010
CIN1ne_bon10_T1b	Moderni	Italia_Sicilia	Taurus	Bonfiglio 2010
CINL01_bon10_T1a	Moderni	Italia_Sicilia	Taurus	Bonfiglio 2010
CINL07_bon10_T1a	Moderni	Italia_Sicilia	Taurus	Bonfiglio 2010
CINL10_bon10_T1a	Moderni	Italia_Sicilia	Taurus	Bonfiglio 2010
CINL2B_bon10_T1a	Moderni	Italia_Sicilia	Taurus	Bonfiglio 2010
CIN011_bon10_T1a	Moderni	Italia_Sicilia	Taurus	Bonfiglio 2010
CIN015_bon10_T1a	Moderni	Italia_Sicilia	Taurus	Bonfiglio 2010
CIN016_bon10_T1a	Moderni	Italia_Sicilia	Taurus	Bonfiglio 2010
CIN018_bon10_T1a	Moderni	Italia_Sicilia	Taurus	Bonfiglio 2010
CINL13_bon10_T1a	Moderni	Italia_Sicilia	Taurus	Bonfiglio 2010
CINL1B_bon10_T1a	Moderni	Italia_Sicilia	Taurus	Bonfiglio 2010
MODL13_bon10_T1a	Moderni	Italia_Sicilia	Taurus	Bonfiglio 2010
410_ita_T3	Moderni	Italia_Sicilia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
411_ita_T3	Moderni	Italia_Sicilia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
412_ita_T3	Moderni	Italia_Sicilia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
413_ita_T3	Moderni	Italia_Sicilia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
414_ita_T3	Moderni	Italia_Sicilia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
415_ita_T3	Moderni	Italia_Sicilia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
416_ita_T3	Moderni	Italia_Sicilia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
417_ita_T3	Moderni	Italia_Sicilia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
418_ita_T3	Moderni	Italia_Sicilia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
419_ita_T3	Moderni	Italia_Sicilia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
420_ita_T3	Moderni	Italia_Sicilia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
421_ita_T3	Moderni	Italia_Sicilia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
193_ita_T3	Moderni	Italia_Sicilia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
194_ita_T3	Moderni	Italia_Sicilia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
195_ita_T3	Moderni	Italia_Sicilia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
196_ita_T3	Moderni	Italia_Sicilia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
197_ita_T3	Moderni	Italia_Sicilia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
198_ita_T3	Moderni	Italia_Sicilia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
199_ita_T3	Moderni	Italia_Sicilia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
200_ita_T3	Moderni	Italia_Sicilia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
201_ita_T3	Moderni	Italia_Sicilia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
202_ita_T3	Moderni	Italia_Sicilia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
203_ita_T3	Moderni	Italia_Sicilia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
204_ita_T3	Moderni	Italia_Sicilia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
205_ita_T3	Moderni	Italia_Sicilia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
206_ita_T3	Moderni	Italia_Sicilia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
207_ita_T3	Moderni	Italia_Sicilia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
208_ita_T3	Moderni	Italia_Sicilia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
209_ita_T3	Moderni	Italia_Sicilia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
210_ita_T3	Moderni	Italia_Sicilia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010

NOME CAMPIONE	DATAZIONE	PROVENIENZA	Specie	Fonte
212_ita_T3	Moderni	Italia_Sicilia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
213_ita_T3	Moderni	Italia_Sicilia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
214_ita_T3	Moderni	Italia_Toscana	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
18_bon10_T1	Moderni	Italia	Taurus	Bonfiglio 2010
19_bon10_T1	Moderni	Italia	Taurus	Bonfiglio 2010
20_bon10_T1	Moderni	Italia	Taurus	Bonfiglio 2010
21_bon10_T1	Moderni	Italia	Taurus	Bonfiglio 2010
22_bon10_T1	Moderni	Italia	Taurus	Bonfiglio 2010
215_ita_T3	Moderni	Italia_subAlpi	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
216_ita_T3	Moderni	Italia_subAlpi	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
217_ita_T3	Moderni	Italia_subAlpi	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
218_ita_T3	Moderni	Italia_subAlpi	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
34_bon10_T1	Moderni		Taurus	
234_ita_T3	Moderni	Italia_SUD	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
235_ita_T3	Moderni	Italia_SUD	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
236_ita_T3	Moderni	Italia_SUD	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
237_ita_T3	Moderni	Italia_SUD	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
238_ita_T3	Moderni	Italia_SUD	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
239_ita_T3	Moderni	Italia_SUD	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
240_ita_T3	Moderni	Italia_SUD	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
241_ita_T3	Moderni	Italia_SUD	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
242_ita_T3	Moderni	Italia_SUD	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
243_ita_T3	Moderni	Italia_SUD	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
244_ita_T3	Moderni	Italia_SUD	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
245_ita_T3	Moderni	Italia_SUD	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
246_ita_T3	Moderni	Italia_SUD	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
247_ita_T3	Moderni	Italia_SUD	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
248_ita_T3	Moderni	Italia_SUD	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
249_ita_T3	Moderni	Italia_SUD	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
250_ita_T3	Moderni	Italia_SUD	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
53_ita_T2	Moderni	Italia_Sud	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
54_ita_T2	Moderni	Italia_Sud	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
55_ita_T2	Moderni	Italia_Sud	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
251_ita_T3	Moderni	Italia_SUD	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
252_ita_T3	Moderni	Italia_SUD	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
253_ita_T3	Moderni	Italia_SUD	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
254_ita_T3	Moderni	Italia_SUD	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
255_ita_T3	Moderni	Italia_SUD	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
256_ita_T3	Moderni	Italia_SUD	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
257_ita_T3	Moderni	Italia_SUD	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
258_ita_T3	Moderni	Italia_SUD	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
259_ita_T3	Moderni	Italia_SUD	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
260_ita_T3	Moderni	Italia_SUD	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
261_ita_T3	Moderni	Italia_SUD	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
262_ita_T3	Moderni	Italia_SUD	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
263_ita_T3	Moderni	Italia_SUD	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
264_ita_T3	Moderni	Italia_SUD	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
265_ita_T3	Moderni	Italia_SUD	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
266_ita_T3	Moderni	Italia_SUD	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010

NOME CAMPIONE	DATAZIONE	PROVENIENZA	Specie	Fonte
268_ita_T3	Moderni	Italia_SUD	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
269_ita_T3	Moderni	Italia_SUD	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
270_ita_T3	Moderni	Italia_SUD	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
271_ita_T3	Moderni	Italia_SUD	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
272_ita_T3	Moderni	Italia_SUD	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
273_ita_T3	Moderni	Italia_SUD	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
274_ita_T3	Moderni	Italia_SUD	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
275_ita_T3	Moderni	Italia_SUD	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
276_ita_T3	Moderni	Italia_SUD	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
277_ita_T3	Moderni	Italia_SUD	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
278_ita_T3	Moderni	Italia_SUD	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
279_ita_T3	Moderni	Italia_SUD	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
280_ita_T3	Moderni	Italia_SUD	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
281_ita_T3	Moderni	Italia_SUD	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
282_ita_T3	Moderni	Italia_SUD	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
POD19N_bon10_T1c	Moderni		Taurus	Bonfiglio 2010
POD16N_bon10_T1c	Moderni		Taurus	Bonfiglio 2010
POD07N_bon10_T1c	Moderni		Taurus	Bonfiglio 2010
POD030_bon10_T1a	Moderni	Italia_SUD	Taurus	Bonfiglio 2010
POD033_bon10_T1a	Moderni	Italia_SUD	Taurus	Bonfiglio 2010
POD064_bon10_T1a	Moderni	Italia_SUD	Taurus	Bonfiglio 2010
POD041_bon10_T1a	Moderni	Italia_SUD	Taurus	Bonfiglio 2010
POD057_bon10_T1a	Moderni		Taurus	Bonfiglio 2010
283_ita_T3	Moderni	Italia_SUD	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
284_ita_T3	Moderni	Italia_SUD	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
285_ita_T3	Moderni	Italia_SUD	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
286_ita_T3	Moderni	Italia_SUD	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
287_ita_T3	Moderni	Italia_SUD	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
288_ita_T3	Moderni	Italia_SUD	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
289_ita_T3	Moderni	Italia_SUD	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
290_ita_T3	Moderni	Italia_SUD	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
291_ita_T3	Moderni	Italia_SUD	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
292_ita_T3	Moderni	Italia_SUD	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
293_ita_T3	Moderni	Italia_SUD	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
294_ita_T3	Moderni	Italia_SUD	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
295_ita_T3	Moderni	Italia_SUD	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
296_ita_T3	Moderni	Italia_SUD	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
297_ita_T3	Moderni	Italia_SUD	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
23_bon10_T1	Moderni	Italia	Taurus	Bonfiglio 2010
24_bon10_T1	Moderni	Italia	Taurus	Bonfiglio 2010
25_bon10_T1	Moderni	Italia	Taurus	Bonfiglio 2010
26_bon10_T1	Moderni	Italia	Taurus	Bonfiglio 2010
27_bon10_T1	Moderni	Italia	Taurus	Bonfiglio 2010
28_bon10_T1	Moderni	Italia	Taurus	Bonfiglio 2010
29_bon10_T1	Moderni	Italia	Taurus	Bonfiglio 2010
30_bon10_T1	Moderni	Italia	Taurus	Bonfiglio 2010
298_ita_T3	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
299_ita_T3	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
300_ita_T3	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010

NOME CAMPIONE	DATAZIONE	PROVENIENZA	Specie	Fonte
52_ita_T2	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
		Italia	Taurus	
		Italia	Taurus	
31_bon10_T1	Moderni	Italia	Taurus	Bonfiglio 2010
32_bon10_T1	Moderni	Italia	Taurus	Bonfiglio 2010
33_bon10_T1	Moderni	Italia	Taurus	Bonfiglio 2010
450_ita_T3	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
451_ita_T3	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
452_ita_T3	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
453_ita_T3	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
454_ita_T3	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
455_ita_T3	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
456_ita_T3	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
457_ita_T3	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
458_ita_T3	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
459_ita_T3	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
460_ita_T3	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
461_ita_T3	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
462_ita_T3	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
463_ita_T3	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
464_ita_T3	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
465_ita_T3	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
466_ita_T3	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
467_ita_T3	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
468_ita_T3	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
469_ita_T3	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
470_ita_T3	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
471_ita_T3	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
472_ita_T3	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
473_ita_T3	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
474_ita_T3	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
475_ita_T3	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
476_ita_T3	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
477_ita_T3	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
478_ita_T3	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
479_ita_T3	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
480_ita_T3	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
481_ita_T3	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
482_ita_T3	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
483_ita_T3	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
484_ita_T3	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
485_ita_T3	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
486_ita_T3	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
487_ita_T3	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
488_ita_T3	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
489_ita_T3	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
490_ita_T3	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
491_ita_T3	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
492_ita_T3	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010

NOME CAMPIONE	DATAZIONE	PROVENIENZA	Specie	Fonte
541_ROM_ita_T3	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
542_ROM_ita_T3	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
543_ROM_ita_T3	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
544_ROM_ita_T3	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
545_ROM_ita_T3	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
546_ROM_ita_T3	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
547_ROM_ita_T3	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
548_ROM_ita_T3	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
549_ROM_ita_T3	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
550_ROM_ita_T3	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
551_ROM_ita_T3	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
42_ita_T2	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
43_ita_T2	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
44_ita_T2	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
45_ita_T2	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
46_ita_T2	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
47_ita_T2	Moderni	Italia	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
ROM445_bon10_Q2	Moderni	Italia	Taurus	Bonfiglio 2010
ROM550_bon10_Q2	Moderni	Italia	Taurus	Bonfiglio 2010
ROM475_bon10_Q1	Moderni	Italia	Taurus	Bonfiglio 2010
ROM534_bon10_Q1	Moderni	Italia	Taurus	Bonfiglio 2010
ROM590_bon10_Q1	Moderni	Italia	Taurus	Bonfiglio 2010
ROM242_bon10_T1	Moderni	Italia	Taurus	Bonfiglio 2010
ROM542_bon10_T1	Moderni	Italia	Taurus	Bonfiglio 2010
ROM604_bon10_T1	Moderni	Italia	Taurus	Bonfiglio 2010
ROM558_bon10_T1	Moderni	Italia	Taurus	Bonfiglio 2010
ROM270_bon10_T1	Moderni	Italia	Taurus	Bonfiglio 2010
ROM520_bon10_T1	Moderni	Italia	Taurus	Bonfiglio 2010
ROM605_bon10_T1	Moderni	Italia	Taurus	Bonfiglio 2010
ROM610_bon10_T1	Moderni	Italia	Taurus	Bonfiglio 2010
REG008_bon10_T1a	Moderni	Italia	Taurus	Bonfiglio 2010
REG023_bon10_T1a	Moderni	Italia	Taurus	Bonfiglio 2010
ROM498_bon10_R1	Moderni	Italia	Taurus	Bonfiglio 2010
ROM553_bon10_R1	Moderni	Italia	Taurus	Bonfiglio 2010
ROM561_bon10_R1	Moderni	Italia	Taurus	Bonfiglio 2010
ROM600_bon10_R1	Moderni	Italia	Taurus	Bonfiglio 2010
PRI019_bon10_Q1a	Moderni	Italia	Taurus	Bonfiglio 2010
MCG383_bon10_T1	Moderni	Italia	Taurus	Bonfiglio 2010
MCG452_bon10_T1	Moderni	Italia	Taurus	Bonfiglio 2010
MCG469_bon10_T1	Moderni	Italia	Taurus	Bonfiglio 2010
MCG005_bon10_T1	Moderni	Italia	Taurus	Bonfiglio 2010
MCG363_bon10_T1	Moderni	Italia	Taurus	Bonfiglio 2010
MCG378_bon10_T1	Moderni	Italia	Taurus	Bonfiglio 2010
MCG358_bon10_T1	Moderni	Italia	Taurus	Bonfiglio 2010
MCG364_bon10_T1	Moderni	Italia	Taurus	Bonfiglio 2010
MCG399_bon10_T1	Moderni	Italia	Taurus	Bonfiglio 2010
MCG450_bon10_T1	Moderni	Italia	Taurus	Bonfiglio 2010
MCG489_bon10_T1	Moderni	Italia	Taurus	Bonfiglio 2010
MCG375_bon10_R2	Moderni	Italia	Taurus	Bonfiglio 2010
ROM478_bon10_R2	Moderni	Italia	Taurus	Bonfiglio 2010

NOME CAMPIONE	DATAZIONE	PROVENIENZA	Specie	Fonte
219_oll_T3	Moderni	Olanda	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
220_oll_T3	Moderni	Olanda	Taurus	Achilli 2008, 2009, 2010
Bos_t_tkean11	Moderni Medio e Vicino Orie	Turchia	Taurus	Beja-Pereira 2010
Bos_t_tksac40	Moderni Medio e Vicino Orie	Turchia	Taurus	Beja-Pereira 2010
Bos_t_lybT1	Moderni Medio e Vicino Orie	Libia	Taurus	Beja-Pereira 2010
Bos_t_lybT12	Moderni Medio e Vicino Orie	Libia	Taurus	Beja-Pereira 2010
Bos_t_lyb02	Moderni Medio e Vicino Orie	Libia	Taurus	Beja-Pereira 2010
Bos_t_lyb03	Moderni Medio e Vicino Orie	Libia	Taurus	Beja-Pereira 2010
Bos_t_lyb4	Moderni Medio e Vicino Orie	Libia	Taurus	Beja-Pereira 2010
Bos_t_lyb06	Moderni Medio e Vicino Orie	Libia	Taurus	Beja-Pereira 2010
Bos_t_lyb07	Moderni Medio e Vicino Orie	Libia	Taurus	Beja-Pereira 2010
Bos_t_lyb09	Moderni Medio e Vicino Orie	Libia	Taurus	Beja-Pereira 2010
Bos_t_lyb08	Moderni Medio e Vicino Orie	Libia	Taurus	Beja-Pereira 2010
Bos_t_lyb10	Moderni Medio e Vicino Orie	Libia	Taurus	Beja-Pereira 2010
Bos_t_lyb11	Moderni Medio e Vicino Orie	Libia	Taurus	Beja-Pereira 2010
Bos_t_lybbra05	Moderni Medio e Vicino Orie	Libia	Taurus	Beja-Pereira 2010
Bos_t_lybbra09	Moderni Medio e Vicino Orie	Libia	Taurus	Beja-Pereira 2010
Bos_t_lybbra11	Moderni Medio e Vicino Orie	Libia	Taurus	Beja-Pereira 2010
Bos_t_lybbra17	Moderni Medio e Vicino Orie	Libia	Taurus	Beja-Pereira 2010
Bos_t_lybbra171	Moderni Medio e Vicino Orie	Libia	Taurus	Beja-Pereira 2010
Bos_t_lyb12	Moderni Medio e Vicino Orie	Libia	Taurus	Beja-Pereira 2010
Bos_t_lyb13	Moderni Medio e Vicino Orie	Libia	Taurus	Beja-Pereira 2010
Bos_t_lybbra20	Moderni Medio e Vicino Orie	Libia	Taurus	Beja-Pereira 2010
Bos_t_Turk7	Moderni Medio e Vicino Orie	Turchia	Taurus	Troy 2001
Bos_t_Ablack12	Moderni Medio e Vicino Orie	Turchia	Taurus	Troy 2001
Bos_t_Ear15	Moderni Medio e Vicino Orie	Turchia	Taurus	Troy 2001
Bos_t_Sar8	Moderni Medio e Vicino Orie	Turchia	Taurus	Troy 2001
Bos_t_Dam41	Moderni Medio e Vicino Orie	Turchia	Taurus	Troy 2001
Bos_t_IrqN7	Moderni Medio e Vicino Orie	Iraq	Taurus	Troy 2001
Bos_t_IrqN10	Moderni Medio e Vicino Orie	Iraq	Taurus	Troy 2001
Bos_t_IrqN12	Moderni Medio e Vicino Orie	Iraq	Taurus	Troy 2001

5. BIBLIOGRAFIA

- Achilli A, Olivieri A, Pellecchia M, Uboldi C, Colli L, Al-Zahery N, Accetturo M, Pala M, Kashani BH, Perego UA and others. 2008. Mitochondrial genomes of extinct aurochs survive in domestic cattle. *Curr Biol* 18:R157–158.
- Achilli A., S. Bonfiglio, A. Olivieri, Ar. Malusa, M. Pala, B. Hooshiar Kashani, U. A. Perego, P. Ajmone-Marsan, L. Liotta, O. Semino, H.J. Bandelt, L. Ferretti, A. Torroni. “The Multifaceted Origin of Taurine Cattle Reflected by the Mitochondrial Genome”. *PLoS One*, June 2009. Volume 4. Issue 6. e5753.
- Anderson, S., DeBruijn, M. H. L., Coulson, A. R., Eperon, I. C., Sanger, F. & Young, G. (1982), “ Sequence and organization of the bovine mitochondrial genome”. *J. Mol. Biol.* 156, 683–717.
- Ajmone-Marsan P, Garcia JF, Lenstra JA (2010) On the origin of cattle: how aurochs became cattle and colonized the world. *Evol Anthropol* 19: 148–157
- Bailey, J. F. et al. (1996). Ancient DNA suggests a recent expansion of European cattle from a diverse wild progenitor species. *Proc. R. Soc. Lond. B* 263, 1467-1473.
- Baker CMA, Manwell C. (1980) Chemical classification of cattle. 1. Breed groups. *Anim. Blood. Grps. Biochem. Genet.*, 11: 127-150.
- Baker CMA, Manwell C. (1991) Population genetics, molecular markers and gene conservation of bovine breeds. In: *Cattle Genetic Resources*. (1st ed.), (Hickman CG, ed.), Amsterdam: Elsevier. pp. 221-304. (Neimann-Sørensen A, Tribe De, eds *World Animal Science*; vol. B7).
- Bandelt H.J., Forster P., Rohl A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol.* 16(1):37-48.
- Bandelt, H. J., V. Macaulay, et al. (2000). "Median networks: speedy construction and greedy reduction, one

simulation, and two case studies from human mtDNA." *Mol Phylogenet Evol* 16(1): 8-28.

- Bandelt, H. J., L. Quintana-Murci, et al. (2002). "The fingerprint of phantom mutations in mitochondrial DNA data." *Am J Hum Genet* 71(5): 1150-60.
- Bollongino, R., Edwards, C. J., Alt, K. W., Burger, J. & Bradley, D. G. (2006) Early history of European domestic cattle as revealed by ancient DNA. *Proc. R. Soc. B* 2, 155–159.
- Bonfiglio L., Mangano G., Marra A. C. & Masini F., 2001, A new Late Pleistocene vertebratefaunal complex from Sicily (S. Teodoro cave. North-eastern Sicily, Italy), *Boll. Soc. Paleont. It.*, 40 (2), 149-158
- Bonfiglio S, Achilli A, Olivieri A, Negrini R, Colli L, et al. (2010) The enigmatic origin of bovine mtDNA haplogroup R: sporadic interbreeding or an independent event of *Bos primigenius* domestication in Italy? *PLoS One* 5: e15760.
- Bradley DG, Loftus RT, Cunningham P, Machugh DE. 1998. Genetics and domestic cattle origins. *Evol Anthropol* 6:79–86.
- Bradley DG, MacHugh DE, Cunningham P, Loftus RT. (1996) Mitochondrial diversity and the origins of African and European cattle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (in press).
- Bradley DG, Magee DA. 2006. Genetics and origins of domestic cattle. In: Zeder MA, Bradley DG, Emshwiller E, Smith BD, editors. *Documenting domestication: new genetic and archeological paradigms*. Berkeley: University of California Press. p 317–328.
- Briggs, Good, Green¹, Krause¹, Maricic¹, Stenzel¹, Lalueza-Fox², Pääbo¹ et al. (2009); *Targeted Retrieval and Analysis of Five Neandertal mtDNA Genomes*. *Science* Vol. 325 no. 5938 pp. 318-321
- Brown TA, Brown KA. (1994). Ancient DNA: using molecular biology to explore the past. *Bioessays* 16:719–726.

- Brown W.M.,(1985) The mitochondrial genome of animals. In: (Mac Intyre R.j.,Ed.) *Molecular Evolutionary Genetics*, 95-130,Plenum Press, New York
- Bruford MW, Bradley DG, Luikart G. 2003. DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. *Nature Rev Genet* 4:900–910.
- Burger J, Hummel S, Herrmann B, Henke W. (1999). DNA preservation:a microsatellite DNA study on ancient skeletal remains. *Electrophoresis* 20:1722–1728.
- Catalano G., Milani L., Manfredini A., Adoni F., Guimaraes S., Pilli E., Conzato A., Lari M., Caramelli D.:(2005)"Fenomeni di degradazione e meccanismi di riparazione del DNA antico (aDNA)". -XVI Congresso dell'Associazione Antropologica Italiana, Genova ;
- Catalano G-La domesticazione dei bovini- *Darwin*, n. 21. Settembre/Ottobre 2007, 85-89
- Cauvin J., (1989)-La Néolithisation au levant et sa Première Diffusion. In Aurenche O. & Cauvin J.(a cura di) : *Néolithisation :Proche et Moyen Orient, Méditerranée orientale, Nord de l’Afrique, Europe meridionale, Chione, Amérique du Sud*.B.A.R International Series,516 :3-36
- Clutton-Brock, J. (1999) *Domesticated Animals*, 2nd edn, British Museum of Natural History Cone, R.W., Fairfax, M.R., (1993)" Protocol for ultraviolet irradiation of surfaces to reduce PCR contamination". *PCR methods Applic.* 3:pp.15-17.
- DeSalle R, Gatsey G, Wheeler W, Grimaldi D. (1992). DNA sequences from a fossil termite in Oligo-Miocene amber and their phylogenetic implications. *Science* 257:1933–1936.
- Diamond J.(1998)- *Armi, acciaio e malattie. Breve storia del mondo negli ultimi tredicimila anni*.Einaudi.Torino
- Edwards CJ, Bollongino R, Scheu A, Chamberlain A, Tresset A, Vigne JD, Baird JF,et al. (2007) Mitochondrial DNA analysis shows a Near Eastern Neolithic origin for domestic

cattle and no indication of domestication of European aurochs. *Proc Biol Sci* 274:1377-1385

- Epstein H, Mason IL. (1984) Cattle. In: *Evolution of Domesticated Animals*. (1st ed.) (Mason IL, ed.) London: Longman. pp. 6-27.
- Epstein H. (1971) *The Origin of the Domestic Animals of Africa*. (1st ed.). New York: Africana.(vol 1).
- Excoffier, L., Smouse, P. E. & Quattro, J. M. (1992) *Genetics* 131,479-491.
- FAO. 2007. *The state of the world's animal genetic resources for food and agriculture*. Rischkowsky B, Pilling D, editors. Rome: FAO
- Friedberg, E. C.; Walker, G. C. Siede, W (1995). *DNA repair and mutagenesis*; ASM Press: Washington, D.C.
- Gilbert M.T.P.(2005) Biochemical and physical correlates of DNA contamination in archaeological bones and teeth excavated at Matera, Italy. *J Archaeol Sci* 32:785- 793
- Gansauge MT, Meyer M. *Single-stranded DNA library preparation for the sequencing of ancient or damaged DNA*. *Nat Protoc*. 2013 Apr;8(4):737-48.
- Gilbert MTP, Willerslev E, Hansen AJ, Barnes I, Rudbeck L, Lynnerup N, Cooper A, (2003a) Distribution patterns of post-mortem damage in human mitochondrial DNA. *Am J Hum Genet* 72:32–47
- Gilbert, M. T. P., Hansen, A. J., Willerslev, E., Barnes, I., Rudbeck, L., Lynnerup, N. & Cooper, A.(2003b) Characterization of genetic miscoding lesions caused by post-mortem damage. *Am. J. Hum. Genet.* 72, 48–61
- Giles R.E., Blanc H., Cann H.M., Wallace D.C. (1980). Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77(11): 6715-6719.
- Green R. E., Krause J., Ptak S. E., Briggs A. W., Ronan M. T., Simons J. F., DuL., et al. (2006). "Analysis of one million base pairs of Neanderthal DNA". *Nature*, 444(7117), 330-6.

- Grigson C. (1978) The craniology and relationships of four species of *Bos*. IV. The relationship between *Bos primigenius* Boj. and *Bos taurus* L. and its implications for the phylogeny of the domestic breeds. *J. Arch. Sci.*, 5: 123-152.
- Grigson C. (1980) The craniology and relationships of four species of *Bos*. 5. *Bos indicus* L.J. *Arch. Sci.*, 7: 3-32.
- Hagelberg, E., (1994) “ ancient Dna studies”. *Evolutionary anthropology* . pp.202-204.
- Handt, O., Hoss, M., Krings, M, Pääbo, S. (1994) “ Ancient DNA: methodological challenges”.*Experientia* 50:pp. 524-529.
- Hemmer, H. (1990) *Domestication: The Decline of Environmental Appreciation*, Cambridge University
- Hiendleder S, Lewalski H, Janke A. 2008. Complete mitochondrial genomes of *Bos taurus* and *Bos indicus* provide new insights into intraspecies variation, taxonomy and domestication. *Cytogenet Genome Res* 120:150–156.
- Higgins D.J., Bleasby A.J., Fuchs R.,(1992), Clustal X, improved software for multiple for multiple sequence alignment. *Comp. Appl . Biosci.*8: 189-191.
- Hofreiter M, Serre D, Poinar HN, Kuch M, Pääbo S. (2001). Ancient DNA. *Nat Rev* 2:353–359.
- Hoss M, Jaruga P, Zastawny T, Dizdaroglu M, Pääbo S. (1996).DNA damage and DNA sequence retrieval from ancient tissues.*Nucleic Acids Res* 24:1304–1307.
- Hoss,H., Paabo, S., (1993)” Dna extraction from Pleistocene bones by silica based purification method”. *Nucleic Acids Res.* 21: pp.3913-3914.
- Hummel S, Schultes T, Bramanti B, Herrmann B. (1999). Ancient DNA profiling by megaplex amplifications. *Electrophoresis* 20:1717–1721.
- Iniguez A M, A. Araujo, L.F. Ferreira, A.C. Vicente, (2003).Analysis of ancient DNA from coprolites: a perspective with random amplified polymorphic DNA-

polymerase chain reaction approach, Mem. Inst.Oswaldo Cruz 98 (Suppl. 1) 63–65

- J Anim Breed Genet 122(Suppl 1):36–44
- Jaenicke-Despres, V., Buckler, E., Smith, B. D., Gilbert, M. T. P., Cooper, A., Doebley, J. & Pääbo, S. (2003) Early allelic selection in maize as revealed by ancient DNA. *Science* 302,1206–1208.
- Köhler-Rollefson, E. (1989) Changes in goat exploitation at ‘Ain Ghazal between the Early and Late Neolithic: a metrical analysis. *Paleorient* 15, 141–146
- Krause J., Fu Q., Good J. M., Viola B., ShunkovM. V., Derevianko A. P., PaaboS. (2010). “The complete mitochondrial DNA genome of an unknown hominin from southern Siberia”. *Nature*, 464(7290), 894-7.
- Kruska, D. (1988) Mammalian domestication and its effect on brain structure and behavior. In *Intelligence and Evolutionary Biology* (Jerison, H.J. and Jerison, I., eds), pp. 211–250, Springer-Verlag
- Kuhn R, Ludt C, Manhart H, Peters J, Neumair E, Rottmann O. 2005. Close genetic relationship of early neolithic cattle from Ziegelberg (Freising, Germany) with modern breeds.
- Lari M, Rizzi E, Mona S, Corti G, Catalano G, et al. (2011) The complete mitochondrial genome of an 11,450-year-old aurochsen (*Bos primigenius*) from Central Italy. *BMC Evol Biol* 11: 32.
- Larson G, Dobney K, Albarella U, Fang M, Matisoo-Smith E, Robins J, Lowden S, Finlayson H, Brand T, Willerslev E, Rowley-Conwy P, Andersson L, Cooper A (2005) Worldwide phylogeography of wild boar reveals multiple centers of pig domestication. *Science* 307:1618-1621
- Lindahl T, Nyberg B. (1974). Heat induced deamination of cytosine residues in deoxyribonucleic acid. *Biochemistry* 12:3405-3410
- Lindahl T. (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362:709–715.

- Lindahl T. (1997). Facts and artifacts of ancient DNA. *Cell* 90:1–3.18:1534–1537.
- Loftus RT, MacHugh DE, Bradley DG, Sharp PM, Cunningham EP. (1994a) Evidence for two independent domestications of cattle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 2757-2761.
- Lutz S., Weisser H.J., Heizmann J., Pollak S. (1998). Location and frequency of polymorphic positions in the mtDNA control region of individuals from Germany. *Int J Legal Med.* 111(2): 67-77.
- MacHugh, D. E. & Bradley, D. G. (2001). Goats buck the trend. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 98, 5382–5384
- MacHugh, D. E., Loftus, R. T., Bradley, D. G., Sharp, P. M. & Cunningham, P. (1994). Microsatellite DNA variation within and among European cattle breeds. *Proc. R. Soc. Lond. B* 256,25–31
- MacHugh, D.E. (1996) *Molecular Biogeography and Genetic Structure of Domesticated Cattle* [Ph.D. thesis]. University of Dublin.
- Macaulay, V., M. Richards, et al. (1999). "Mitochondrial DNA recombination-no need to panic." *Proc Biol Sci* 266(1433): 2037-9; discussion 2041-2.
- Mainardi D., (1984)- *Le basi etologiche dell'addomesticazione dei vertebrati. Contributi del centro Linceo interdisciplinare di Scienze Matematiche e le loro applicazioni*, 68:19-27.
- Mannen H, Kohno M, Nagata Y, Tsuji S, Bradley DG, Yeo JS, Nyamsamba D, Zagdsuren Y, Yokohama M, Nomura K and others. 2004. Independent mitochondrial origin and historical genetic differentiation in North Eastern Asian cattle. *Mol Phylogenet Evol* 32:539–544.
- Maricic T., Whitten M., Pääbo S., (2010). *Multiplexed DNA Sequence Capture of Mitochondrial Genomes Using PCR Products*. DOI: 10.1371/journal.pone.0014004

- Masseti M.,(2002) Uomini e (non solo) topi. Gli animali domestici e la fauna antropocora. Firenze University Press.
- Meadow R. H.,(1984)-Animal Domestication in the middle East: a view of the eastern margin.In Clutton-Brock J. & Grigson C. (a cura di): Animals and Archaeology:3. Early herders and their flocks. B.A.R International Series,202: 309–337.
- Mullis KB, Faloona FA. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. Methods Enzymol 155:335–350.
- Nei, M. & Saitou (1987) Mol. Biol. Evol. 4, 406–425.
- Noonan JP, Coop G, Kudaravalli S, Smith D, Krause J, Alessi J, Chen F, Platt D, Pääbo S, Pritchard JK, Rubin EM (2006). Sequencing and analysis of Neanderthal genomic DNA. Science 314:1113-1118
- Page R.D.M. (1996). TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers.Computer Applications in the Biosciences 12: 357-358.
- Payne WJA, Hodges J. 1997. Cattle, origins, breeds and breeding policies. Oxford: Blackwell Science.
- Payne WJA. (1970) Cattle Production in the Tropics. (1st ed.) London: Longman.
- Payne WJA. (1991) Domestication: a forward step in civilisation. In: Cattle Genetic Resources.(1 s t e d .) (Hickman CG, ed.) Amsterdam: Elsevier, pp. 5172. (Neimann Sørensen A, Tribe de, eds. World Animal Science; vol B7).
- Pilgrim GE. (1947) The evolution of the buffaloes, oxen, sheep and goats. J. Linn. Soc. Lond. Zoo., 41: 272-286.
- Poinar H. (2002). The genetic secrets some fossils hold. Acc Chem Res 35:676-684
- Poinar HN, Hoss M, Bada JL, Pääbo S. (1996). Amino acid racemization and the preservation of ancient DNA. Science 272:864–866.

- Pyle C.M.,(1994) –Some late sixteenth-century depictions of the aurochs (*Bos primigenius Bojanus*, extinct 1627): new evidence from Vatican MS Urb.lat.276. *Archives of Natural History*, 21:275-288.
- Reed C.A., (a cura di), (1977) –Origins of agriculture. Mouton Publishers, Le Hague e Parigi.
- Richards, M., V. Macaulay, et al. (2000). "Tracing European founder lineages in the Near Eastern mtDNA pool." *Am J Hum Genet* 67(5): 1251-76.
- Rickards, O., (1999) “ Il Dna mitocondriale nello studio delle popolazioni umane antiche”. Tratto da “ Il Dna nello studio dei resti umani antichi”(F.Rollo), Ed. Medical Books, pp. 41-59
- Saccone, C., Pesole, G., Sbisà, E., (1991) “ the main regulatory region of mammalian mitochondrial: structure-function model of an evolutionary pattern”. *J.Mol.Evol.* 33:pp. 83-91
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487–491.
- Saitou N, Nei M (1987). The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.,(1989)“ Molecular cloning.A laboratory manual (2nd edn).” Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Scheu A, Hartz S, Schmolcke U, Tresselt A, Burger J, Bollongino R. 2008. Ancient DNA provides no evidence for independent domestication of cattle in Mesolithic Rosenhof, Northern Germany. *J Archeol Sci* 35:1257–1264
- Schmerer WM, Hummel S, Herrmann B. (1999). Optimized DNA extraction to improve reproducibility of short tandem repeat genotyping with highly degraded DNA as target. *Electrophoresis* 20:1712–1716.

- Schneider, S., Roessli, D. & Excoffier, L. ARLEQUIN Ver. 2.0: a Software for Population Genetics Data Analysis (Department of Anthropology, University of Geneva, Switzerland, 1999).
- Soltis P, Soltis D, Smiley C. (1992). An rbcL sequence from a Miocene Taxodium (bald cypress). Proc Natl Acad Sci USA 89:499–501.
- Stoneking M. & Krause J. *Learning about human population history from ancient and modern genomes*. Nature Reviews Genetics 12, 603-614 (2011)
- Tajima, F. (1983) Genetics 105, 437–460.
- Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution 24:1596-1599.
- Thomas, W.K. and Pääbo, S. (1993): DNA Sequences from Old Tissue Meth. Enz. 224: 406-419
- Troy, C. S. et al.,(2001). Genetic evidence for Near-Eastern origins of European cattle. Nature 410, 1088–1091
- Vernesi C.,Caramelli D., Bramanti B., Tilotta G. , Carbonell y Sala S., Chiarelli B.,. (1997).Analysis of ancient DNA for human sex determination application to Etruscan (seventh to third century B.C) bone samples. Etruscan Studies, , 4: 137-144.
- Vigilant L., Stoneking M., Harpending H., Hawes K., Wilson A.C. (1991). African populations and the evolution of human mitochondrial DNA. Science. 253 (5027): 1503-1507.
- Wakeley, J. (1993) Substitution rate variation among sites in hypervariable region I of human mitochondrial DNA. J. Mol. Evol. 37:613-623
- Wendorf F, Schild R. 2005. Are the early holocene cattle in the eastern Sahara domestic or wild? Evol Anthropol 3:118–128.
- Wheeler Pires-Ferreira, J.C. et al. (1976). Preceramic animal utilization in the Central Peruvian Andes. Science 194,483–490

- Willerslev E, A.J. Hansen, J. Binladen, T.B. Brand, M.T.Gilbert, B. Shapiro, M. Bunce, C. Wiuf, D.A. Gilichinsky, A. Cooper, (2003). Diverse plant and animal genetic records from Holocene Pleistocene sediments, *Science* 300 791–795.
- Willerslev, E., Hansen, A. J. & Poinar, H. N. (2004b). Isolation of nucleic acids and cultures from ice and permafrost. *Trends Ecol. Evol.* 19, 141–147.
- Wilson AC., Cann RL., Carr SM., George M. Jr, Gyllensten UB., Helm-Bychowski KM., Higuchi RG., Palumbi SR., Prager EM., Sage RD., Stoneking M.,(1985). Mitochondrial DNA and two perspective on evolutionary genetics. *Biol. J. Linn. Soc.* 26: 375-400.
- Wilson, A.C., Cann, R.L., (1992). “ Una genesi africana recente”. *Le scienze* 286: 80-85.
- Wright, S.(1965).The interpretation of population structure by F statistics with special regard to systems of mating. *Evol.* 19,395-420.
- Zeuner FE. (1963)- The history of the domestication of cattle. In: *Man And Cattle.* (Mourant AE, F.E.Zeuner, eds.) Royal Anthropological Institute of Great Britain and Ireland. pp. 9-20.(vol 18).
- Zeuner FE.,(1953)-The colour of the wild cattle of Lascaux.*Man*,53:68-69.

RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare il prof. Alberto Ugolini, coordinatore del corso di Dottorato, il prof. David Caramelli, che ha seguito il mio lavoro, la dott.ssa Stefania Vai per il prezioso aiuto datomi con le analisi statistiche e tutti i miei colleghi in laboratorio. Ringrazio il dott. Ermanno Rizzi per la disponibilità e l'assistenza nelle analisi NGS. Grazie al dott. Alessandro Achilli e alla dott.ssa Anna Olivieri per aver fornito gran parte delle sequenze moderne per l'aiuto nella realizzazione del network. Ringrazio la dott.ssa Elena Bedini, e il prof. Boscato per il campionamento dei campioni neolitici. Ringrazio tutti coloro che mi hanno incoraggiata e sostenuta in questi anni, come il prof. Luca Sineo grande mentore e consigliere, in particolare dedico questa tesi alla mia adoratissima famiglia, mia madre, mia sorella, mio marito e mia zia Mariella.

